



HAL
open science

Etude de la susceptibilité des cellules eucaryotes à l'injection de toxines par le système de sécrétion de type 3 de *Pseudomonas aeruginosa*

Julien Verove

► **To cite this version:**

Julien Verove. Etude de la susceptibilité des cellules eucaryotes à l'injection de toxines par le système de sécrétion de type 3 de *Pseudomonas aeruginosa*. Autre [q-bio.OT]. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV071 . tel-00680045

HAL Id: tel-00680045

<https://theses.hal.science/tel-00680045>

Submitted on 17 Mar 2012

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Chimie et Sciences du Vivant**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Julien VEROVE

Thèse dirigée par **Marie-Josèphe RABIET** et
codirigée par **François CRETIN**

préparée au sein du **Laboratoire de Biologie du Cancer et de
l'Infection**
dans l'**École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant**

Etude de la susceptibilité des cellules eucaryotes à l'injection de toxines par le système de sécrétion de type 3 de *Pseudomonas aeruginosa*

Thèse soutenue publiquement le **20 décembre 2011**,
devant le jury composé de :

Karine FAURE

PR, France, Rapporteur

Patricia DOUBLET

PR, France, Rapporteur

Guillaume DUMENIL

CR, France, Examineur

Bertrand TOUSSAINT

PR, France, Président

Marie-Josèphe RABIET

DR, France, Directeur de thèse

François CRETIN

MCU, France, Co-encadrant de thèse



*A mon oncle Roberto
A mon cousin Florian,*

TABLE DES MATIERES



INTRODUCTION 15

I - La bactérie opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* 16

I.1 - Environnement et mode de vie	16
I.2 - Les infections dues à <i>P. aeruginosa</i>	17
I.2.1 - Infections aiguës	18
I.2.2 - Infections chroniques.....	18
I.2.3 - <i>P. aeruginosa</i> et la mucoviscidose	19
I.3 - Les facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i>	21
I.3.1 - Les facteurs de virulence de surface	21
I.3.1.1 - Le flagelle	22
I.3.1.2 - Les pili	22
I.3.1.3 - Le lipopolysaccharide (LPS)	23
I.3.1.4 - Les lectines	24
I.3.1.5 - Les systèmes de sécrétion de <i>P. aeruginosa</i>	24
I.3.2 - Les principaux facteurs de virulence sécrétés par <i>P. aeruginosa</i>	26
I.3.2.1 - Autres molécules sécrétées	27
I.3.3 - Le Système de Sécrétion de type 3 (SST3)	27
I.3.3.1 - Structure du SST3.....	28
I.3.3.1.1 - Le corps basal ou sécréton	29
I.3.3.1.2 - L'aiguille	30
I.3.3.1.3 - Le pore de translocation	30
I.3.3.2 - Les exotoxines injectées par le SST3 de <i>P. aeruginosa</i>	33
I.3.3.2.1 - L'exotoxine ExoS	34
I.3.3.2.2 - L'exotoxine ExoT	37
I.3.3.2.3 - L'exotoxine ExoY	38
I.3.3.2.4 - L'exotoxine ExoU	39
I.3.3.3 - Régulation du SST3 de <i>P. aeruginosa</i>	39

II - Les réponses cellulaires à l'infection par *P. aeruginosa* 41

II.1 - Les cibles cellulaires	41
II.1.1 - Les cellules épithéliales.....	41
II.1.2 - Les cellules de l'immunité innée.....	44
II.1.3 - Les cellules de l'immunité adaptative	48

II.2 - Les récepteurs et composants des membranes de la cellule hôte impliqués dans l'adhérence et l'invasion cellulaire	49
II.2.1 - Les asialogangliosides	49
II.2.2 - Les PRRs	50
II.2.3 - Les intégrines	52
II.2.4 - Le CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator)	54
II.2.5 - Les radeaux lipidiques enrichis en céramides	55
II.2.6 - L'activation de voies de transduction du signal	57

III - Les réponses cellulaires en lien direct avec le SST3 58

III.1 - Activation de l'inflammasome.....	58
III.2 - Insertion du translocon dans les membranes plasmiques et signalisation dans les cellules cibles	61
III.3 - Régulation de la fonctionnalité du translocon par des réponses cellulaires.....	62

IV - Objectif du travail de thèse 64



MATERIELS ET METHODES 67

I - Bactéries et plasmides..... 68

I.1 - Répertoire des bactéries et plasmides utilisés.....	68
I.2 - Culture de <i>P. aeruginosa</i>	69
I.2.1 - Généralités	69
I.2.2 - Utilisation d'antibiotique	70
I.2.3 - Conservation des souches de <i>P. aeruginosa</i>	70
I.3 - Induction du SST3	70
I.4 - Transformation de <i>P. aeruginosa</i> par choc thermique	70

II - Techniques de biochimie..... 71

II.1 - Dosage de protéines	71
II.2 - Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE).....	71
II.2.1 - Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose ou PVDF.....	72
II.2.2 - Immunodétection.....	72

II.3 - Isolement des membranes et radeaux lipidiques de cellules eucaryotes par flottaison sur gradient de sucrose	74
II.3.1 - Extraction et préparation des membranes totales par lyse mécanique	74
II.3.2 - Extraction et purification des radeaux lipidiques ou DRM (Detergent Resistant Membrane)	74

III - Techniques de biologie cellulaire..... 75

III.1 - Conditions de culture des cellules eucaryotes	75
III.2 - Différenciation cellulaire des lignées myéloïdes HL-60, U937 et THP1	76
III.3 - Cytométrie en flux	77
III.3.1 - Principe	77
III.3.2 - Etude de l'expression de différents CD	78
III.3.3 - Etude de la viabilité cellulaire.....	78
III.4 - Infection des cellules eucaryotes par <i>P. aeruginosa</i>	79
III.5 - Mesure du clivage du CCF2/AM, substrat de la β -lactamase, par cytométrie en flux ou par spectrofluorimétrie.....	79
III.6 - Molécules testées dans l'étude de la susceptibilité à l'injection des toxines par le SST3.....	80
III.7 - Mesure de l'association des bactéries aux cellules par cytométrie en flux.....	82
III.8 - Mesure de l'association des bactéries aux cellules par protection à la gentamycine	83
III.9 - « Panning » des cellules avec des anticorps.....	83
III.10 - Traitement des cellules en présence de SAB ou OVA.....	84
III.11 - Inhibition de l'inflammasome en présence de KCl.....	84



RESULTATS 85

I - Détection de l'injection des toxines dans les cellules cibles..... 86

I.1 - La β -lactamase comme rapporteur de l'injection de toxines	86
I.1.1 - Utilisation du système rapporteur β -lactamase/CCF2.....	86
I.1.2 - Le système β -lactamase/CCF2 appliqué à <i>P. aeruginosa</i>	90
I.2 - Analyse par cytométrie en flux	92
I.2.1 - Optimisation des conditions de chargement en CCF2.....	93
I.2.2 - Réglage des compensations	94
I.2.3 - Mise en évidence de l'injection d'ExoS-Bla par le SST3 de <i>P. aeruginosa</i> ...	96
I.3 - Discussion.....	98

II - Etude de l'injection d'ExoS-Bla par le SST3 de *P. aeruginosa* dans différentes lignées cellulaires 100

II.1 - Les cellules sensibles à l'injection d'ExoS-Bla	100
II.2 - Les cellules résistantes à l'injection	101
II.2.1 - Les cellules myéloïdes HL-60, U937 et THP1	101
II.2.2 - Caractérisation de la lignée cellulaire HL-60.....	103
II.2.2.1 - Le niveau de différenciation des cellules HL-60 conditionne la susceptibilité à l'intoxication par ExoS-Bla	105
II.2.2.2 - Effet de la MOI sur l'injection d'ExoS-Bla	108
II.2.2.3 - Viabilité des cellules HL-60 après infection	109
II.2.3 - Susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla des cellules U937 et THP1	110
II.3 - L'induction du SST3 de <i>P. aeruginosa</i> est identique suite au contact avec les cellules HL-60 non différenciées ou différenciées.....	113
II.4 - Adhérence de <i>P. aeruginosa</i> aux cellules HL-60.....	115
II.5 - Discussion	117

III - Insertion du translocon dans les membranes plasmiques des cellules HL-60..... 119

III.1 - Le translocon est présent dans les membranes des cellules HL-60 ND résistantes à l'injection de toxines	119
III.2 - Présence du translocon dans les radeaux lipidiques des cellules HL-60	123
III.3 - Rôle des céramides des radeaux lipidiques dans l'injection de toxines.....	127
III.4 - Discussion	128

IV - L'injection d'ExoS-Bla par le SST3 de *P. aeruginosa* est régulée par un mécanisme dépendant de la cellule cible 132

IV.1 - La dynamique de l'actine.....	132
IV.2 - Les intégrines et les adhérences focales	134
IV.3 - Les petites protéines G.....	137
IV.4 - Les kinases Scr et PI3K	139
IV.5 - Effets des inhibiteurs de l'injection de toxines dans la lignée U937	141
IV.6 - Contrôle de l'effet des inhibiteurs sur le clivage du CCF2, l'induction du SST3 et l'insertion du translocon.....	142
IV.7 - Rôle de l'inflammasome dans l'injection de toxines.....	145
IV.8 - Discussion.....	147

V - Acquisition de la sensibilité à l'injection des cellules HL-60 ND 149

V.1 - Sensibilité des cellules HL-60 ND à l'injection de toxines en absence de SVF..	150
--	-----

V.2 - Le « panning » des cellules HL-60 ND induit la susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla	154
V.3 - Discussion	156

CONCLUSION et PERSPECTIVES 159

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 165

ARTICLE ACCEPTE 193

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : La bactérie <i>P. aeruginosa</i>	16
Figure 2 : Les deux types d'infections induites par <i>P. aeruginosa</i> (Williams et al., 2010).....	18
Figure 3 : Espèces bactériennes colonisant les poumons suivant l'âge de patients atteints de mucoviscidose... 20	
Figure 4 : Les principaux facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i>	21
Figure 5 : Les systèmes de sécrétions de <i>P. aeruginosa</i> (Bleves et al., 2010)	25
Figure 6 : Le SST3 de <i>P. aeruginosa</i> avant et après un contact avec la cellule cible	29
Figure 7 : Les exotoxines injectées par le SST3 de <i>P. aeruginosa</i> (Hauser, 2009)	34
Figure 8 : Effets des exotoxines du SST3 de <i>P. aeruginosa</i> sur les cellules eucaryotes cibles (Engel and Balachandran, 2009)	37
Figure 9 : Induction du SST3 de <i>P. aeruginosa</i> (Hauser, 2009).....	40
Figure 10 : Mécanisme d'invasion de <i>P. aeruginosa</i> dans les cellules épithéliales	44
Figure 11 : Induction de la production de ROS dans les macrophages infectés par <i>P. aeruginosa</i> (Kannan et al., 2008).	48
Figure 12 : Principaux TLRs et signalisations impliqués dans la reconnaissance des facteurs de virulence de surface de <i>P. aeruginosa</i> (Kipnis et al., 2006).....	51
Figure 13 : Signalisation intracellulaire induite par l'interaction entre <i>YadA</i> , l'invasine de <i>Yersinia</i> et les intégrines $\beta 1$ de la cellule cible (Uliczka et al., 2009).....	54
Figure 14 : Mécanisme d'enrichissement et de regroupement des radeaux lipidiques des cellules eucaryotes après une infection par <i>P. aeruginosa</i> (Gulbins et al., 2004)	56
Figure 15 : Rôle de la flagelline et des systèmes de sécrétion de type 3 et 4 dans la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 par les cellules cibles via l'activation de l'inflammasome NLRC4 (<i>Ipaf</i>) et de TLR5 (Miao et al., 2007).	60
Figure 16 : Induction de la fonctionnalité du translocon du SST3 de <i>Yersinia</i> (Mejia et al., 2008).....	64
Figure 17 : Principe de la cytométrie en flux	77
Figure 18 : Le CCF2/AM.....	88
Figure 19 : Mesure du spectre d'émission des cellules HL-60 et HL-60-Bla incubées en présence de CCF2....	89
Figure 20 : Les toxines chimériques <i>ExoS-Bla</i> et <i>ExoY-Bla</i>	91
Figure 21 : Utilisation du système CCF2/ β -lactamase pour l'étude de l'injection de toxines de <i>P. aeruginosa</i> dans les cellules eucaryotes	92
Figure 22 : Détermination des conditions de chargement des cellules HL-60 en CCF2.....	93
Figure 23 : Mise au point de la compensation de la fluorescence du CCF2 par cytométrie en flux	95
Figure 24 : Mise en évidence de l'injection d' <i>ExoS-Bla</i> dans les cellules épithéliales A549.....	97
Figure 25 : Susceptibilité à l'injection d' <i>ExoS-Bla</i> de différents types cellulaires.....	101
Figure 26 : Situation des cellules HL-60, U937 et THP1 par rapport à la différenciation hématopoïétique....	102
Figure 27 : Différenciation des cellules HL-60, U937 et THP1	103
Figure 28 : Expression de CD11b à la surface des cellules HL-60 non différenciées ou différenciées en DMSO, VitD3 ou PMA.....	104
Figure 29 : Viabilité des cellules HL-60 après différenciation.....	105
Figure 30 : Susceptibilité des cellules myéloïdes HL-60 ND ou D à l'injection d' <i>ExoS-Bla</i>	106
Figure 31 : Cinétique de différenciation et d'injection d' <i>ExoS-Bla</i> dans les cellules HL-60 VitD3.....	106
Figure 32 : Susceptibilité des cellules HL-60 à l'injection d' <i>ExoS-Bla</i> et d' <i>ExoY-Bla</i>	108
Figure 33 : Effet de la MOI sur la susceptibilité à l'injection d' <i>ExoS-Bla</i> dans les cellules HL-60 ND ou HL-60 VitD3.....	108
Figure 34 : Viabilité des cellules HL-60 après infection	109
Figure 35 : Expression de CD11b à la surface des cellules U937 et THP1 non différenciées ou différenciées en VitD3 ou PMA.....	111
Figure 36 : Susceptibilité à l'injection d' <i>ExoS-Bla</i> et d' <i>ExoY-Bla</i> des cellules U937 et THP1 non différenciées ou différenciées.	112
Figure 37 : Induction du SST3 de <i>P. aeruginosa</i> en présence d'EGTA et des cellules HL-60 ND ou HL-60 VitD3.....	114
Figure 38 : Association de la souche CHA pX2gfp aux cellules HL-60	115
Figure 39 : Profil de migration des membranes purifiées de cellules HL-60 par flottaison sur gradient discontinu de sucrose.....	120
Figure 40 : Présence des protéines du translocon dans les membranes plasmiques des cellules HL-60.	120
Figure 41 : La présence du translocon dans les membranes des cellules HL-60 n'est pas due à des bactéries contaminantes.	122
Figure 42 : La quantité de translocon inséré varie suivant la souche utilisée.....	123
Figure 43 : La déplétion en cholestérol des cellules HL-60 diminue la susceptibilité à l'injection des toxines	125

Figure 44 : Présence de PopB dans les radeaux lipidiques des cellules HL-60.....	126
Figure 45 : Les céramides ne sont pas nécessaires à l'injection d'ExoS-Bla par le SST3 de <i>P. aeruginosa</i> dans les cellules HL-60.....	128
Figure 46 : Rôle de l'actine dans l'injection de toxines par <i>P. aeruginosa</i>	133
Figure 47 : La dynamique de formation du réseau d'actine est nécessaire à l'injection d'ExoS-Bla.....	134
Figure 48 : Rôle des intégrines et des FAKs dans l'injection de toxines.....	135
Figure 49 : Les intégrines ne sont pas nécessaires pour induire l'injection d'ExoS-Bla.....	135
Figure 50 : Inhibition et expression de Pyk2 dans les cellules HL-60 VitD3.....	136
Figure 51 : Rôle des GTPases Rho, Rac et cdc42 dans l'injection des exotoxines par <i>P. aeruginosa</i>	137
Figure 52 : Rôle des petites protéines G dans l'injection d'ExoS-Bla.....	138
Figure 53 : Le blocage de la kinase ROCK n'a pas d'effet sur l'injection d'ExoS-Bla.....	138
Figure 54 : Implication des kinases Scr, des PI3K et des tyrosines kinases dans l'injection des exotoxines par <i>P. aeruginosa</i>	139
Figure 55 : Le blocage des tyrosines kinases, Src kinases et PI3K inhibe l'injection d'ExoS-Bla.....	140
Figure 56 : Inhibition de l'injection d'ExoS-Bla et expression de Pyk2 dans les cellules U937 VitD3.....	142
Figure 57 : Les inhibiteurs testés ne perturbent ni le chargement ni le clivage du CCF2 dans les cellules HL-60-Bla.....	143
Figure 58 : Les inhibiteurs de l'injection ne bloquent pas la sécrétion d'ExoS-Bla par le SST3 de <i>P. aeruginosa</i>	144
Figure 59 : Les inhibiteurs de l'injection de toxines ne perturbent pas l'insertion de PopB dans les membranes plasmiques.....	145
Figure 60 : Le blocage de l'activation de la caspase-1 n'a aucun effet sur la susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla dans les cellules HL-60 VitD3.....	146
Figure 61 : Une sortie d'ions K ⁺ des cellules HL-60 VitD3 n'est pas nécessaire pour induire l'injection d'ExoS-Bla.....	146
Figure 62 : L'absence de SVF dans le milieu de culture rend les cellules HL-60 ND sensibles à l'injection d'ExoS-Bla.....	150
Figure 63 : Réversibilité de la susceptibilité des cellules HL-60 ND à l'injection d'ExoS-Bla en absence de SVF.....	152
Figure 64 : Effet de la BSA et de l'OVA sur la susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla des cellules HL-60.....	153
Figure 65 : Le « panning » des cellules HL-60 ND induit la susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla.....	155
Figure 66 : Mécanisme d'injection des exotoxines par le SST3 de <i>P. aeruginosa</i> dans les cellules myéloïdes HL-60 et U937 différenciées.....	161

Tableau 1 : Souches bactériennes utilisées dans cette étude.....	68
Tableau 2 : Plasmides utilisés dans cette étude.....	69
Tableau 3 : Composition des gels d'acrylamide.....	72
Tableau 4 : Anticorps utilisés dans cette étude.....	73
Tableau 5 : Les différentes lignées cellulaires utilisées. ATCC : American Type Culture Collection, ECACC : European Collection of Cell Cultures.....	76
Tableau 6 : Inhibiteurs et anticorps testés dans l'étude de la susceptibilité des cellules à l'injection de toxines par le SST3.....	82
Tableau 7 : Détermination du nombre de bactéries associées aux cellules HL-60.....	116

Remerciements

Mes premiers remerciements se dirigent tout naturellement à mon encadrant de thèse, François Cretin pour m'avoir supporté pendant près de cinq ans entre le Master et le doctorat. Merci de m'avoir transmis ton savoir-faire, ta patience et ta rigueur que j'essaie de mettre en œuvre à chaque moment.

Merci Marie-Josèphe Rabiet pour avoir tout mis en œuvre pour que j'obtienne une bourse d'allocation de recherche, ainsi que pour tous tes conseils et ton soutien. Merci à la région Rhône-Alpes de m'avoir accordé cette allocation de recherche. J'ai pu grâce à vous suivre mes rêves.

François Boulay, directeur au moment de mes débuts de thèse, je voulais te remercier pour m'avoir accueilli dans le laboratoire et pour les nombreuses discussions que nous avons eues. Je remercie aussi Ina Attree, directrice actuelle de l'équipe pour tous tes conseils, ton aide et ta bonne humeur.

Encore des mercis à Michel Ragno pour toutes les discussions scientifiques et les bons moments de rigolades. Cédric, Benjamin, Martial, j'ai passé de supers moments avec vous. Bon courage les vieux « pouères » pour le futur !

De nombreux remerciements sont adressés à Véronique Colin-Faure, gardienne de la station de cytométrie en flux. Merci Véro pour ta disponibilité sans faille et pour les bons moments passés pendant les acquisitions du Moflo.

Comment pourrais-je oublier ma Julie... Merci pour ton aide, ta générosité et tes conseils. Tu as su me supporter dans mes moments de doutes, m'encourager et me relever. Je te déclare également meilleure « Wordwoman » de l'année car grâce à toi, j'ai gagné un précieux temps de rédaction. Je te souhaite toute la réussite que tu mérites pour ta thèse et pour la suite de ta grande carrière de chercheuse, tu vas réussir j'en suis certain ! Maintenant, tu vas pouvoir enfin arrêter de rêver de ma thèse...

Evelyne, je voulais te remercier pour m'avoir toujours bien conseillé et aidé quand j'en avais besoin.

Merci à ma famille qui a cru en moi et qui m'a laissé réaliser mes rêves jusqu'au bout. Merci à ma chienne Canaille qui a bien voulu me promener et jouer avec moi pour me remonter le moral. Merci à la pêche à la mouche qui a su me déconnecter les neurones pour éviter une explosion cérébrale.

Je souhaite remercier enfin tous les membres de l'équipe, ceux présents, comme ceux qui n'étaient que de passage, merci pour vos conseils, pour votre bonne humeur et pour ces sympathiques pauses cafés passées dans les couloirs du bâtiment C3.

INTRODUCTION

I - La bactérie opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*

I.1 - Environnement et mode de vie

Pseudomonas aeruginosa est appelé plus communément « bacille pyocyanique » (Figure 1). Ce bacille, de 1 à 5 μm de long est une bactérie Gram négative, ubiquiste de l'environnement qui possède un seul flagelle polaire (monotriche). Son métabolisme est de type respiratoire aérobie et peut utiliser un grand nombre de substrats carbonés. Elle peut toutefois survivre dans un milieu anaérobie en utilisant les nitrates comme accepteur terminal d'électrons. *P. aeruginosa* est une bactérie mésophile capable de se développer dans une plage de température allant de 4 °C à 45 °C. La température optimale de croissance se situe entre 30 °C et 37 °C. Elle tolère également des variations du pH de l'environnement.

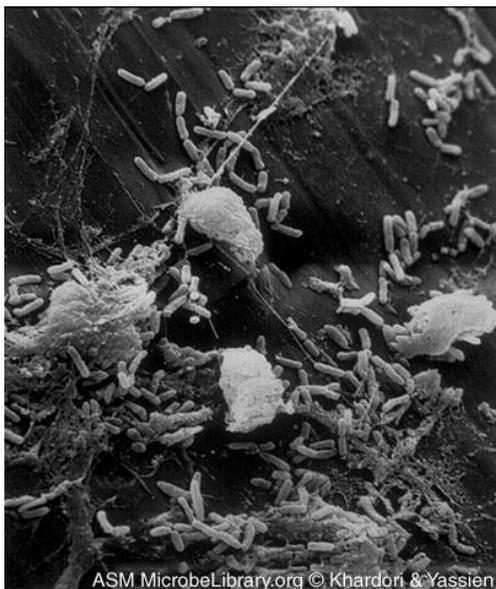


Figure 1 : La bactérie *P. aeruginosa*
Photo de microscopie électronique à balayage de *P. aeruginosa* sur un cathéter en présence de leucocytes.

La capacité à coloniser des niches écologiques très variées traduit l'important potentiel adaptatif de *P. aeruginosa*. En effet, cette bactérie est présente aussi bien dans les eaux douces, dans les sols, sur les végétaux que dans les intestins et sur la peau de l'Homme et des animaux (Green *et al.*, 1974). Avec un génome conséquent de plus de 6 Mb (Stover *et al.*, 2000) *P. aeruginosa* est capable de métaboliser un grand nombre de substrats différents et synthétise également de nombreux facteurs de virulences solubles et

membranaires favorisant son implantation dans l'environnement, lui conférant ainsi une grande adaptabilité.

P. aeruginosa est mobile mais peut devenir adhérente notamment grâce à son flagelle et aux pili. Une fois fixé et quand les conditions le permettent, *P. aeruginosa* perd sa mobilité et adopte un mode de vie dite « communautaire ». Les bactéries se regroupent sous forme de biofilm riche en exopolysaccharides et en protéases, et acquièrent parfois un phénotype mucoïde. Cette véritable barrière de protection empêche la diffusion de molécules comme les antibiotiques et altère la réponse immunitaire de l'hôte en bloquant l'activité phagocytaire des neutrophiles (Lyczak *et al.*, 2002).

I.2 - Les infections dues à *P. aeruginosa*

P. aeruginosa peut infecter les plantes, les insectes comme la drosophile ainsi que les animaux et l'Homme (Apidianakis and Rahme, 2009; D'Argenio *et al.*, 2001; Rahme *et al.*, 1995). En Europe, *P. aeruginosa* est le 3^{ème} pathogène responsable d'infections nosocomiales. Il est décrit comme étant un pathogène opportuniste qui infecte essentiellement les personnes dont la protection immunitaire est affaiblie localement (opérations chirurgicales, brûlures, etc...) ou de façon systémique (cancers, SIDA, etc...) et les patients atteints de mucoviscidose. Selon les facteurs de virulence exprimés par la bactérie et l'efficacité de la réponse immunitaire de l'hôte, deux types d'infection à *P. aeruginosa* sont constatées : les infections aiguës et les infections chroniques (*Figure 2*) (Hauser *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2010).

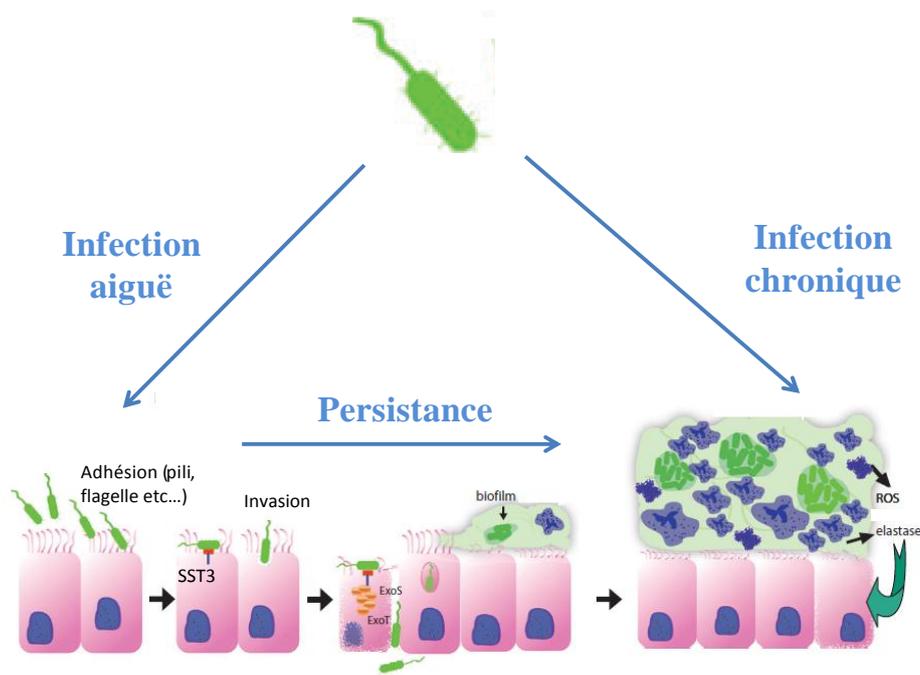


Figure 2 : Les deux types d'infections induites par *P. aeruginosa* (Williams et al., 2010)

I.2.1 - Infections aiguës

Ces infections sont transitoires et caractérisées par une forte multiplication bactérienne. Elles sont généralement associées à des souches dont le mode de vie est planctonique. Ces souches expriment des molécules adhésives telles que les pili et le flagelle, sécrètent des molécules toxiques par différents systèmes de sécrétions (protéases, phospholipases etc...) et injectent des protéines effectrices (ExoS, ExoT etc...) via le système de sécrétion de type 3 (SST3). La progression dans les tissus de l'hôte est rapide et induit la mort des cellules cibles. Des inflammations aiguës de la cornée (kératites) et de la vessie sont entre autre observées. Des infections aiguës de l'arbre respiratoire (pneumopathies) en milieux hospitaliers sont très représentées et peuvent conduire à une septicémie. Suivant le statut immunitaire du patient, la persistance de la bactérie peut conduire à des infections chroniques.

I.2.2 - Infections chroniques

Ce type d'infection persiste pendant toute la vie du patient si les mécanismes de défense sont altérés. Les grands brûlés ou personnes hospitalisées en unités de soins intensifs

soumis à des explorations invasives multiples (tubage endotrachéal, cathéter veineux, sondage urinaire,...), les malades cancéreux ou leucémiques (Rolston and Bodey, 1992) ou atteints d'infections virales chroniques par le VIH sont les plus exposés. Dans le cas des personnes atteintes de mucoviscidose, *P. aeruginosa* adopte parfois un phénotype mucoïde conduisant à la formation de biofilms qui lui confère une résistance accrue aux antibiotiques ainsi qu'aux réponses immunitaires. Elle perd sa mobilité et l'expression de certains facteurs de virulence (système de sécrétion de type 3, flagelle, pili etc ...) est diminuée. Une destruction lente mais progressive du tissu est observée.

I.2.3 - *P. aeruginosa* et la mucoviscidose

La mucoviscidose est la maladie génétique à transmission autosomique récessive la plus fréquemment rencontrée dans la population caucasienne. Un dysfonctionnement des glandes de sécrétion muqueuses et séreuses conduit à la production de sécrétions visqueuses insuffisamment hydratées (d'où le nom donné à la maladie, « mucus visqueux »).

La protéine impliquée dans la maladie est la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Cette protéine est localisée sur les membranes des cellules épithéliales des voies aériennes, intestinales, reproductrices, ainsi que sur les glandes sudoripares, pancréatiques et salivaires. Le CFTR est un canal de régulation du passage des ions chlorure à travers la membrane des cellules épithéliales (Quinton, 1983), mais il agit également comme un régulateur de conductibilité et exerce une influence modulatrice sur de nombreux autres canaux ioniques tels que le canal à Na⁺ des cellules épithéliales, et les mécanismes d'exportation de l'ATP (Briel *et al.*, 1998; Sugita *et al.*, 1998).

Parmi les 1500 mutations affectant le gène *cftr*, la plus répandue est la mutation $\Delta F508$ (délétion de la phénylalanine en position 508). Elle représente environ 70 % des mutations recensées (Kerem *et al.*, 1989). On estime qu'approximativement la moitié des patients atteints de mucoviscidose (CF) sont homozygotes pour la mutation $\Delta F508$ associée à une forme grave de la maladie et que plus de 90% de patients CF ont au moins un allèle $\Delta F508$. Un dysfonctionnement du CFTR engendre une mauvaise hydratation des sécrétions. Pour la plupart des patients, l'obstruction des canaux pancréatiques aboutit à un déficit sécrétoire pancréatique conduisant à des fibroses du pancréas. L'obstruction des canaux biliaires perturbe le fonctionnement du foie et de la digestion. Une stérilité due à l'atrésie des canaux déférents est observée chez 95% des hommes.

Dans le poumon, le défaut dans le transport des ions chlorure induit une déshydratation et un épaissement du mucus. Chez un patient atteint de mucoviscidose, le battement des cils des cellules de l'épithélium pulmonaire est bloqué par la trop grande viscosité du mucus. Les bactéries stagnent puis prolifèrent sur la paroi bronchique (Hauser *et al.*, 2011; Lyczak *et al.*, 2002).

La colonisation des poumons par des bactéries a lieu dès l'enfance. La population de bactéries varie au cours de la vie du patient (Figure 3). Au stade précoce de la maladie, les bactéries retrouvées sont *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae*. Mais vers l'âge de 10 ans, *Pseudomonas aeruginosa* infecte environ 80 % des patients de façon définitive (Aebi *et al.*, 1995; Campodonico *et al.*, 2008).

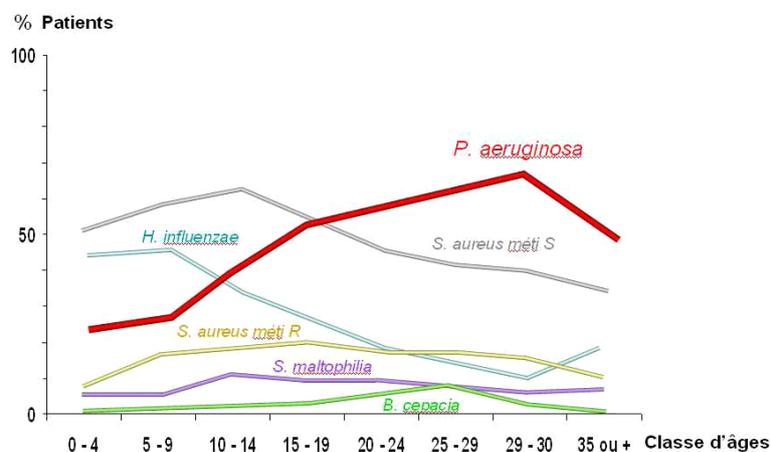


Figure 3 : Espèces bactériennes colonisant les poumons suivant l'âge des patients atteints de mucoviscidose
(Observatoire National de la mucoviscidose – Bilan des données 2004, Vaincre la mucoviscidose)

La colonisation des poumons par *P. aeruginosa* induit la production de nombreuses cytokines inflammatoires par les cellules épithéliales. Un afflux très important de neutrophiles polymorphonucléaires (PMNs) et de macrophages alvéolaires qui produisent en grandes quantités des molécules anti-microbiennes comme les défensines et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) est observé. La conversion des souches de *P. aeruginosa* vers un phénotype dit mucoïde et la présence de biofilm sont des facteurs aggravants de l'infection en augmentant la résistance aux antibiotiques et en perturbant les réponses immunitaires (Hauser *et al.*, 2011; Pedersen *et al.*, 1992). Une réaction inflammatoire chronique exacerbée est observée conduisant progressivement à la destruction des parois bronchiques et à une insuffisance respiratoire grave.

I.3 - Les facteurs de virulence de *P. aeruginosa*

Les facteurs de virulence sont des molécules qui permettent à la bactérie de coloniser et de se multiplier dans des microenvironnements différents nécessaires à sa survie. *P. aeruginosa* est une bactérie qui possède un véritable arsenal de facteurs de virulence. Ce pathogène présente des facteurs de virulence situés à la surface de la membrane, des facteurs de virulence sécrétés dans le milieu et certains sont injectés dans les cellules cibles (*Figure 4*) (Kipnis *et al.*, 2006; Sadikot *et al.*, 2005).

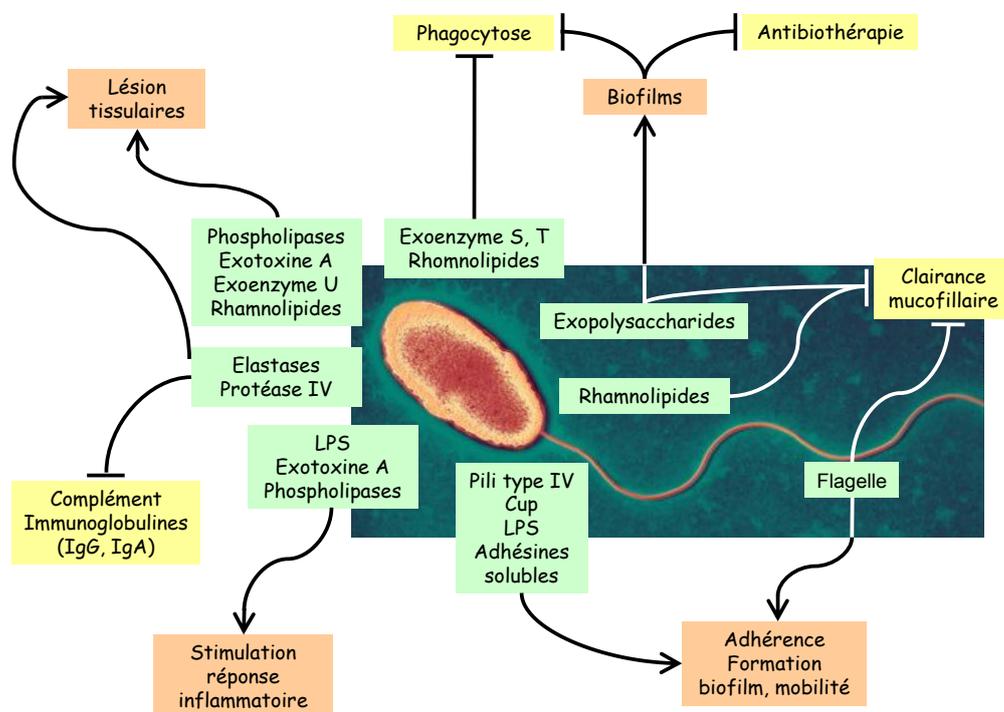


Figure 4 : Les principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa*

Les différents facteurs de virulence de *P. aeruginosa* (vert), ce qu'ils activent (orange) et ce qu'ils bloquent (jaune) in vivo.

I.3.1 - Les facteurs de virulence de surface

Les molécules situées à la surface de *P. aeruginosa* jouent un rôle majeur dans l'adhérence des bactéries aux tissus. Cette étape est nécessaire pour coloniser l'hôte.

I.3.1.1 - Le flagelle

P. aeruginosa possède un seul flagelle situé sur une des extrémités de la bactérie (monotriche). C'est une organelle protéique complexe située à la surface de la bactérie et composée d'une vingtaine de protéines. Il est indispensable pour la mobilité de *P. aeruginosa* dans un milieu liquide ou solide et intervient également dans l'adhérence aux cellules lors de la colonisation des tissus par la bactérie en liant les TLR5 et TLR2 (Toll-Like Receptor) et des résidus glucidiques du ganglioside asialo GM1 (aGM1). L'engagement de ces TLRs induit l'activation du facteur de transcription NFκB (Nuclear Factor-κ B) et la mise en place d'une réponse immunitaire de type pro-inflammatoire caractérisée par la production de cytokines et le recrutement des neutrophiles et des macrophages alvéolaires sur le lieu de l'infection (Adamo *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 2009; Skerrett *et al.*, 2007). L'absence de flagelle diminue drastiquement la susceptibilité des souris aux infections pulmonaires (Feldman *et al.*, 1998). Les expériences menées par O'Toole ont montré que le flagelle est aussi extrêmement important dans la mise en place du biofilm (O'Toole and Kolter, 1998).

I.3.1.2 - Les pili

On distingue les pili de type IV et les fimbriae retrouvés en quantité importante à la surface de *P. aeruginosa*. Ce sont des appendices protéiques plus court et moins épais que le flagelle. Ils permettent l'adhérence et la mobilité de la bactérie sur une surface solide par un mécanisme appelé « twitching » caractérisé par des mouvements de rétractions des pili (Mattick, 2002). Indépendamment du flagelle, les pili ont également un rôle important dans l'attachement de la bactérie aux cellules eucaryotes ainsi que dans la mise en place du biofilm. Des souches dépourvues de piline adhèrent moins efficacement aux cellules épithéliales (Comolli *et al.*, 1999). Le pili de type IV lie spécifiquement la séquence disaccharide GalNAcβ(1-4)Gal commune aux deux gangliosides asialo-GM1 et asialo-GM2 à la surface des cellules épithéliales pulmonaires augmentant la capacité de fixation de *P. aeruginosa* (de Bentzmann *et al.*, 1996; Imundo *et al.*, 1995; Sheth *et al.*, 1994). L'absence de piline telles que les sous unités PilA, PilB et PilT bloque ou retarde l'injection de la toxine ExoS dans les cellules épithéliales HeLa. Leur absence n'empêche cependant pas la sécrétion des effecteurs dans le milieu extracellulaire (Sundin *et al.*, 2002).

I.3.1.3 - Le lipopolysaccharide (LPS)

Le LPS est situé dans la membrane externe des bactéries Gram négatives. Il représente environ 20% du poids de la membrane externe de *P. aeruginosa*.

Le LPS est composé de trois parties distinctes :

- Le lipide A peu variable ancré dans la membrane plasmique
- Le core composé de motifs polysaccharidiques conservés
- La partie oligosaccharidique, appelé antigène O, variable est très antigénique et immunogène. Elle permet le sérotypage des souches de *P. aeruginosa*.

Le LPS est impliqué dans l'adhérence de la bactérie en se fixant au CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), au TLR4 et à l'aGM1 des cellules épithéliales pulmonaires (Kipnis *et al.*, 2006). Les bactéries qui ont adhéré aux cellules épithéliales pulmonaires sont normalement évacuées par clairance muco-ciliaire qui est l'une des composantes de la défense de l'hôte contre le pathogène.

La liaison du LPS avec le TLR4 entraîne l'activation de la voie NFκB et le déclenchement de réponses pro-inflammatoires comme la sécrétion de cytokines telles que l'IL-6 et l'IL-8 (Pier, 2007). Il a également été montré que la liaison du LPS de *P. aeruginosa* au CFTR permet l'internalisation de bactéries dans les cellules épithéliales pulmonaires. La protéine CFTR sauvage permet l'internalisation de 50 fois plus de bactéries que la protéine CFTR ΔF508 (Pier *et al.*, 1997). Plus récemment, des études ont indiqué qu'un dysfonctionnement de la protéine CFTR diminuait drastiquement l'activité bactéricide dans les macrophages (Del Porto *et al.*, 2011; Di *et al.*, 2006).

Des modifications de la composition du LPS ont été observées sur des souches de *P. aeruginosa* isolées de personnes atteintes de mucoviscidose. En effet, la majeure partie des souches mucoïdes issues d'infections chroniques ne possèdent pas d'antigène O (Hancock *et al.*, 1983). Ce domaine étant très immunogène, son absence permet à la bactérie d'échapper aux mécanismes de reconnaissance immunitaire. Plus récemment, des modifications du lipide A ont été recensées. Le LPS de souches issues de patients atteints de mucoviscidose possèdent un groupement palmitate supplémentaire ainsi qu'un aminoarabinose ce qui a pour effet de diminuer les réponses inflammatoires et d'augmenter la capacité de résistance aux peptides antimicrobiens et aux antibiotiques (Cigana *et al.*, 2009; Ernst *et al.*, 2007).

I.3.1.4 - Les lectines

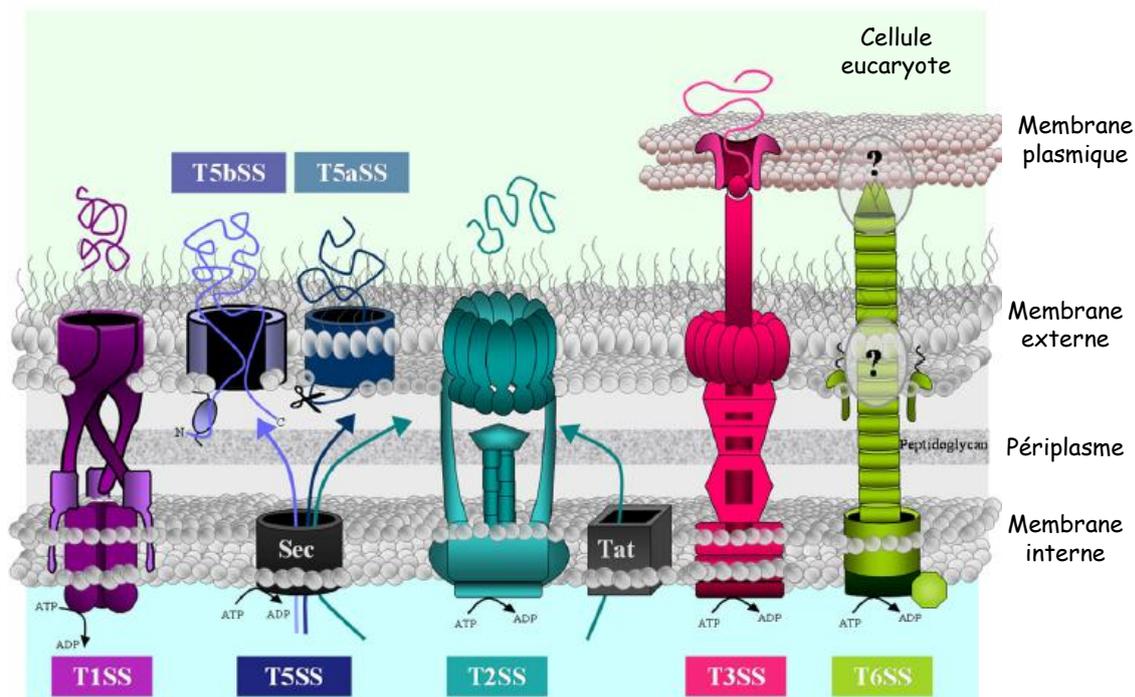
La lectine PA-IL (ou LecA) montre une spécificité pour le galactose alors que PA-III (ou LecB) a une très forte affinité pour le fucose (Gilboa-Garber, 1982). Les deux protéines sont présentes dans le cytoplasme de la bactérie mais PA-III a été également retrouvée sur la surface de la membrane externe de la bactérie (Tielker *et al.*, 2005).

Des souches dépourvues de ces lectines perdent leur capacité d'adhérence et de cytotoxicité envers des cellules épithéliales pulmonaires A549 (Chemani *et al.*, 2009). *In vivo*, elles favoriseraient la dissémination des bactéries dans l'organisme et perturberaient la perméabilité de la barrière intestinale, la perméabilité des capillaires du tissu pulmonaire ainsi que la clairance des bactéries dans les poumons (Chemani *et al.*, 2009; Laughlin *et al.*, 2000). Les lectines PA-IL et PA-III sont connues pour leur capacité à diminuer la fréquence de battements ciliaires des cellules pulmonaires humaines (Adam *et al.*, 1997; Bajolet-Laudinat *et al.*, 1994). L'utilisation de sucres ou de ses dérivés tels que le N-acetylglucosamine (GlcNAc), le N-acetylgalactosamine (GalNAc) mais également le glucosamine, le galactosamine, le fucose, le mannose et le galactose permet de bloquer les effets toxiques induits par ces lectines (Chemani *et al.*, 2009; Rebiere-Huet *et al.*, 2004).

I.3.1.5 - Les systèmes de sécrétion de *P. aeruginosa*

Une importante partie des facteurs de virulence de *P. aeruginosa* est exportée dans le milieu extracellulaire par différentes machineries protéiques. Certains sont injectés/transloqués dans le cytoplasme des cellules cibles (*Figure 5*). *P. aeruginosa* possède tous les systèmes de sécrétions (SST) identifiés chez les bactéries Gram négatives sauf le SST4, ce qui lui confère une adaptabilité très importante dans son environnement (Filloux, 2011; Kipnis *et al.*, 2006).

Les SST1, SST3 et SST6 franchissent les deux membranes des bactéries et permettent une sécrétion des toxines à l'extérieur de la bactérie. Le fonctionnement du SST2 et SST5 nécessite deux étapes : une première étape commune de sécrétion des substrats dans le périplasme par deux systèmes différents appelés Sec (ou GSP pour General Secretion Pathway) ou Tat (Twin Arginine Translocation). La seconde étape permet le franchissement de la membrane externe (Filloux, 2011).



P. aeruginosa

Figure 5 : Les systèmes de sécrétions de *P. aeruginosa* (Bleves et al., 2010)

P. aeruginosa possède quatre **SST1** dont les substrats sécrétés ont été identifiés pour deux de ces systèmes. Ils permettent notamment la sécrétion de la protéase alcaline AprA et de la lipase LipA (Filloux, 2011).

Deux **SST2** sont retrouvés dans *P. aeruginosa*, les systèmes Xcp et Hcx (Filloux, 2011). Le transport des élastases LasA et LasB, de l'exotoxine A et de différentes lipases et phospholipases est effectué par le SST2.

Le **SST5** permet la sécrétion de l'estérase EstA, de la protéase LepA, ou de l'adhésine et d'une ou plusieurs CupB5 dans le milieu extracellulaire.

Le **SST6** a été découvert pour la première fois dans la bactérie pathogène *Vibrio cholerae*. Trois SST6 potentiels ont été retrouvés chez *P. aeruginosa* codés par les loci HSI-I à III (Hcp Secretion Island) (Mougous et al., 2006). Jusqu'à présent, seul HSI-I semble être impliqué dans la virulence lors des infections chroniques des patients atteints de mucoviscidose. Récemment, il a été montré que ce système sécrétait trois protéines Tse1, Tse2 et Tse3 ayant des effets bactéricides (Hood et al., 2010; Russell et al., 2011).

Le **SST3** permet l'injection directe d'effecteurs dans le cytoplasme des cellules cibles eucaryotes. Ce système sera détaillé dans la partie I.3.3 de l'introduction.

I.3.2 - Les principaux facteurs de virulence sécrétés par *P. aeruginosa*

Les molécules sécrétées par ces différents systèmes peuvent avoir des activités enzymatiques diverses. Elles modulent différents processus biologiques comme la réponse immunitaire, la toxicité cellulaire, l'inhibition de la phagocytose, etc... (Bleves *et al.*, 2010; Kipnis *et al.*, 2006).

L'**exotoxine A** (ExoA) est un facteur de virulence majeur qui est sécrété par le système de sécrétion de type II de *P. aeruginosa*. ExoA possède deux domaines dont l'un contient une activité ADP-ribosyltransférase (domaine A) et l'autre (domaine B) permet la fixation à CD91 (récepteur de l'alpha-2-macroglobuline) sur les cellules cibles (Kounnas *et al.*, 1992). L'interaction avec ce récepteur induit le clivage protéolytique du domaine B et l'internalisation dans la cellule hôte par endocytose du domaine catalytique. Le domaine catalytique ADP-ribosyle la lysine du facteur d'élongation EF-2 avec pour conséquences une inhibition de la synthèse protéique et la mort des cellules par nécrose (Iglewski and Kabat, 1975; Iglewski *et al.*, 1978; Wick *et al.*, 1990).

Les **élastases** LasA et LasB sont des métalloendoprotéases sécrétées par le système de sécrétion de type II qui dégradent l'élastine, la fibrine et le collagène, diminuant les propriétés élastiques du tissu pulmonaire (Heck *et al.*, 1986a; Heck *et al.*, 1986b; Kessler *et al.*, 1997). Chez le rat, les élastases de *P. aeruginosa* induisent également la production d'IL-8 après 4 h d'infection (Kon *et al.*, 1999).

LasB a été décrit pour augmenter la perméabilité de la barrière épithéliale pulmonaire par destruction des jonctions serrées des cellules épithéliales. Ceci permet la dissémination des bactéries dans les couches profondes des tissus tout en favorisant l'infiltration de neutrophiles. Cette protéase est connue également pour protéolyser les immunoglobulines telles que les IgA et les IgG (Heck *et al.*, 1990). LasA a été décrit pour induire le clivage (ou « shedding ») de l'ectodomaine du syndecan-1 à la surface des cellules épithéliales en activant des tyrosines kinases cellulaires (Park *et al.*, 2001).

Différentes lipases sont produites par *P. aeruginosa*. Les plus étudiées sont les **phospholipases C** (PLC) sécrétées par le système de sécrétion de type II. Leur activité est dépendante du Zn^{2+} . Trois PLC ont été décrites : PlcN, PlcH et PlcB (Barker *et al.*, 2004; Ostroff *et al.*, 1990). Toutes hydrolysent la phosphatidylcholine abondante dans le surfactant pulmonaire. PlcN peut également hydrolyser la phosphatidylsérine, PlcH la sphingomyéline et PlcB la phosphatidylethanolamine. La PlcH est une phospholipase hémolytique qui module

notamment la réponse oxydative et la production de cytokines (Konig *et al.*, 1997a; 1997b; Terada *et al.*, 1999).

I.3.2.1 - Autres molécules secrétées

Les **alginates** sont des exopolysaccharides constituant le biofilm des souches de *P. aeruginosa* mucoïdes. Ils sont très importants pour l'adhérence des bactéries aux tissus. Ils sont associés aux infections chroniques et leur présence dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose est un facteur aggravant (Pedersen *et al.*, 1992). Les alginates bloquent le recrutement des neutrophiles et des macrophages, la phagocytose et empêchent la diffusion des antibiotiques (Hentzer *et al.*, 2001; Krieg *et al.*, 1988; Pedersen *et al.*, 1990).

La **pyoverdine** est un sidérophore capable de chélater les ions fer dans l'environnement extracellulaire et de les transporter à l'intérieur des bactéries. *In vivo*, des souris infectées par des souches déficientes en pyoverdine ont une mortalité fortement diminuée par rapport aux souris infectées avec une souche sauvage (Meyer *et al.*, 1996; Takase *et al.*, 2000).

La **pyocyanine** est un pigment bleu/vert qui permet à *P. aeruginosa* de croître en anaérobiose. Elle est présente, voire surexprimée, dans les souches issues d'infections chroniques des voies respiratoires. Chez la souris, l'exposition à la pyocyanine permet le recrutement des macrophages alvéolaires et la polarisation d'une réponse lymphocytaire de type Th2 (Caldwell *et al.*, 2009). *In vitro*, la pyocyanine module la quantité de Ca²⁺ dans le cytoplasme des cellules cibles, perturbant la signalisation cellulaire (Denning *et al.*, 1998). Elle a été également décrite pour bloquer l'acidification des lysosomes des neutrophiles et induire un stress oxydatif entraînant leur mort par apoptose (Prince *et al.*, 2008). Elle régulerait l'expression de CFTR à la surface des cellules en bloquant la V-ATPase (Lau *et al.*, 2004).

I.3.3 - Le Système de Sécrétion de type 3 (SST3)

Le SST3 a été mis en évidence pour la première fois chez *Yersinia enterocolitica* (Michiels *et al.*, 1990). Il est synthétisé par différentes bactéries Gram négatives pathogènes pour l'Homme telles que *Shigella flexneri*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* entéropathogène (EPEC), *P. aeruginosa*, et pour

les plantes telles que *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum* et *Xanthomonas campestris*.

Appelé également injectisome, c'est une nanomachine protéique complexe qui permet l'injection de protéines effectrices ou exotoxines directement dans le cytoplasme des cellules cibles eucaryotes (Cornelis, 2006; Galan and Collmer, 1999). Le SST3 de *P. aeruginosa* a été découvert en 1996 (Yahr *et al.*, 1996). Plus de 40 gènes associés en plusieurs opérons sont nécessaires à la fonctionnalité du SST3.

La fonction du SST3 est différente d'une espèce à l'autre. Dans le cas de *Salmonella* et de *Shigella*, son rôle premier est d'induire l'internalisation des bactéries dans les cellules non phagocytaires, alors que dans le cas de *P. aeruginosa*, le SST3 bloque les processus phagocytaires, induit la mort cellulaire et permet la dissémination des bactéries dans l'organisme.

La présence du SST3 dans les souches de *P. aeruginosa* est de mauvais pronostic puisque les risques de mortalité sont augmentés d'un facteur six (Roy-Burman *et al.*, 2001). Il est majoritairement associé aux infections aiguës de la cornée, de la vessie ou dans certaines pneumopathies. La présence d'un SST3 fonctionnel induit une mortalité importante chez la souris et joue également un rôle important pour la dissémination du pathogène (Le Berre *et al.*, 2011). L'analyse de différentes souches de *P. aeruginosa* issues de patients atteints de mucoviscidose a montré que l'expression des éléments du SST3 (effecteurs et translocateurs) diminuait au cours de l'infection, laissant place à l'expression des alginate et des molécules du quorum sensing, très présentes lors des infections chroniques chez ces patients (Hauser *et al.*, 2011; Jain *et al.*, 2004). Des observations similaires ont été effectuées dans un modèle murin (Pierre *et al.*, 2008).

I.3.3.1 - Structure du SST3

La vision que l'on a actuellement du SST3 est celle d'une nanostructure composée de trois parties principales : 1/ le sécrétion (ou corps basal), 2/ l'aiguille et 3/ le translocon (*Figure 6*). Le SST3 peut se retrouver sous deux états d'activation : un état « latent » qui ne permet pas la sécrétion des protéines, et un état « activé » qui fait suite au contact avec la cellule cible et autorise la sécrétion des exotoxines (Cornelis, 2006; Mota, 2006).

En absence de stimulus, un faible nombre d'aiguilles est présent à la surface de la bactérie. Le contact avec la cellule cible induit l'expression des gènes du SST3 et permet l'assemblage de plusieurs injectisomes à la surface de la bactérie capables de sécréter des

exotoxines et des translocateurs PopB, PopD et PcrV, nécessaires à l'assemblage d'un pore dans les membranes plasmiques des cellules cibles.

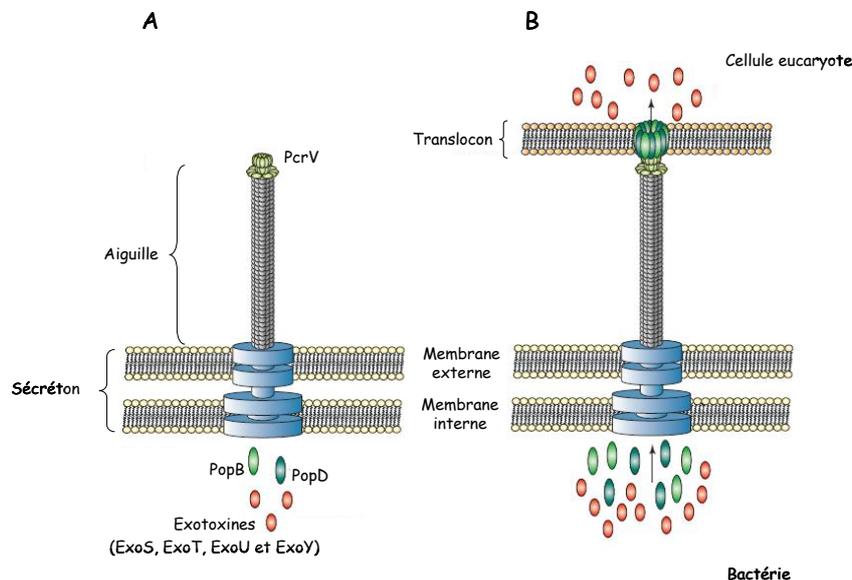


Figure 6 : Le SST3 de *P. aeruginosa* avant et après un contact avec la cellule cible

A. Le SST3 de *P. aeruginosa* est composé d'un sécréton (ou corps basal) traversant la membrane interne et externe de la bactérie, et de l'aiguille formée par l'oligomérisation d'une seule protéine PscF. Le sommet de l'aiguille est constitué de la protéine PcrV.

B. Suite au contact avec la cellule cible, les protéines PopB et PopD traversent l'aiguille, s'oligomérisent et forment un translocon à l'extrémité de l'aiguille. Cette structure en forme d'anneau s'insère dans la membrane des cellules eucaryotes. Le pore ainsi formé permet la translocation des protéines effectrices.

I.3.3.1.1 - Le corps basal ou sécréton

Le sécréton ou corps basal est formé de plusieurs structures annulaires insérées dans la membrane plasmique et externe de la bactérie. Il est composé d'une vingtaine de protéines différentes dont la plupart possèdent des homologies avec le corps basal du flagelle (Blocker *et al.*, 2003; Erhardt *et al.*, 2010).

Une ATPase, la protéine PscN de *P. aeruginosa* ou YscN de *Yersinia enterocolitica*, serait associée à la face cytoplasmique de ce sécréton et fournirait l'énergie nécessaire au fonctionnement de ce système de sécrétion (Blaylock *et al.*, 2006). Elle serait impliquée dans le processus de reconnaissance puis la dissociation des complexes chaperonnes/substrats et permettrait le dépliement puis l'export des substrats par l'injectisome (Akeda and Galan, 2005 ; Galan and Wolf-Watz, 2006).

I.3.3.1.2 - L'aiguille

L'aiguille est une structure supramoléculaire qui permet le passage des translocateurs et effecteurs du cytosol des bactéries jusqu'à l'environnement extracellulaire. L'aiguille du SST3 de *P. aeruginosa* est composée de polymères de la protéine PscF, formant un canal d'une longueur de 50 à 80 nm pour un diamètre interne de 8 nm (Pastor *et al.*, 2005). Ses homologues sont YscF de *Yersinia pestis*, PrgI de *Salmonella enterica* et MxiH de *Shigella flexneri*. La polymérisation de PscF est dépendante de ses deux co-chaperonnes, PscE et PscG (Ple *et al.*, 2010; Quinaud *et al.*, 2005).

Des mutations affectant la capacité de l'aiguille à sentir ou à répondre aux signaux d'induction ont été mises en évidence sur MxiH de *S. flexneri* (Kenjale *et al.*, 2005) et sur YscF de *Y. pseudotuberculosis* (Davis and Mecsas, 2007; Torruellas *et al.*, 2005). Ces mutations affectent la longueur de l'aiguille, la capacité de sécrétion et d'injection des effecteurs.

I.3.3.1.3 - Le pore de translocation

L'appareil de translocation est une structure en forme d'anneau capable de s'insérer dans les membranes plasmiques pour permettre le passage des effecteurs de l'aiguille jusqu'au cytoplasme des cellules cibles. Le translocon du SST3 de *P. aeruginosa* est constitué de trois protéines translocatrices : les protéines hydrophobes PopB et PopD formant une structure en anneau dans les membranes cellulaires et la protéine soluble PcrV nécessaire à la formation du translocon, mais qui n'est pas retrouvée elle-même dans les membranes cytoplasmiques (Goure *et al.*, 2004; Schoehn *et al.*, 2003). Des expériences d'osmoprotection ont montré que le diamètre du pore du translocon du SST3 de *P. aeruginosa* mesurait entre 2,5 et 3,5 nm (Dacheux *et al.*, 2001b).

PopB et PopD sont des protéines hydrophobes possédant respectivement deux et un domaine transmembranaire (Faudry *et al.*, 2006). Ces protéines sont sécrétées à travers l'injectisome et, d'une manière mal comprise, interagissent entre elles, s'oligomérisent sous forme d'anneau et s'insèrent dans des liposomes ou dans les membranes des globules rouges (Goure *et al.*, 2004; Schoehn *et al.*, 2003). Les protéines SipB de *Salmonella* et IpaB de *Shigella* (homologue de PopB) interagissent préférentiellement avec le cholestérol (Hayward *et al.*, 2005). Il a été également montré dans cette même étude que la déplétion des membranes de fibroblastes 3T3 en cholestérol par la méthyl- β -cyclodextrine (Me β CD)

bloquait l'injection de toxines en empêchant l'insertion du translocon dans les membranes plasmiques des cellules. Dans le cas de *P. aeruginosa*, les translocateurs PopB et PopD interagissent préférentiellement avec des membranes artificielles contenant du cholestérol et des phospholipides anioniques (Faudry *et al.*, 2006 ; Romano *et al.*, 2011; Schoehn *et al.*, 2003).

Le translocateur IpaB de *Shigella flexneri* peut interagir avec le récepteur à l'hyaluronane CD44, spécifiquement retrouvé au niveau des radeaux lipidiques riches en cholestérol et en sphingomyéline (Lafont *et al.*, 2002). Le deuxième translocateur IpaC (homologue de PopD) de *Shigella* recrute les kinases de la famille Scr pour induire la polymérisation de l'actine et permettre l'internalisation de la bactérie dans les cellules cibles (Mounier *et al.*, 2009).

Le pH est un paramètre important dans la formation et la stabilité du complexe PopB/D dans les membranes des cellules cibles. *In vitro*, un pH < 5 est nécessaire pour une liaison et une insertion plus efficace des translocateurs dans des liposomes (Faudry *et al.*, 2006 ; Romano *et al.*, 2011). Il est toutefois assez improbable que des valeurs de pH aussi basses soient atteintes lorsque le translocon s'intègre dans la membrane plasmique des cellules eucaryotes. Cette variation de pH mimerait probablement des mécanismes physiologiques de natures inconnues induits lors d'un contact des bactéries avec les cellules cibles qui provoquerait des changements de conformation des protéines du pore de translocation dans les membranes plasmiques pour permettre l'injection des exotoxines.

La présence du translocon dans les membranes cellulaires est suffisante pour causer la mort des cellules cibles, comme le montre des expériences de libération de la LDH dans le milieu extracellulaire, suite à l'altération de la perméabilité des membranes causée par l'insertion du translocon (Dacheux *et al.*, 1999; Dacheux *et al.*, 2000; Viboud and Bliska, 2002). Indépendamment des exotoxines, la présence des protéines du translocon de *P. aeruginosa* ou de *Y. pseudotuberculosis* dans les membranes plasmiques induit également l'activation de NFκB ou de la caspase-1 et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Galle *et al.*, 2008; Shin and Cornelis, 2007; Viboud *et al.*, 2003).

L'immunisation avec la protéine PcrV appelée aussi « antigène V », ou son homologue le plus proche LcrV de *Yersinia pestis*, permet la production d'anticorps protégeant d'une infection par *Yersinia* ou *Pseudomonas* (Motin *et al.*, 1994; Sawa *et al.*, 1999). La délétion de PcrV rend les souches incapables d'insérer la protéine du translocon PopD dans les membranes des érythrocytes (Goure *et al.*, 2004). PopB est en revanche présent dans les membranes, mais l'absence de PopD ne permet pas la formation d'un pore

de translocation fonctionnel, bloquant ainsi l'injection des exotoxines (Goure *et al.*, 2004). L'immunisation par PcrV empêche la lyse des cellules et augmente la survie des souris *in vivo* (Frank *et al.*, 2002; Sawa *et al.*, 1999). L'absence de PcrV ne bloque pas cependant la sécrétion des effecteurs et des translocateurs dans le milieu extracellulaire (Goure *et al.*, 2004). Des souches de *Shigella* dépourvues d'IpaD (homologue de PcrV) sécrètent de façon constitutive les translocateurs IpaB et IpaC (Menard *et al.*, 1994; Veenendaal *et al.*, 2007). La protéine LcrV de *Yersinia* reconnaît les récepteurs CD14 et TLR2. L'interaction entre LcrV et ces récepteurs à la surface des macrophages conduit à l'induction de la production de la cytokine IL-10 qui joue un rôle anti-inflammatoire, et à l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires TNF- α et de l'IFN- γ , modulant par exemple la fonction des neutrophiles (Nedialkov *et al.*, 1997; Sing *et al.*, 2002; Matteï *et al.*, 2011). Cette propriété n'est quant à elle pas retrouvée pour PcrV, ce qui pourrait expliquer la différence de virulence de *Y. pestis* et celle de *P. aeruginosa*.

LcrV et IpaD sont retrouvées au sommet de l'aiguille avant le contact avec la cellule cible (Espina *et al.*, 2006; Mueller *et al.*, 2005). Chez *Yersinia*, le sommet de l'aiguille est composé de cinq molécules de LcrV formant un complexe fermé en forme d'anneau (Deane *et al.*, 2006). LcrV ferait le lien entre l'aiguille et le translocon, servant ainsi de plateforme pour l'insertion d'un pore de translocation fonctionnel dans les membranes plasmiques des cellules cibles.

Dans le cas de *Shigella*, le sommet de l'aiguille serait composé de quatre molécules de IpaD et d'une molécule de IpaB. Cette structure serait probablement « bouchée », empêchant la sécrétion des effecteurs (Johnson *et al.*, 2007; Veenendaal *et al.*, 2007). Il a été montré que la délétion des 3 ou 9 derniers acides aminés de la partie C-terminale d'IpaB de *Shigella* induisait une sécrétion constitutive des effecteurs et des translocateurs. IpaB jouerait ainsi le rôle de senseur et la partie C-terminale serait nécessaire pour réguler la sécrétion des effecteurs et induire la fonctionnalité du translocon (Roehrich *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2010). Au contact des cellules cibles, des changements de conformation de IpaB se produiraient, relayant un signal à IpaD jusqu'à la base du SST3. Celui-ci conduirait à la sécrétion du second translocateur hydrophobe, IpaC, qui s'assemblerait avec IpaB pour former le pore de translocation (Blocker *et al.*, 2008; Veenendaal *et al.*, 2007). Il a été montré également qu'IpaD répond à la présence de déoxycholate et de sels biliaires par des changements conformationnels qui conduisent au recrutement de IpaB au sommet de l'aiguille (Stensrud *et al.*, 2008).

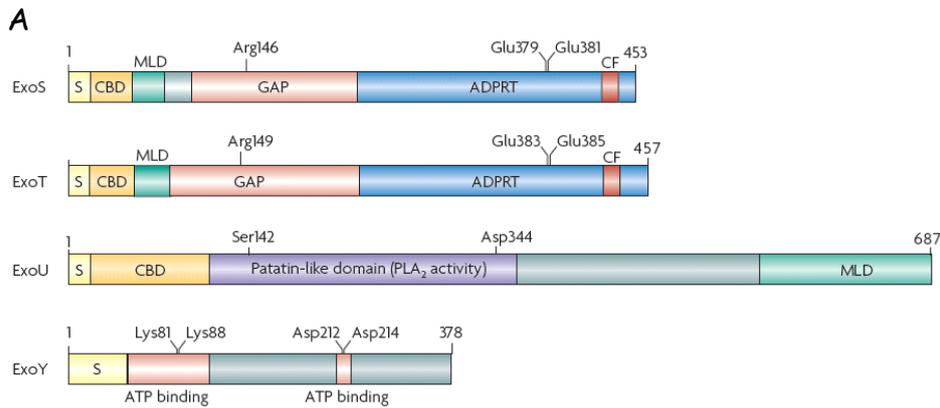
I.3.3.2 - Les exotoxines injectées par le SST3 de *P. aeruginosa*

Le SST3 de *P. aeruginosa* est celui qui secrète le moins d'effecteurs parmi tous les SST3 caractérisés. Seules quatre protéines effectrices du SST3 de *P. aeruginosa* sont sécrétées et injectées dans les cellules cibles : ExoS, ExoT, ExoU et ExoY (

Figure 7) (Engel and Balachandran, 2009 ; Hauser, 2009).

Le SST3 de *Yersinia* injecte quant à lui six protéines effectrices, le système SPI1 et SPI2 de *Salmonella* plus d'une dizaine, *Shigella* produit environ vingt-cinq protéines effectrices.

La faible quantité d'exotoxines produites par *P. aeruginosa* est particulièrement surprenante étant donné l'importante capacité à coloniser une large gamme d'hôtes et d'environnements différents. L'expression des exotoxines dans *P. aeruginosa* peut varier d'une souche à l'autre. Alors qu'ExoT et ExoY sont retrouvées dans la grande majorité des souches, les gènes codant ExoS et ExoU sont quant à eux mutuellement exclusifs. Dans les souches possédant *exoU*, le gène *exoS* aurait été excisé lors de la recombinaison permettant l'insertion le l'îlot de pathogénicité contenant *exoU* (Kulasekara *et al.*, 2006).



B

Protéine effectrice	Taille (kDa)	Chaperonne	Activité/Substrats	Cofacteur d'activation
ExoS	48	SpcS	Activité GAP : Rho, Rac and CDC42 Activité ADPRT : ezrine, radixine, moesine, vimentine, cyclophiline A, IgG3, apolipoprotéine A1, RAS, RAC1, CDC42, RAB1, 3, 5, 7, 8 et 11, RALA, RAPI/RAP2	Protéines 14-3-3
ExoT	49	SpcS	Activité GAP : Rho, Rac and CDC42 Activité ADPRT : CRKI, CRKII et phosphoglycerate kinase	Protéines 14-3-3
ExoU	74	SpcU	Phospholipase : Phospholipides, lysophospholipides and lipides neutres	SOD1
ExoY	42	Inconnue	Adénylate cyclase : ATP	Inconnue

Figure 7 : Les exotoxines injectées par le SST3 de *P. aeruginosa* (Hauser, 2009)

A : Les exotoxines et leurs domaines. S : Signal de sécrétion ; CBD : Chaperone Binding Domain ; MLD : Membrane Localization Domain ; GAP : GTPase Activating Protein ; ADPRT : ADP-Ribosyl-Transférase ; CF : Site de liaison à un cofacteur

B : Activités, substrats, chaperonnes et cofacteurs associés aux exotoxines du SST3 de *P. aeruginosa*

I.3.3.2.1 - L'exotoxine ExoS

ExoS a été découverte et étudiée bien avant que le SST3 n'ait été identifié (Iglewski *et al.*, 1978). C'est une enzyme bifonctionnelle de 453 acides aminés qui possède une activité GAP (GTPase Activating Protein) et une activité ADPRT (ADP Ribosyl-Transférase) (Figure 7A) (Barbieri and Sun, 2004).

Comme d'autres protéines effectrices du SST3, la partie N-terminale d'ExoS porte un signal de sécrétion permettant le ciblage à l'appareil de sécrétion de type III. Les 15 premiers acides aminés de ExoS contiennent vraisemblablement l'information nécessaire pour la sécrétion (Domaine S ;

Figure 7A) (Yahr *et al.*, 1996). Les résidus 15-51 constituent le site de liaison pour la protéine chaperonne CBD (Chaperone Binding Domain) SpcS de ExoS. Les résidus 51-77 riches en leucine, forment le domaine de localisation membranaire (MLD) qui permet la fixation transitoire de ExoS à la membrane plasmique de la cellule hôte (Pederson *et al.*, 2002; Zhang and Barbieri, 2005). La privation du domaine MLD de ExoS empêche l'ADP-ribosylation de protéines eucaryotes telles que Ras, médiée par le domaine ADPRT. ExoS migrerait via les endosomes et l'appareil de Golgi en interagissant avec des GTPases de type Rab pour se retrouver dans la région périnucléaire de la cellule, étape nécessaire pour la modification efficace des substrats (Deng *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007a; Zhang *et al.*, 2007b).

Les résidus 96-233 de ExoS forment le domaine GAP dont les substrats sont les petites GTPases Rho, Rac et Cdc42 (Goehring *et al.*, 1999; Pederson *et al.*, 1999) qui jouent des rôles importants dans l'organisation et les remaniements du cytosquelette d'actine de la cellule hôte (

Figure 7B et Figure 8). Les GTPases de la famille Rho (Rho, Rac et cdc42) sont des interrupteurs moléculaires oscillant entre un état actif, lorsque le site nucléotidique est occupé par le GTP, et un état inactif, lorsque celui-ci lie le GDP. La transition entre ces deux états est favorisée par des protéines appelées GAP (GTPase Activating Protein). L'arginine 146 est essentielle à l'activité GAP de ExoS qui favorise le passage des petites GTPase vers un état inactif (Goehring *et al.*, 1999; Wurtele *et al.*, 2001). La perturbation du cytosquelette d'actine par l'activité GAP de ExoS est associée à l'arrondissement des cellules et à une diminution de l'internalisation de *P. aeruginosa*, ce qui suggère un rôle dans la prévention de la phagocytose (*Figure 8*) (Frithz-Lindsten *et al.*, 1997) .

Le domaine portant l'activité ADP ribosyl-transférase (ADPRT) de ExoS se situe entre les résidus 233 et 453 (

Figure 7A). L'addition d'un groupement ADP ribose s'effectue via les résidus glutamate situés en position 379 et 381. La séquence protéique comprise entre les résidus 418 à 429 contient un site de liaison pour un cofacteur eucaryote (domaine CF) qui est nécessaire pour l'activation du domaine ADPRT. Ce cofacteur est une protéine eucaryote de la famille 14-3-3 (Coburn *et al.*, 1991; Fu *et al.*, 1993). La suppression du site de liaison 14-3-3 dans

ExoS induit la perte de l'activité ADPRT (Ottmann *et al.*, 2007). L'ADP ribosylation par ExoS est une modification post-traductionnelle irréversible jouant un rôle dans l'induction de la mort cellulaire, la perturbation du cytosquelette d'actine, et du trafic vésiculaire (*Figure 8*) (Barbieri *et al.*, 2001; Kaufman *et al.*, 2000; Pederson and Barbieri, 1998; Rocha *et al.*, 2003). La perturbation de l'organisation du cytosquelette peut contribuer à une réduction de l'adhérence cellule-cellule qui peut faciliter la pénétration de *P. aeruginosa* à travers la barrière épithéliale.

La protéine Ras et les protéines de la famille des ezrine, radixine et moésine (ERM) ont été identifiées comme étant des substrats du domaine ADPRT de ExoS. L'ADP-ribosylation de l'arginine 41 de Ras bloque l'échange GDP-GTP (Ganesan *et al.*, 1999). La surexpression de Ras constitutivement actif empêche la destruction de cellules médiée par ExoS (Jansson *et al.*, 2006). L'ADP ribosylation des protéines ERM par ExoS empêche leur phosphorylation en les maintenant sous une forme inactive (Maresso *et al.*, 2007). Leur inactivation entraîne une perte de la mobilité cellulaire, de la phagocytose, de l'adhérence et du maintien de la forme de la cellule.

Bien qu'elle bloque l'organisation du cytosquelette d'actine, l'activité ADPRT de ExoS peut jouer un rôle dans la formation de protrusions membranaires appelées « blebs » dans les cellules épithéliales de la cornée, permettant aux bactéries d'être internalisées afin de se protéger et de se développer à l'abri de l'immunité innée de l'hôte (Angus *et al.*, 2010). Cisz et son équipe ont montré que l'activité GAP et ADPRT de ExoS régulent de façon négative sa propre injection dans les cellules (Cisz *et al.*, 2008).

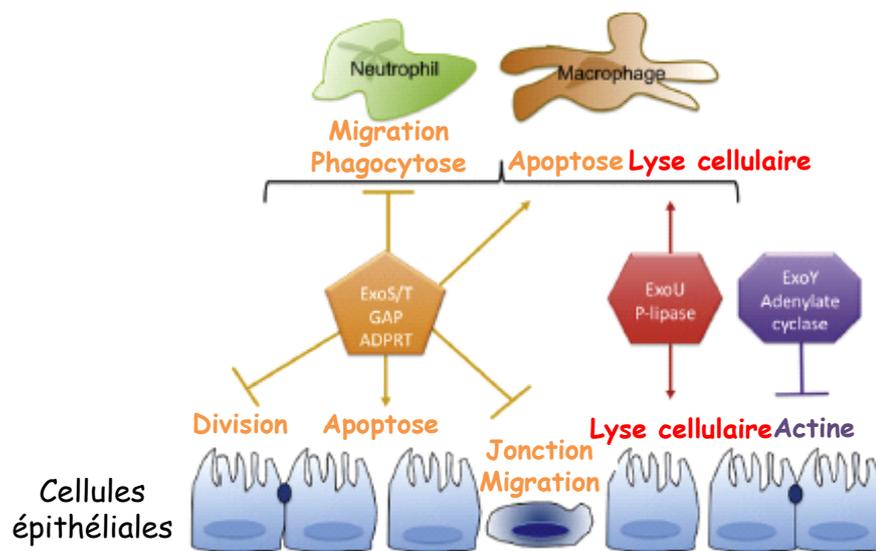


Figure 8 : Effets des exotoxines du SST3 de *P. aeruginosa* sur les cellules cibles eucaryotes (Engel and Balachandran, 2009)

Les exotoxines du SST3 de *P. aeruginosa* ont des effets divers et pléiotropes sur les fonctions de la cellule cible. Les cellules bleues claires représentent la barrière épithéliale polarisée. Les cellules bleues foncées représentent des cellules lésées et dépolarisées de la barrière épithéliale. Les effets positifs ou négatifs de chacune des toxines sur les processus cellulaires (Migration, phagocytose, lyse cellulaire, division, migration, jonction et polymerisation de l'actine) sont indiqués.

I.3.3.2.2 - L'exotoxine ExoT

ExoT possède 76 % d'identité avec ExoS. C'est également une enzyme bifonctionnelle avec une activité GAP dans la région N-terminale et une activité ADPRT en C-terminal (

Figure 7A). Les résidus 1-50 permettent la sécrétion et la fixation à la chaperonne. Les résidus 51-72 codent pour le domaine de localisation membranaire (MLD) (Hauser, 2009).

Comme pour ExoS, les résidus 78-235 de ExoT contiennent l'activité GAP dirigée contre les GTPase de types Rho, Rac et Cdc42 (

Figure 7B et Figure 8) (Kazmierczak and Engel, 2002). Cette activité semble être similaire à celle de ExoS et provoque des perturbations réversibles du cytosquelette d'actine qui se

manifestent par l'arrondissement et le détachement des cellules, l'inhibition de la migration cellulaire et de la phagocytose (Cowell *et al.*, 2000; Garrity-Ryan *et al.*, 2004), et contribue également à l'inhibition de la cytokinèse à travers l'inactivation de Rho (Shafikhani and Engel, 2006).

Les résidus 235-457 de ExoT constituent le domaine ADPRT qui nécessite également le cofacteur 14-3-3 de la cellule hôte pour permettre son activation (Liu *et al.*, 1997).

Contrairement à ExoS, l'activité d'ADP ribosylation d'ExoT cible un nombre plus limité de protéines (

Figure 7B). ExoT ADP-ribosyle les protéines adaptatrices CrkI et CrkII. La présence d'une petite hélice α («zone A») dans ExoT, absente de ExoS, confère une spécificité pour les Crk (Sun and Barbieri, 2003). L'ADP ribosylation de Crk-1 sur l'arginine 20 par ExoT empêche l'association de Crk-1 avec les protéines d'adhérences focales p130^{cas} et la paxilline bloquant de ce fait la phagocytose médiée par les intégrines. ExoT forme également un complexe avec des protéines Crk et un de ses ligands, l'E3 ubiquitine-ligase Cbl-b (Balachandran *et al.*, 2007) conduisant à la polyubiquitylation de ExoT et sa dégradation par le protéasome. Cbl-b fonctionne comme une molécule de défense de l'hôte, en facilitant la dégradation d'ExoT.

Les activités enzymatiques de ExoT ont été liées également à des retards dans la cicatrisation des plaies induites dans une monocouche de cellules épithéliales pulmonaires A549 *in vitro* (Geiser *et al.*, 2001). Plusieurs études ont montré un rôle pathogène pour ExoT mais sa contribution dans des modèles de mammifères est modeste par rapport à celle d'ExoS et d'ExoU (Lee *et al.*, 2005 ; Shaver and Hauser, 2004; Vance *et al.*, 2005). Alors qu'ExoS induit l'apoptose après 2 à 5 heures d'infection, l'activité ADPRT de ExoT nécessite plus de 10 heures pour aboutir au même résultat (Shafikhani *et al.*, 2008).

I.3.3.2.3 - L'exotoxine ExoY

ExoY est une adénylate cyclase (

Figure 7) (Yahr *et al.*, 1998). Son activité est dépendante d'un facteur cellulaire encore inconnu. Son injection a pour conséquence une élévation de la concentration d'AMPc (Adénosine MonoPhosPhate cyclique) dans les cellules (*Figure 8*) (Yahr *et al.*, 1998). Ces effets conduisent à la rétraction des cellules, la perméabilité du tissu endothélial et l'invasion de bactéries (Cowell *et al.*, 2005; Prasain *et al.*, 2009; Sayner *et al.*, 2004). L'importance d'ExoY dans l'infection reste incertaine puisque peu d'études montrent une réelle cytotoxicité *in vivo*.

Tout comme ExoS, l'activité adénylate cyclase de ExoY induit la formation de « blebs » à des temps d'infection plus long (8 heures) pour permettre l'internalisation de bactéries, mais n'influe pas sur leur réplication contrairement à ExoS (Hritonenko *et al.*, 2011).

I.3.3.2.4 - L'exotoxine ExoU

ExoU est une phospholipase (*Figure 8*) (Sato and Frank, 2004). Le signal de sécrétion qui dirige ExoU au niveau de l'appareil de sécrétion de type III se situe dans les quinze premiers acides aminés de la protéine. Un domaine de liaison pour la chaperonne SpuC, se situe dans la séquence en acides aminés 3 à 123 (Finck-Barbancon *et al.*, 1998). Un domaine patatine situé entre les résidus 107 et 357 confère une activité phospholipase A2 (PLA₂) à ExoU (

Figure 7A) (Sato and Frank, 2004). Elle hydrolyse des phospholipides entraînant la libération d'acides gras libres et de lysophospholipides (

Figure 7B). Les résidus conférant son activité sont la sérine 142 et l'asparagine 344.

Les résidus 550-687 en position C-terminale contiennent un domaine MLD qui cible ExoU à la membrane plasmique de la cellule hôte (Rabin *et al.*, 2006). Comme d'autres protéines effectrices du SST3 de *P. aeruginosa*, ExoU nécessite un cofacteur eucaryote pour son activation tel que la superoxyde dismutase (SOD1) (Sato *et al.*, 2006). La fixation de la SOD1 sur le domaine MLD est nécessaire pour induire l'activation de ExoU (Veesenmeyer *et al.*, 2010). Une fois à l'intérieur de la cellule hôte, ExoU peut être également ubiquitinylé sur la lysine 178, mais cette modification ne modifie pas sensiblement la toxicité ou la localisation de ExoU dans la cellule cible (Stirling *et al.*, 2006).

Les souches exprimant ExoU sont reconnues comme étant fortement cytotoxiques. Les conséquences d'une injection d'ExoU sont la lyse des cellules eucaryotes. Contrairement à ExoS et ExoT, la mort causée par ExoU est caractérisée par une perte rapide de l'intégrité des membranes plasmiques et la nécrose des cellules (Finck-Barbancon *et al.*, 1997). ExoU est globalement cent fois plus toxique qu'ExoS et a été décrite *in vivo* pour contribuer à la persistance de *P. aeruginosa* dans les poumons. Dans un modèle murin, ExoU est injecté principalement dans les phagocytes lors d'une infection aiguë (Diaz and Hauser, 2010).

I.3.3.3 - Régulation du SST3 de *P. aeruginosa*

La majorité des gènes codant le SST3 sont organisées en cinq opérons localisés sur le chromosome. Les gènes codants les effecteurs sont situés ailleurs sur le chromosome. Le gène codant ExoU est quant à lui situé sur un îlot de pathogénicité.

La transcription des gènes du SST3 de *P. aeruginosa* est intimement couplée à l'activité sécrétoire de l'injectisome. Tout comme *Yersinia*, l'induction peut être mimée *in vitro* par la déplétion en Ca^{2+} du milieu de culture en présence d'EGTA, mais également par les TSF (Type III Secretion Factors) présents dans le sérum et dans le milieu LB (Luria Bertani), contenant de l'albumine et de la caséine ayant une faible affinité mais de nombreux sites de fixations pour le Ca^{2+} (Kim *et al.*, 2005; Vallis *et al.*, 1999). Les mécanismes d'induction mimés par la déplétion en calcium ne sont toujours pas élucidés. *In vivo*, le contact avec des cellules cibles eucaryotes est nécessaire pour induire l'expression des gènes codants le SST3 (Cisz *et al.*, 2008; Vallis *et al.*, 1999). Une souche dépourvue de pili de type IV retarde l'injection d'ExoS dans des cellules eucaryotes. Cependant, la complémentation par une autre adhésine bactérienne telle que l'adhésine pH6 restaure l'injection (Sundin *et al.*, 2002). Les pilis de type IV ne sont donc pas indispensables mais un contact étroit est primordial pour déclencher une signalisation entre *P. aeruginosa* et la cellule cible pour permettre l'injection des effecteurs.

L'induction de la totalité de l'expression des gènes du SST3 est sous la dépendance stricte du régulateur transcriptionnel ExsA (Exoenzyme S regulator protein A). ExsA régule également sa propre expression (Brutinel *et al.*, 2008). Trois autres protéines jouent un rôle important dans la régulation de ce système : les protéines ExsC, ExsD et ExsE. ExsD est un anti-activateur qui interagit avec ExsA, l'empêchant de se fixer sur ses promoteurs. ExsC est un anti-anti-activateur d'ExsA qui est séquestré par ExsE, retrouvé en grande quantité dans le cytoplasme. Lors d'un stimulus tel que le contact avec les cellules cibles, ExsE est sécrétée et injectée dans les cellules cibles, ce qui a pour effet de diminuer sa concentration dans le cytoplasme de la bactérie (Rietsch *et al.*, 2005; Urbanowski *et al.*, 2007). ExsC est alors libérée et peut interagir par la suite avec ExsD, libérant à son tour ExsA (Thibault *et al.*, 2010). L'expression des gènes est alors induite ce qui se traduit par la sécrétion d'effecteurs et des translocateurs et une augmentation du nombre d'injectisomes à la surface de la bactérie (*Figure 9*).

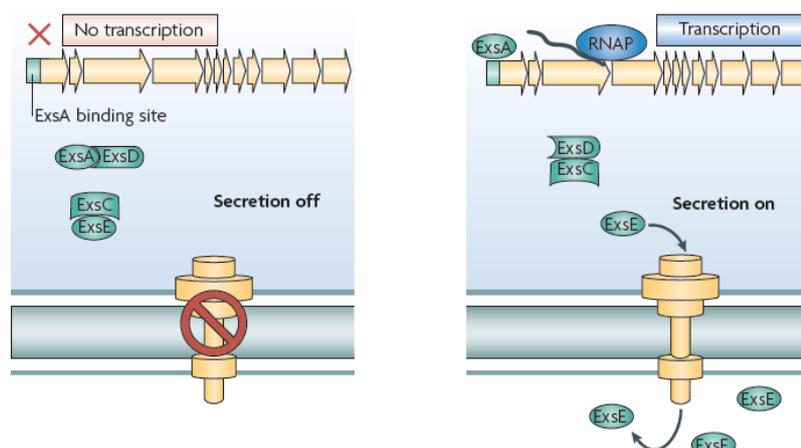


Figure 9 : Induction du SST3 de P. aeruginosa (Hauser, 2009)

II - Les réponses cellulaires à l'infection par *P. aeruginosa*

Pour que *Pseudomonas aeruginosa* devienne pathogène, l'organisme doit présenter une rupture de la barrière de protection, le plus souvent une plaie au niveau de la peau ou des muqueuses généralement secondaire à un traumatisme (coupure, abrasion, brûlure, intervention chirurgicale, intubation endotrachéale, cathéter urinaire). Après colonisation superficielle, on assiste ensuite à une invasion bactérienne, localisée au départ, puis qui a tendance à envahir les tissus sous-jacents et peut gagner la circulation sanguine provoquant alors des septicémies.

II.1 - Les cibles cellulaires

Les types cellulaires qui constituent les principales cibles de ce pathogène sont donc naturellement les cellules épithéliales de la peau et des muqueuses, et les cellules de l'immunité innée (neutrophiles et macrophages) qui sont la première ligne de défense de l'organisme contre les micro-organismes pathogènes.

Au niveau pulmonaire par exemple, la défense immunitaire innée repose sur la barrière structurale que constitue les cellules épithéliales du tractus respiratoire, la clairance mucociliaire, les molécules antimicrobiennes présentes dans les voies respiratoires et la défense par phagocytose impliquant les macrophages alvéolaires résidents et les polynucléaires neutrophiles recrutés au lieu d'infection (Lavoie *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2010).

II.1.1 - Les cellules épithéliales

P. aeruginosa est l'une des plus virulentes bactéries opportunistes. Dans le contexte d'une barrière épithéliale endommagée et sur un terrain immunitaire compromis, *P. aeruginosa* est capable de proliférer et de développer un véritable arsenal de facteurs de

virulence qui entraîne encore plus de dommages au niveau de l'épithélium, altère la réparation tissulaire et favorise la dissémination dans les tissus de l'organisme (Kipnis *et al.*, 2006; Sadikot *et al.*, 2005). L'un des éléments importants de l'interaction des bactéries avec l'hôte est la capacité de pénétrer (ou d'être internalisées) dans les cellules épithéliales qui tapissent les muqueuses ou les cellules endothéliales qui forment la paroi des vaisseaux. *P. aeruginosa* doit cependant être considérée comme un pathogène intracellulaire facultatif contrairement à d'autres pathogènes comme *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* et *Chlamydia* pour lesquels l'invasion cellulaire est essentielle pour le développement de la maladie infectieuse. Comme pour ces derniers, la pénétration de *P. aeruginosa* dans les cellules permet la réplication intracellulaire et la transcytose (Fleiszig *et al.*, 1995). Mais l'internalisation de *P. aeruginosa* semblerait plutôt être un phénomène bénéfique pour l'hôte en modulant par exemple les réponses immunitaires ou en évacuant par clairance mucociliaire les cellules mortes contenant des bactéries intracellulaires (Grassme *et al.*, 2003; Pier *et al.*, 1997). La bactérie a d'ailleurs développé, par l'injection et les effets intracellulaires des effecteurs tels qu'ExoS et/ou ExoT, des moyens de défense contre l'internalisation et la phagocytose (cf Introduction §I.3.3.2). Un défaut d'injection des effecteurs permet de favoriser l'internalisation des bactéries dans les cellules épithéliales (Hauser *et al.*, 1998).

L'invasion bactérienne nécessite deux étapes principales qui résultent de l'adhérence des bactéries : la subversion de la polarité des cellules épithéliales et la rupture des contacts intercellulaires.

La subversion de la polarité des cellules épithéliales a été longuement étudiée dans l'infection à *P. aeruginosa* (Engel and Eran, 2011). Au niveau des muqueuses, un épithélium est constitué de cellules étroitement juxtaposées et polarisées formant une barrière naturelle sélective et efficace contre les pathogènes. On distingue la région apicale à l'interface avec le milieu extracellulaire, et la région basolatérale qui comprend les surfaces en regard d'une autre cellule et de la lame basale. Ces deux régions sont biochimiquement relativement différentes. La partie apicale contient notamment des transporteurs et des enzymes qui sont spécialisées pour interagir avec l'environnement extérieur. Elle est fortement enrichie en glycosphingolipides et en cholestérol. La membrane plasmique de la partie basolatérale de l'épithélium contient de nombreux transporteurs et des récepteurs qui sont impliqués dans l'absorption des nutriments. Les jonctions serrées définissent la frontière entre partie apicale et basolatérale. Elles assurent l'étanchéité de la barrière cellulaire et restreignent les mouvements des composants de la membrane entre le domaine apical et le domaine basolatéral. Les jonctions adhérentes dont les principaux constituants sont les cadhérines sont

localisées en dessous des jonctions serrées. Elles assurent le contact intercellulaire et sont étroitement liées au cytosquelette d'actine et régulent la morphogénèse des tissus (Engel and Eran, 2011).

Il est intéressant de noter que des cellules épithéliales très confluentes et polarisées sont beaucoup moins sensibles à l'invasion et à l'injection des exotoxines par *P. aeruginosa*. En revanche, la perte de la polarisation (absence de confluence des cellules, blessure détruisant les jonctions serrées intercellulaires etc...) d'un épithélium renforce la pathogénicité de *P. aeruginosa* (Engel and Eran, 2011; Fleiszig *et al.*, 1997; McGuffie *et al.*, 1999).

Les phosphoinositides sont des éléments importants de la polarité cellulaire. Le pôle basal contient du PIP3 (Phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate) alors que le pôle apical est plus riche en PIP2 (Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate) (Martin-Belmonte and Mostov, 2008). Le contact de *P. aeruginosa* avec l'épithélium induit le recrutement et l'activation de la PI3 kinase (Phosphatidyl-Inositol 3-kinase) sur le pôle apical de la cellule. Cette redistribution de PIP3 crée un remodelage de la membrane plasmique sur le côté apical des cellules. Des protusions de la membrane sont observées, permettant ainsi l'internalisation de bactérie dans les cellules cibles. Au final, *P. aeruginosa* est capable au contact avec la membrane plasmique des cellules cibles, de transformer une partie du côté apical (où la bactérie adhère) en un microenvironnement local ayant des caractéristiques biochimiques du pôle basolatéral pour permettre l'entrée des bactéries dans les muqueuses (*Figure 10*) (Engel and Eran, 2011; Kierbel *et al.*, 2007). Le traitement des cellules en présence de siARN (small interference ARN) ou d'inhibiteurs de PI3K, comme le LY294002, bloquent la formation de protusions de la membrane et l'internalisation de *P. aeruginosa* dans les cellules épithéliales (Kierbel *et al.*, 2005).

Les sulfates d'héparanes (PGSH) et les N-glycanes des protéoglycans ont été étudiés pour leur rôle possible dans l'internalisation de *P. aeruginosa* dans les cellules cibles. Les PGSH sont majoritairement retrouvés sur le pôle basolatéral alors que les N-glycanes sont localisés sur le côté apical des cellules. Une diminution de l'expression de ces molécules bloque l'adhérence et l'internalisation de *P. aeruginosa* dans les cellules épithéliales. Dans une cellule incomplètement polarisée, une augmentation de la quantité de PGSH est observée à la surface du pôle apical, expliquant en partie l'augmentation de la susceptibilité par une infection à *P. aeruginosa* (Apodaca *et al.*, 1995; Bucior *et al.*, 2010).

Par certains aspects, les mécanismes de pénétration de *P. aeruginosa* dans les cellules épithéliales ont de grandes similitudes avec les mécanismes de phagocytose des bactéries par les phagocytes professionnels (neutrophiles, monocytes/macrophages).

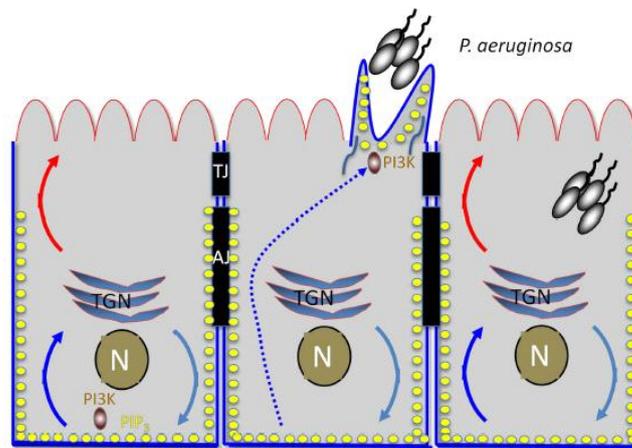


Figure 10 : Mécanisme d'invasion de *P. aeruginosa* dans les cellules épithéliales

Le pôle apical est coloré en rouge, le côté basolatéral est coloré en bleu. TJ : Jonctions serrées ; AJ : Jonctions adhérentes ; N : Noyau ; TGN : Trans-Golgi Network. Le PIP3 est représenté par des points jaunes. Le contact de *P. aeruginosa* sur le pôle apical des cellules épithéliales induit le recrutement de la PI3K. L'augmentation de la quantité de PIP3 permet la formation de protusions. Les bactéries sont ensuite internalisées dans les cellules cibles.

II.1.2 - Les cellules de l'immunité innée

Les polynucléaires neutrophiles représentent près de 70 % des leucocytes circulants. Ce sont les leucocytes possédant la plus grande capacité de défense contre les microorganismes pathogènes (Nathan, 2006). Les macrophages proviennent de cellules issues de la moelle osseuse, les monocytes qui ne représentent que 1 à 2 % des leucocytes circulants. Les macrophages sont présents dans tous les tissus de l'organisme et portent différents noms suivant leur localisation (histiocytes dans le tissu conjonctif, cellules de Kupfer dans le foie, ostéoclastes dans le tissu osseux, etc...) (Gordon and Taylor, 2005). Ils sont présents en grand nombre dans les ganglions lymphatiques et les muqueuses qui sont des tissus participant activement au processus immunitaire de défense de l'organisme. Les principales fonctions des macrophages et des neutrophiles se déclinent ainsi : le chimiotactisme qui leur permet de se rendre rapidement sur le site infectieux, la phagocytose visant à l'internalisation des bactéries et la libération de molécules microbicides

(dégranulation d'enzymes lytiques et explosion respiratoire génératrice de dérivés toxiques de l'oxygène) nécessaires pour la destruction des bactéries.

Ces cellules de l'immunité innée sont largement reconnues pour jouer un rôle majeur dans la lutte contre les infections à *P. aeruginosa*. Les macrophages alvéolaires sont les premières cellules de l'immunité innée à interagir avec *P. aeruginosa* au niveau des voies aériennes inférieures et ils ont un rôle bien établi dans les réponses immunitaires innées et adaptatives. Cependant, dans les études utilisant diverses méthodes pour assurer une déplétion sélective en macrophages dans les poumons de rongeurs, les résultats sont contradictoires quant à leur rôle direct dans la défense contre les infections aiguës par *P. aeruginosa*. La déficience en macrophages induit une diminution importante du nombre de neutrophiles recrutés (Hashimoto *et al.*, 1996; Kooguchi *et al.*, 1998) mais il ne semble pas y avoir d'effet sur la survie des animaux ni sur l'élimination des bactéries (Cheung *et al.*, 2000). La plupart des études indiquent que les macrophages ont un rôle déterminant en ce qui concerne la sécrétion de cytokines et le recrutement des neutrophiles, mais n'auraient pas de rôle direct majeur pour assurer la destruction des bactéries. A l'opposé, une neutropénie sévère dans un modèle murin augmente de façon drastique la susceptibilité au pathogène *P. aeruginosa* (Koh *et al.*, 2009).

Lors d'un processus infectieux, des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires sont produites essentiellement par les macrophages et les cellules épithéliales, qui modifient localement les propriétés adhésives et la perméabilité de l'endothélium et favorisent l'arrivée des cellules du système immunitaire telles que les neutrophiles au niveau du site infectieux. De façon plus spécifique à l'infection par *P. aeruginosa*, il a été montré que l'engagement des TLR2, TLR4 et TLR5 des macrophages par interaction avec les pili de *P.aeruginosa*, le LPS et la flagelline respectivement, induit la sécrétion de chimiokines telles que MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein 2), KC et de cytokines comme le TNF- α , l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-1 β (Lavoie *et al.*, 2011 ; Raoust *et al.*, 2009; Skerrett *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2010).

Les leucocytes, qui circulent dans le sang, adhèrent à l'endothélium (margination), s'insinuent entre les cellules endothéliales et traversent la paroi vasculaire (diapédèse ou extravasation), puis migrent dans les tissus. La contribution des protéines d'adhérence (sélectines, intégrines et membres de la superfamille des immunoglobulines), ainsi qu'un perpétuel remodelage du cytosquelette d'actine avec la participation de la myosine et des protéines d'ancrage de l'actine à la membrane plasmique sont les éléments majeurs générant les forces motrices de la chemotaxie (Muller, 2011). Ainsi, l'avant de la cellule émet de fins lamellipodes alors qu'un uropode contractile se forme à l'arrière de la cellule. La cellule est

alors dite polarisée. Ces modifications ont lieu sous le contrôle de kinases, notamment la PI3K (PhosphoInositide 3 Kinase), et les petites GTPases monomériques Rho, Rac et Cdc42 (Ridley *et al.*, 2003). La migration dirigée des neutrophiles (et des macrophages) vers le site infectieux est initiée par des molécules appelées chimioattractants. Ces molécules sont libérées par les microorganismes invasifs (peptides N-formylés) ou générées de manière endogène par l'hôte (chimiokines (IL-8), PAF (Platelet Activating Factor), le leukotriène B4 et le fragment C5a d'activation du complément). Elles diffusent en formant un gradient continu de concentration décroissante à partir du site infectieux (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Le mouvement dirigé des neutrophiles vers le site infectieux est initié par la fixation de ces molécules chimiotactiques sur des récepteurs membranaires spécifiques, appelés récepteurs de chimioattractants. Les souris C5aR^{-/-}, déficientes pour le récepteur du C5a ont un taux de survie sévèrement réduit après infection par *P. aeruginosa* (Hopken *et al.*, 1996).

La plupart des microorganismes ne peuvent être reconnus et phagocytés qu'après avoir été opsonisés, c'est-à-dire recouverts de facteurs du complément ou d'anticorps pouvant être reconnus par les récepteurs des phagocytes. La paroi bactérienne peut être chargée en facteur activé C3b du complément qui est reconnu par les récepteurs CR1 et CR3. L'ingestion des microorganismes requiert des interactions plus fortes de type antigène-anticorps. Ainsi, des immunoglobulines de type G1 et G3 (IgGs) se fixent à des antigènes spécifiques à la surface des bactéries et servent de ligands aux neutrophiles qui présentent des récepteurs aux fragments Fc de ces IgGs (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). D'autres opsonines plus spécifiques du type de microorganismes sont capables d'initier l'interaction hôte-pathogène, c'est le cas de la LBP (Lipopolysaccharide (LPS) Binding Protein) qui se lie aux LPS des bactéries Gram-négatif et aux récepteurs CD14 des cellules phagocytaires. L'émission de pseudopodes pour entourer les microorganismes va permettre leur englobement par fusion membranaire dans une vacuole appelée le phagosome. C'est dans ce compartiment, isolé du reste de la cellule, que le pathogène va être tué et digéré.

Les granules, organelles de stockage intracellulaires, peuvent fusionner avec le phagosome contenant le pathogène. Ce processus, appelé dégranulation, permet le déversement dans les vacuoles de phagocytose de nombreuses enzymes lysosomales qui interviennent dans la digestion des pathogènes, donnant ainsi naissance au phagolysosome. D'autre part, la fusion des granules peut avoir lieu avec la membrane plasmique, ce qui permet de compenser la surface membranaire perdue lors de la phagocytose mais aussi d'augmenter rapidement la quantité de protéines membranaires, notamment les récepteurs de surface ("up-regulation"). Le contenu des granules peut aussi être déversé dans le milieu

extérieur. Ainsi, les granules des phagocytes contiennent de l'élastase. Il a été montré que cette enzyme dégradait la porine OprF située dans la membrane externe de *P. aeruginosa*, diminuant ainsi la prolifération des bactéries *in vivo* (Hirche *et al.*, 2008). L'élastase et la cathepsine G clivent la flagelline (Lopez-Boado *et al.*, 2004). Il a été également montré que les sécrétions mucopurulantes collectées chez les patients atteints de mucoviscidose, qui contiennent beaucoup d'élastase, entraînent une régulation négative de l'expression de *fliC* le gène codant la flagelline de *P. aeruginosa* (Sonawane *et al.*, 2006; Wolfgang *et al.*, 2004). La flagelline étant très immunogène et détectée par les PRRs (Pattern Recognition Receptors) de l'hôte, la répression de son expression représente une réponse adaptative qui permet à *P. aeruginosa* d'échapper aux mécanismes de défense de l'hôte et à la phagocytose. Un autre exemple de défenses mutuelles qui peuvent donner l'avantage au pathogène ou à l'hôte concerne la cytokine MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1). MCP-1 est sécrétée par les cellules épithéliales pulmonaires suite à l'activation de la voie NFκB, stimule la phagocytose des macrophages et régule la prolifération des bactéries *in vivo* (Kannan *et al.*, 2009). L'exotoxine ExoS, injectée dans les cellules par le SST3 de *P. aeruginosa*, inhiberait en revanche la production de MCP-1.

La principale fonction microbicide des neutrophiles consiste en la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans l'environnement du site infectieux et dans le phagolysosome. Leur production est assurée par la NADPH oxydase NOX2 qui est une enzyme présente dans les cellules phagocytaires et également dans d'autres types cellulaires comme les cellules épithéliales. D'autres NOXs sont exprimées dans l'épithélium et l'endothélium qui génèrent de petites quantités de ROS, apparemment à des fins de transduction du signal dans certains mécanismes comme l'apoptose (Lambeth, 2004). Il a été montré plus récemment que les NOXs peuvent être ciblés dans des compartiments sub-cellulaires pour la production localisée de ROS. Ce serait le cas, par exemple, au sein des complexes focaux des lamellipodes, où les ROS seraient requis pour la migration cellulaire dirigée (Ushio-Fukai, 2006). De plus, certains macrophages sont capables, après induction d'une NO synthase, de produire des dérivés nitrés, notamment le monoxyde d'azote qui contribue à l'élimination des organismes.

La phagocytose de *P. aeruginosa* par le macrophage fait intervenir l'activation de la kinase de la famille Src, lyn (Kannan *et al.*, 2008). Lyn est recrutée au niveau des radeaux lipidiques lors du contact des bactéries avec les macrophages. Lyn active Akt (ou PKB pour Protein Kinase B) et la PI3K. L'activation de ces kinases entraîne le remodelage de l'actine et conduit à la formation du phagosome. Cette voie de signalisation intracellulaire aboutit

également à l'activation de la NADPH oxydase nécessaire pour la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que l' $O_2^{\cdot-}$ dans les phagolysosomes (Figure 11). L'inhibition des PI3K ou des kinases de type Src par des inhibiteurs comme la wortmannine, le PP2 ou de l'intégrité des radeaux lipidiques en présence de méthyl- β -cyclodextrine bloquent la production de ROS et la phagocytose des bactéries (Kannan *et al.*, 2008).

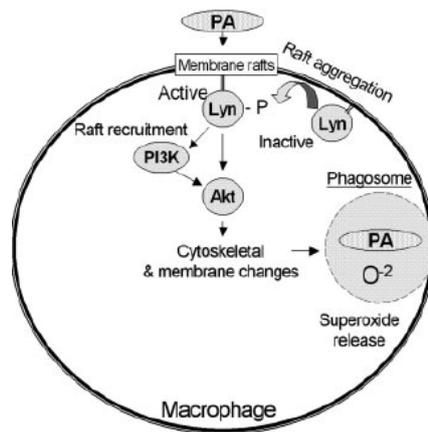


Figure 11 : Induction de la production de ROS dans les macrophages infectés par *P. aeruginosa* (Kannan *et al.*, 2008)

Le contact de *P. aeruginosa* avec les macrophages induit le regroupement des radeaux lipidiques à la surface de la membrane et le recrutement de la kinase lyn. PI3K et Akt sont activés à leur tour induisant par la suite la production de ROS dans les phagosomes par la NADPH oxydase.

Le CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) présent à la surface des macrophages participe au contrôle du pH phagolysosomal et joue également un rôle dans la capacité de destruction de *P. aeruginosa*. Les macrophages alvéolaires de souris *cftr*^{-/-} sont capables de phagocytose et produisent des ROS mais l'absence d'acidification des phagolysosomes ne permet pas la destruction des bactéries et au contraire, procure un environnement propice à leur réplication (Di *et al.*, 2006).

II.1.3 - Les cellules de l'immunité adaptative

Le rôle du système immunitaire adaptatif de défense contre les infections pulmonaires par *P. aeruginosa* n'a pas été clairement étudié puisque la majorité des patients sensibles aux infections à *P. aeruginosa* ont des défauts des mécanismes de défense immunitaire innée ou

adaptative. Chez les patients atteints de mucoviscidose, des anticorps dirigés contre des antigènes de *P. aeruginosa* sont détectés notamment contre des protéines du SST3 (Moss *et al.*, 2001). Ces observations signifient bien qu'une immunité adaptative s'est développée.

Plusieurs essais vaccinaux ont été développés depuis ces dix dernières années contre de différents facteurs de virulence de *P. aeruginosa* tels que le LPS, le flagelle, les pili ou encore contre les protéines du SST3 comme PrcV (Döring and Pier, 2008). Pour le moment, aucun de ces vaccins n'a obtenu d'autorisation de mise sur le marché.

Recentement, il a été montré que différents types de lymphocytes T dont les Th17 CD4⁺ produisent la cytokine IL-17 suite à une infection des souris par la souche PAO1 de *P. aeruginosa*. Le rôle premier est de permettre la production de chémokines telles que G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) et KC pour induire le recrutement des neutrophiles (Liu *et al.*, 2011).

II.2 - Les récepteurs et composants des membranes de la cellule hôte impliqués dans l'adhérence et l'invasion cellulaire

L'internalisation de *P. aeruginosa* dans les cellules nécessite au préalable l'adhérence de la bactérie à la cellule hôte. La bactérie possède un grand nombre de molécules adhésives qu'elle peut utiliser pour se fixer sur divers types cellulaires. Ces protéines et les molécules de l'hôte avec lesquelles elles interagissent ont été décrites dans le chapitre I.3.1 de l'introduction.

II.2.1 - Les asialogangliosides

Un certain nombre d'études ont impliqué les glycolipides présents dans les membranes des cellules épithéliales dans l'adhérence et l'internalisation. Les pili de *P. aeruginosa* se lient spécifiquement aux glycolipides dont le disaccharide Gal β (1-4)GlcNac est exposé, les asialogangliosides aGM1 et aGM2 (cf Introduction §I.3.1.2). Le domaine C-terminal de la sous-unité PilA est impliqué (Lee *et al.*, 1994). L'enrichissement en aGM1 exogène des cellules MDCK augmente l'adhérence, l'invasion et la cytotoxicité médiée par le SST3 de manière piline dépendante (Comolli *et al.*, 1999). L'adhérence de *P. aeruginosa* à ces cellules épithéliales est inhibée par le traitement avec des anticorps anti-aGM1 (de

Bentzmann *et al.*, 1996). Le flagelle et le LPS interagissent également avec aGM1 (Adamo *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 1994).

De façon intéressante, on observe une plus grande expression d'aGM1 à la surface des cellules épithéliales endommagées (Hazlett *et al.*, 1993) et les cellules bronchiques isolées de patients atteints de mucoviscidose contiennent plus d'aGM1 que celles des sujets normaux.

II.2.2 - Les PRRs

Les cellules de l'hôte reconnaissent des motifs moléculaires hautement conservés associés aux pathogènes et appelés PAMPS (Pathogen-Associated Molecular Patterns) grâce à des récepteurs membranaires ou cytoplasmiques les PRRs (Pattern Recognition Receptors). Ils initient un signal approprié à l'élimination du pathogène ainsi qu'à l'activation de l'immunité adaptative (Lee and Kim, 2007). Les PRRs les mieux caractérisés sont les TLRs (Toll-Like Receptors). La stimulation des différents TLRs par leurs ligands respectifs induit différentes voies de signalisation intracellulaire (*Figure 12*) en recrutant différentes combinaisons de quatre molécules distinctes : MyD88 (Myeloid Differentiation primary-response protein 88), TIRAP, TRIF (TICAM1) et TRAM (Kawai and Akira, 2010). Ces voies de signalisation conduisent à l'activation de NF- κ B (Nuclear Factor kappa-B), des MAP kinases (Mitogen-Activated Proteins kinases), JNK (Jun N-terminal Kinase), p38, Erk1/2 et des facteurs IRF (Interferon Regulatory Factors). NF- κ B et les facteurs de transcription de la famille AP1 activés par les MAP Kinases régulent l'expression de gènes codant pour des cytokines impliquées dans l'inflammation telles que l'IL-8, le TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha) et l'IL-12, ou encore des molécules adhésives comme ICAM-1, des molécules chimioattractantes et des protéines anti-apoptotiques. Les protéines IRFs (Interferon Regulatory Factors) constituent une famille de facteurs de transcription qui induisent l'expression de l'interféron de type I (IFN- α , IFN- β) et/ou de gènes induits par l'interféron.

En ce qui concerne plus spécifiquement *P. aeruginosa*, la reconnaissance de *P. aeruginosa* implique TLR2, TLR4 et TLR5 (Kipnis *et al.*, 2006). Le flagelle et le LPS qui interagissent avec le ganglioside aGM1 sont reconnus par TLR2 et/ou TLR5, et TLR4 respectivement (*Figure 12*) (Adamo *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 1994; Hajjar *et al.*, 2002). Il a été montré que l'exotoxine ExoS activerait les voies de signalisation dépendante de TLR2 et TLR4 induisant la production de TNF- α via l'activation de NF- κ B (Epelman *et al.*, 2004).

La liaison de *P. aeruginosa* avec aGM1 sur la partie apicale exposée à la surface des cellules des voies aériennes est indispensable pour initier l'engagement de TLR5 et de TLR2 et permettre l'activation de Src, de Ras et d'ERK1/2 puis de NFκB induisant la production d'IL-8 (Adamo *et al.*, 2004). Une sortie d'ions Ca²⁺ est également nécessaire pour induire l'activation de ces voies de signalisation.

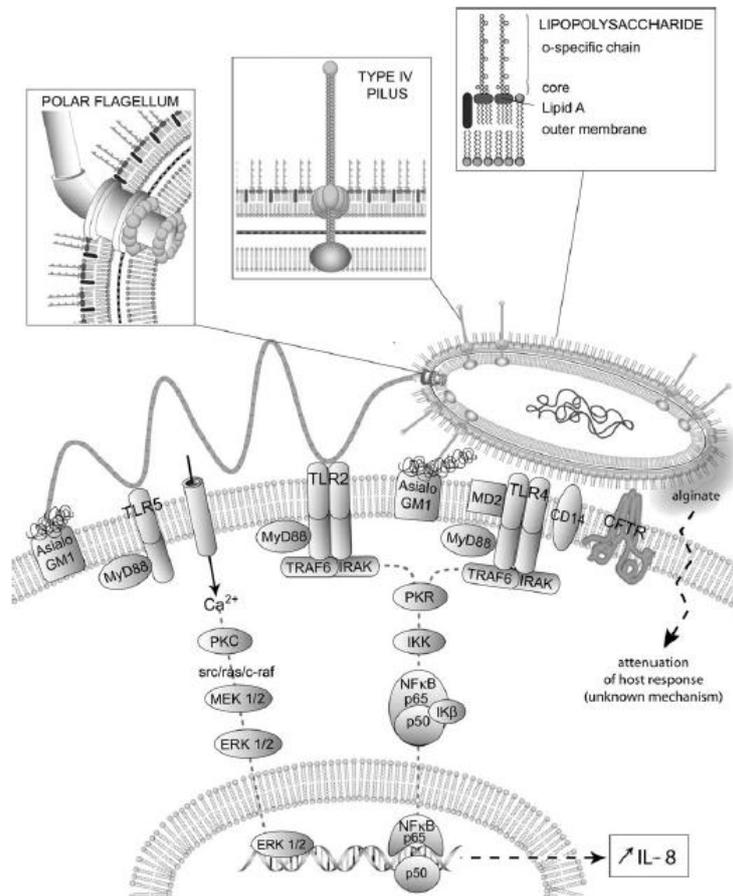


Figure 12 : Principaux TLRs et signalisations impliqués dans la reconnaissance des facteurs de virulence de surface de *P. aeruginosa* (Kipnis *et al.*, 2006)

In vivo, l'engagement des TLR2, TLR4 et TLR5 induit également la sécrétion de KC, d'IL-6, de TNF-α (Raoust *et al.*, 2009). La signalisation par les TLRs est redondante puisque l'absence de TLR2/4 ou de TLR5 ne suffit pas à bloquer la production de cytokines (Raoust *et al.*, 2009; Skerrett *et al.*, 2007). TLR4 jouerait un rôle primordial dans la régulation d'une infection par des souches cytotoxiques de *P. aeruginosa* exprimant l'exotoxine ExoU (Faure *et al.*, 2004).

Il existe également des PRR cytoplasmiques jouant un rôle important pour la défense de l'hôte contre *P. aeruginosa*. L'inflammasome NLRC4 (appelé aussi Ipaf) fait partie de la famille des NLRs (Nod-Like Receptor). La détection de la flagelline ou de composants propres au SST3 de *P. aeruginosa* suffit à activer la caspase-1 via NLRC4 pour permettre la maturation et la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 matures. L'engagement de NLRC4 lors d'une infection à *P. aeruginosa* induit la mort des cellules par pyroptose régulant ainsi la prolifération des bactéries dans les tissus et induisant le recrutement des neutrophiles (cf Introduction §III.1).

II.2.3 - Les intégrines

Les intégrines sont des protéines transmembranaires hétérodimériques formées par l'association non covalente de deux sous unités α et β . La combinatoire α/β détermine la spécificité de chaque intégrine. La stimulation des intégrines après fixation de leurs ligands (principalement des composants de la matrice extracellulaire) engendre une signalisation intracellulaire complexe, en partie liée à un remaniement du cytosquelette d'actine et à l'activation de tyrosine kinases qui aboutissent à la formation de complexes moléculaires appelés plaques d'adhérence focale.

Roger et son équipe ont montré que l'adhérence de *P. aeruginosa* sur le pôle apical des cellules épithéliales de bronches était inhibée en présence d'anticorps bloquants dirigés contre la sous-unité β_1 ou α_5 des intégrines ou contre la fibronectine. Une protéine de la membrane externe de *P. aeruginosa* de masse moléculaire 50 kDa, se lie à la fibronectine. *P. aeruginosa* interagirait par l'intermédiaire de cette dernière avec l'intégrine $\alpha_5\beta_1$. L'intégrine $\alpha_5\beta_1$ est surexprimée et exposée au pôle apical des cellules durant les phases précoces de réparation de l'épithélium (Roger *et al.*, 1999). Des études similaires ont également montré que l'intégrine $\alpha_v\beta_1$ et son ligand la vitronectine jouait un rôle important dans l'adhérence et l'internalisation de *P. aeruginosa* dans les cellules A549 (Leroy-Dudal *et al.*, 2004). La cytochalasine D, inhibiteur de la polymérisation de l'actine, et la génistéine, inhibiteur des tyrosines kinases, bloquent l'adhérence des bactéries aux cellules épithéliales pulmonaires A549 et leur internalisation (Gagniere and Di Martino, 2004; Leroy-Dudal *et al.*, 2004). L'activation de voies de signalisation intracellulaire par les protéines adhésives de la bactérie est donc essentielle pour promouvoir l'adhérence et la pénétration des bactéries dans les cellules.

L'engagement des intégrines par les pathogènes entraîne la stimulation de plusieurs voies de signalisation intracellulaires. Celles régulant les fonctions associées au cytosquelette stabilisent les interactions hôte-pathogène, d'autres induisent une transcription spécifique et l'expression de cytokines, de protéases et de protéines régulées par l'activation de la voie des MAP kinases. Ceci a été particulièrement bien démontré dans le cas de *Y. pseudotuberculosis*. Cette bactérie a développé plusieurs stratégies pour envahir l'épithélium intestinal et coloniser les follicules lymphoïdes ou plaques de Peyer (Marra and Isberg, 1997). *Y. pseudotuberculosis* présente deux protéines adhésives sur sa membrane externe, l'invasine et YadA. Ces deux protéines assurent un contact intime avec la cellule par l'intermédiaire d'interaction de forte affinité avec les intégrines contenant la sous unité β_1 . L'invasine interagit directement avec au moins 5 intégrines différentes, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ et $\alpha_v\beta_1$ (Isberg and Leong, 1990). Le rassemblement des intégrines (« clustering ») induit l'activation d'une cascade de signalisation intracellulaire qui aboutit à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme L'IL-8 et à l'internalisation du pathogène (Eitel *et al.*, 2005).

Plusieurs études ont montré que les tyrosines kinases FAK et Pyk2, la kinase Src et les molécules adaptatrices Cas et Crk intervenaient dans l'initiation du processus d'internalisation (Alrutz and Isberg, 1998; Bruce-Staskal *et al.*, 2002; Weidow *et al.*, 2000). La petite protéine G, Rac1, est également recrutée et activée suite à l'engagement de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ par l'invasine au site de fixation de la bactérie (Alrutz *et al.*, 2001). Rac1 régule le « ruffling » des membranes, la formation de protrusions et la phagocytose, phénomènes faisant intervenir le remaniement de l'actine (Etienne-Manneville and Hall, 2002). L'activation de la phosphoinositol 3 kinase (PI3K), qui permet la formation de PIP3, par une voie impliquant FAK, c-Src et Ras, est également requise pour l'internalisation de *Yersinia* (Eitel *et al.*, 2005). Les effecteurs de la PI3K, la protéine kinase B/Akt, la phospholipase PLC γ 1 et les protéines kinase C (PKCs) sont également impliquées dans le remaniement du cytosquelette d'actine et sont activées par l'interaction de YadA et de l'invasine avec les intégrines (*Figure 13*) (Uliczka *et al.*, 2009). Cependant la PI3K, Akt et les PKCs ne sont pas impliquées pour la production d'IL-8 qui elles, nécessitent l'activation d'une voie Ras-MAP Kinases et MEK1/2-Erk1/2 (Uliczka *et al.*, 2009).

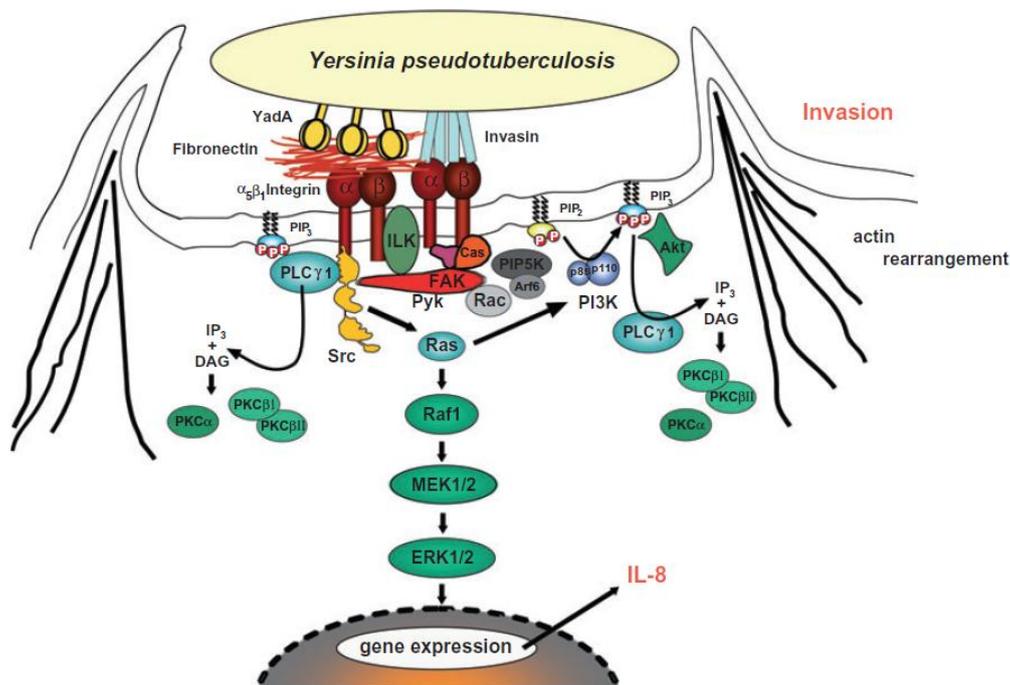


Figure 13 : Signalisation intracellulaire induite par l'interaction entre YadA, l'invasine de *Yersinia* et les intégrines $\beta 1$ de la cellule cible (Uliczka et al., 2009)

II.2.4 - Le CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator)

Un certain nombre d'études montrent que le CFTR joue le rôle de récepteur pour l'invasion des cellules épithéliales par *P. aeruginosa* et peut être considéré comme un PRR. La partie « core » du LPS lie une courte séquence d'acides aminés (aa 108-117) du CFTR (Pier et al., 1996). Un blocage de ce motif ou l'absence de CFTR empêche l'internalisation de *P. aeruginosa* dans les cellules épithéliales (Pier et al., 1997; Schroeder et al., 2001). Le CFTR est localisé au site de fixation de la bactérie à la surface apicale des cellules épithéliales pulmonaires au niveau de structures lipidiques particulières dans les radeaux lipidiques, les cavéolae où il colocalise avec la cavéoline. Cette dernière semble requise pour l'internalisation de *P. aeruginosa* (Bajmoczy et al., 2009; Zaidi et al., 2008). La liaison du

LPS de *P. aeruginosa* au CFTR induit l'activation des kinases de la famille Scr telles que p60Scr et p59Fyn (Esen *et al.*, 2001).

Le CFTR jouerait également un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire innée. La production rapide d'IL-1 et la signalisation par le récepteur de l'IL-1 sont des éléments clés de la réponse à l'infection par *P. aeruginosa* et n'ont pas lieu dans les cellules n'exprimant pas de CFTR fonctionnel (Reiniger *et al.*, 2007). L'engagement du CFTR avec le LPS induit également l'activation de NFκB et la sécrétion de cytokines telles que l'IL-6 et l'IL-8 (Campodonico *et al.*, 2008). Mais la persistance de *P. aeruginosa* dans les poumons de patients n'exprimant pas de CFTR fonctionnel entraîne une réaction inflammatoire exacerbée caractérisée par une forte production de cytokines, la mort par nécrose des neutrophiles etc...(Campodonico *et al.*, 2008). Une déficience en CFTR induit un déséquilibre dans le métabolisme des sphingolipides qui a pour conséquence une augmentation de la concentration en céramides dans les membranes de cellules cibles. L'accumulation des céramides induirait cette inflammation chronique (Becker *et al.*, 2010a; Becker *et al.*, 2010c).

Le CFTR joue également un rôle dans l'acidification des phagolysosomes des macrophages en transportant des ions Cl⁻ contre des ions H⁺. L'absence de CFTR empêcherait donc la diminution du pH dans les compartiments lysosomaux bloquant ainsi la destruction de *P. aeruginosa* phagocyté (Deriy *et al.*, 2009; Di *et al.*, 2006). La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) via la NADPH oxydase est également diminuée si le CFTR n'est pas exprimé ou n'est pas fonctionnel (Zhang *et al.*, 2010). Dans les neutrophiles, un CFTR déficient bloque la production de HOCl, empêchant ainsi l'élimination de la bactérie (Painter *et al.*, 2006). Les macrophages issus de patient atteints de mucoviscidose produisent une quantité beaucoup plus importante de cytokines pro-inflammatoires quand ils sont stimulés par le LPS (Bruscia *et al.*, 2009). Les macrophages joueraient aussi un rôle important dans l'augmentation du contexte inflammatoire des poumons de patients atteints de mucoviscidose.

II.2.5 - Les radeaux lipidiques enrichis en céramides

Le contact des bactéries avec la membrane plasmique des cellules cibles se produit préférentiellement au niveau de micro-domaines enrichis en cholestérol et sphingolipides appelés radeaux lipidiques (RL). Grassmé et son équipe ont montré très clairement que le contact de *P. aeruginosa* avec la cellule cible induit le recrutement à la membrane et

l'activation de la sphingomyélinase acide (ASM), dont la fonction est d'hydrolyser la sphingomyéline en céramide (Grassme *et al.*, 2003). Un enrichissement des radeaux lipidiques en céramides se produit, induisant une redistribution dynamique des micro-domaines lipidiques de la membrane plasmique et le regroupement de récepteurs (*Figure 14*). Ce mécanisme a été également observé dans le cas d'une infection à *Neisseriae gonorrhoeae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* et *Mycobacterium avium* (Becker *et al.*, 2010a).

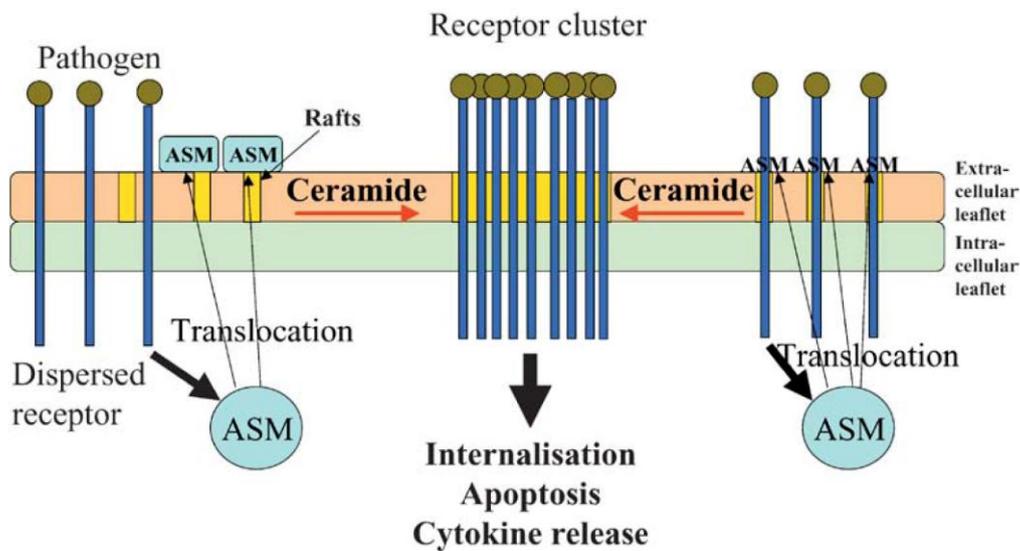


Figure 14 : Mécanisme d'enrichissement et de regroupement des radeaux lipidiques des cellules eucaryotes après une infection par *P. aeruginosa* (Gulbins *et al.*, 2004)

Ces plateformes enrichies en céramides induisent le regroupement du récepteur CD95, du CFTR ainsi que d'aGM1 et permettraient l'internalisation des bactéries, réguleraient la production de cytokines pro-inflammatoires et induirait la mort des cellules par apoptose (Grassme *et al.*, 2003; Grassme *et al.*, 2000). L'absence d'ASM induit une diminution de la quantité de céramides. Les souris *asm^{-/-}* sont beaucoup plus sensibles aux infections par *P. aeruginosa* (Grassme *et al.*, 2003). L'enrichissement des membranes en céramides s'effectue dans les radeaux lipidiques (RL). La déstabilisation de l'intégrité des RL par la méthyl- β -cyclodextrine, la nystatine ou la filipine bloque l'internalisation de *P. aeruginosa* et l'apoptose des cellules épithéliales (Grassme *et al.*, 2003). L'enrichissement des RL en céramides est donc considéré comme une défense de l'hôte contre *P. aeruginosa*.

L'absence de CFTR induit l'augmentation de la concentration en céramides dans les membranes. Une importante hausse de la sécrétion de cytokines est observée, entraînant une

inflammation exacerbée des tissus (Becker *et al.*, 2010a; Becker *et al.*, 2010c ; Teichgraber *et al.*, 2008). La présence des céramides est donc essentielle pour initier une réponse contre *P. aeruginosa*. Cependant, la quantité de céramides est également à prendre en compte puisque l'absence ou une quantité trop importante de céramides dans les membranes n'est pas bénéfique pour les cellules cibles (Becker *et al.*, 2010a).

L'inhalation d'inhibiteurs de l'ASM tels que l'amitriptyline, la trimipramine, la désipramine, la chlorprothixène dans les poumons des souris atteintes de mucoviscidose restaure une concentration normale en céramide qui a pour effet de réduire l'inflammation et diminue l'infection par *P. aeruginosa* (Becker *et al.*, 2010b).

II.2.6 - L'activation de voies de transduction du signal

L'activation de voies de transduction du signal est impliquée dans l'invasion par *P. aeruginosa*. Une analyse par ARN interférence suggère que la tyrosine kinase Abl, l'adaptateur Crk, les petites GTPases et PAK1 jouent un rôle majeur dans l'entrée de *P. aeruginosa* dans des cellules S2 de drosophile (Pielage *et al.*, 2008). D'autres études suggèrent que plusieurs kinases joueraient également un rôle dans l'internalisation de *P. aeruginosa* dans les cellules épithéliales. Il a été décrit que les kinases de la famille des Src telles que p60Src et p59Fyn sont activées lors d'un contact entre la bactérie et le CFTR des cellules cibles (Esen *et al.*, 2001). Kannan et son équipe ont également décrit que la kinase Lyn est localisée dans les radeaux lipidiques de la cellule cible au niveau du point de contact avec *P. aeruginosa*. Lyn est ainsi phosphorylée et induit l'activation des PI3K et de Akt, permettant par la suite l'internalisation de *P. aeruginosa* dans les cellules épithéliales (Kannan *et al.*, 2008; Kannan *et al.*, 2006). Le traitement des cellules en présence de génistéine (inhibiteur des tyrosines kinases), de PP2 (inhibiteur des Src kinases) ou encore de mévastatine (qui bloque la fonction des radeaux lipidiques), diminue fortement l'invasion de *P. aeruginosa* dans les cellules épithéliales et la phagocytose des macrophages (Evans *et al.*, 1998; Kannan *et al.*, 2008). La liaison de TLR2 avec les bactéries serait nécessaire pour induire l'activation de lyn (Kannan *et al.*, 2006). Pour le moment, aucun lien n'a été retrouvé entre l'activation de lyn et le recrutement de PIP3 sur le pôle basal des cellules épithéliales infectées par *P. aeruginosa*.

III - Les réponses cellulaires en lien direct avec le SST3

La majorité des études ont mis en évidence des réponses cellulaires de l'hôte lors de l'adhérence et de l'invasion de *P. aeruginosa*. L'effet des toxines du SST3 a été également bien étudié *in vitro* et *in vivo*. En revanche, on connaît peu de chose sur les réponses cellulaires en lien direct avec le SST3.

III.1 - Activation de l'inflammasome

Le contact de *P. aeruginosa* avec les cellules cibles induit l'activation de l'inflammasome NLRC4 et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et l'IL-18 (Franchi *et al.*, 2007; Galle *et al.*, 2008; Miao *et al.*, 2008; Sutterwala *et al.*, 2007). Appelé également Ipaf, NLRC4 fait partie de la famille Nod-like receptor (NLR), senseur intracellulaire capable de détecter des bactéries et/ou des molécules issues de bactéries dans les cellules cibles (Sutterwala and Flavell, 2009).

Au contact de *P. aeruginosa*, NLRC4 recrute la procaspase-1 qui par la suite subit une coupure protéolytique pour acquérir une forme mature, la caspase-1. A son tour, la caspase-1 clive les interleukines immatures pro-IL-1 β et pro-IL-18 en interleukines matures IL-1 β et IL-18 qui sont sécrétées dans le milieu extracellulaire. L'activation de NLRC4 induit également un mécanisme de mort cellulaire appelé pyroptose, forme de mort cellulaire située entre l'apoptose et la nécrose, caractérisée par le relargage de cytokines pro-inflammatoires et la destruction des membranes plasmiques (Miao *et al.*, 2010a; Miao *et al.*, 2011).

L'expression de la flagelline et du SST3 semblent nécessaires à l'activation de l'inflammasome. Des souches bactériennes qui présentent des mutations dans le SST3 ou dans la flagelline ne sont plus capables d'activer la caspase-1 ou d'induire la production d'IL-1 β , ce qui suggère que la flagelline serait injectée dans la cellule par le SST3 de *P. aeruginosa* (Franchi *et al.*, 2007 ; Galle *et al.*, 2008 ; Miao *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2007). Cette observation est cependant controversée car Sutterwala et son équipe n'observent pas l'implication de la flagelline dans le processus d'activation de NLRC4 (Sutterwala *et al.*, 2007). L'activation de la caspase-1 via NLRC4 a été également montrée avec d'autres bactéries pathogènes Gram négatives comme *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* qui

expriment un SST3 ou *Legionella pneumophila* qui exprime un SST4 (Case *et al.*, 2009; Miao *et al.*, 2010a; Miao and Rajan, 2011; Skeldon and Saleh, 2011; Suzuki *et al.*, 2007).

Une souche de *P. aeruginosa* dépourvue de flagelle mais exprimant un SST3 fonctionnel est encore capable d'activer NLR4. Selon Miao, ce sont les protéines du corps basal du SST3, nommées « rod proteins » qui seraient responsables de l'activation de NLRC4. Ces protéines possèdent des homologies de séquences avec la partie C-terminale de la flagelline (Miao *et al.*, 2010b; Miao and Warren, 2010). Une sortie de potassium (K^+) à l'extérieur des cellules cibles est nécessaire pour induire l'activation de NLRC4. L'incubation des cellules en présence d'une importante quantité de KCl ou en présence de glybenclamide, inhibiteur des canaux potassiques dépendant de l'ATP, bloque l'activation de NLRC4 (Arlehamn *et al.*, 2010). Le pore de translocation est imperméable aux ions. La sortie des ions K^+ s'effectuerait donc via des canaux spécifiques et non par le translocon du SST3 inséré dans les membranes.

Un mécanisme de production en deux étapes de l'IL-1 β et de l'IL-18 a été proposé pour les bactéries exprimant un SST3 ou SST4 (*Figure 15*). La flagelline extracellulaire interagit avec le TLR5 pour induire l'expression de pro-IL-1 β et pro-IL-18 immatures. Si une bactérie pathogène exprime un SST3 ou un SST4, la flagelline est alors injectée dans les cellules cibles ce qui induit l'activation du couple NLRC4/caspase-1 et la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 matures (*Figure 15*). Ce mécanisme permettrait aux cellules de distinguer les bactéries virulentes exprimant un SST3 ou SST4, des bactéries non virulentes qui n'expriment pas ces deux systèmes.

L'activation de l'inflammasome est régulée par les toxines injectées par le SST3. Le domaine ADPRT de ExoS et la phospholipase ExoU de *P. aeruginosa* sont capables d'inhiber l'activation de l'inflammasome (Galle *et al.*, 2008; Sutterwala *et al.*, 2007). *In vivo*, l'infection des souris avec des souches exprimant un SST3 induit l'activation de la caspase-1 et la sécrétion d'IL-1 β , ce qui permet de discriminer les souches virulentes qui expriment un SST3, des souches avirulentes n'exprimant pas de SST3 (Wangdi *et al.*, 2010).

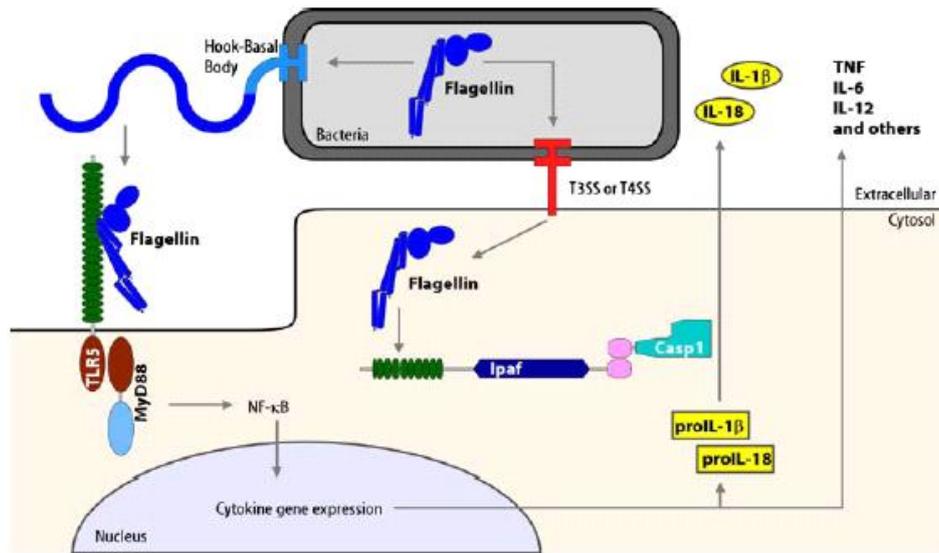


Figure 15 : Rôle de la flagelline et SST3 et SST4 dans la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 par les cellules cibles via l'activation de l'inflammasome NLRC4 (Ipaf) et de TLR5 (Miao et al., 2007)

TLR5 interagit avec la flagelline extracellulaire et induit l'expression de pro-IL-1 β et pro-IL-18 immatures via NF κ B. La flagelline est également injectée par le SST3 ou SST4 au contact des cellules cibles. L'inflammasome NLRC4 est activé et recrute la caspase-1 qui à son tour clivera la pro-IL-1 β et la pro-IL-18 piégées dans le cytosol en IL-1 β et IL-18 matures, qui seront par la suite sécrétées dans le milieu extracellulaire.

Chez *Yersinia*, l'activation de la caspase-1 est induite par les inflammasomes NLPR3 et NLRC4 dans les cellules cibles (Brodsky et al., 2010). Il a été montré récemment que l'effecteur YopK interagirait avec le translocon empêchant la reconnaissance du SST3 par l'inflammasome (Brodsky et al., 2010).

NLRP3 est un NLR qui peut détecter la présence de toxines capables de former des pores dans les membranes plasmiques des cellules cibles telles que l'aerolysine de *Aeromonas hydrophila*, la listériolysine O de *Listeria monocytogenes* ou encore l' α -toxine de *Staphylococcus aureus*. Comme NLRC4, il induit également l'activation de la caspase-1 et la sécrétion d'IL-1 β et IL-18. La sécrétion de K⁺ est également nécessaire à son activation (Gurcel et al., 2006; Petrilli et al., 2007). Le translocon du SST3 est capable de former des pores pour permettre le passage des toxines dans le cytoplasme des cellules. Dans le cas de *P. aeruginosa*, aucune étude n'a permis de montrer que le translocon induisait l'activation de NLRP3.

III.2 - Insertion du translocon dans les membranes plasmiques et signalisation dans les cellules cibles

Les protéines du translocon PopB et PopD ont la capacité de s'oligomériser entre elles et s'insèrent dans les bicouches lipidiques des liposomes ou dans les membranes plasmiques des cellules eucaryotes (cf. Introduction §I.3.3.1.3) (Goure *et al.*, 2004; Schoehn *et al.*, 2003). PcrV n'est pas retrouvé dans les membranes plasmiques des cellules cibles mais sa présence est indispensable pour permettre l'insertion de PopB/PopD et la formation d'un translocon fonctionnel capable d'injecter des exotoxines (Goure *et al.*, 2004).

Différentes études ont montré l'importance de la composition lipidique des membranes dans l'insertion du pore de translocation. Il est clairement établi que le translocon du SST3 de bactéries d'espèces différentes se lie préférentiellement avec le cholestérol *in vitro* (Hayward *et al.*, 2005; Schoehn *et al.*, 2003). L'utilisation d'un chélateur du cholestérol, la Me β CD, a permis de montrer que l'insertion du translocon de *Shigella* ou *Salmonella* ou *E. coli* entéropathogène se réalisait dans les radeaux lipidiques des cellules eucaryotes (Hayward *et al.*, 2005; van der Goot *et al.*, 2004).

Les radeaux lipidiques jouent un rôle important dans le regroupement des récepteurs de surface pour induire des signaux à l'intérieur de la cellule. Chez *Shigella*, le translocateur IpaB (homologue de PopB) interagit avec CD44 aux niveaux des radeaux lipidiques (Lafont *et al.*, 2002; Skoudy *et al.*, 2000). Cette interaction ne joue cependant aucun rôle dans l'induction de l'injection de toxines dans les cellules cibles (van der Goot *et al.*, 2004). IpaC (homologue de PopD) induit l'activation des GTPases Rac, cdc42 et des kinases Scr permettant à la bactérie de pénétrer dans les cellules par un mécanisme d'invagination des membranes qui dépend de l'actine (Mounier *et al.*, 2009; Nhieu *et al.*, 2005). Watarai a montré que l'interaction des protéines du translocon avec les intégrines $\alpha_5\beta_1$ induit l'activation de la kinase FAK (Focal Adhesion Kinase) et de la paxilline nécessaires à l'invasion de *Shigella* dans les cellules (Watarai *et al.*, 1996).

En plus des effecteurs, certaines bactéries pathogènes injectent les translocateurs dans les cellules cibles. SipC (homologue de PopD) de *Salmonella* est capable d'induire la nucléation de l'actine dans le cytoplasme des cellules (Chang *et al.*, 2005; Hayward and Koronakis, 1999). L'interaction de la caspase-1 et de IpaB au niveau des radeaux lipidiques des cellules a été observée (Hilbi *et al.*, 1998; Schroeder and Hilbi, 2007). Un traitement des cellules en présence de Me β CD diminue la quantité de IpaB associée aux membranes,

bloquant ainsi l'activation de la caspase-1 (Schroeder and Hilbi, 2007). Thirumalai et son équipe ont montré toutefois que IpaB est localisé dans le cytoplasme des cellules pour interagir avec la caspase-1 (Thirumalai *et al.*, 1997). Dans le cas de *P. aeruginosa*, Galle suggère que PopB serait impliqué dans l'activation de l'inflammasome NLRC4 (Galle *et al.*, 2008). Contrairement aux autres pathogènes cités précédemment, aucune étude n'a pour le moment montré l'injection des translocateurs PopB et PopD du SST3 de *P. aeruginosa* dans les cellules cibles.

III.3 - Régulation de la fonctionnalité du translocon par des réponses cellulaires

Le SST3 doit être positionné au plus près de la membrane pour que les protéines PopB et PopD soit insérées dans la membrane et forment le pore de translocation. Après la formation du translocon dans les membranes, la sécrétion des effecteurs est déclenchée. S'il est admis qu'il doit exister un mécanisme de reconnaissance de la cellule cible et sans doute une signalisation pour permettre la sécrétion, ceux-ci n'ont pas encore été clairement définis chez *P. aeruginosa*.

Dans le cas de *Shigella*, il a été proposé qu'un changement de conformation des protéines du sommet de l'aiguille pourrait se propager jusqu'à la base de l'injectisome pour induire l'injection des effecteurs (Veenendaal *et al.*, 2007). Pour le moment, aucun élément de la cellule hôte qui permettrait d'induire ces changements structuraux n'a été identifié.

Chez *Yersinia*, il semble établi que la translocation des effecteurs est contrôlée par des facteurs eucaryotes, dont la nature reste toutefois inconnue, et modulée par les effecteurs tels que YopK, YopE (Dewody *et al.*, 2011; Holmstrom *et al.*, 1997; Mejia *et al.*, 2008). YopK modifierait la taille du pore de translocation formé par YopB et YopD (Holmstrom *et al.*, 1997). YopE et YopT présentent des homologies avec ExoS et ExoT de *P. aeruginosa* et possèdent une activité GAP sur les GTPases RhoA, Rac et Cdc42. Après translocation de YopE, les cellules perdent les structures en filaments d'actine, s'arrondissent et se détachent de la matrice extracellulaire (Bliska, 2000). La cytotoxicité de bactéries n'exprimant pas l'effecteur YopE, mesurée par le relargage de LDH par les cellules, est beaucoup plus importante que celle d'une souche sauvage exprimant toutes les exotoxines (Viboud and Bliska, 2001). L'infection avec les souches dépourvues de YopE et YopT entraîne la formation de pore et donc la perte de l'intégrité de la membrane. Chez les mutants dépourvus

de YopE et YopK on observe une hypertranslocation des autres effecteurs Yop (Aili *et al.*, 2008). La complémentation de ces souches avec les effecteurs ExoS et ExoT de *P. aeruginosa* restaure le phénotype (Aili *et al.*, 2008). Les effecteurs détournent la machinerie intracellulaire de l'hôte pour empêcher la réaction pro-inflammatoire. Les macrophages infectés par *Yersinia enterocolitica* ne sécrètent pas d'IL-1 β , alors que ceux infectés par une souche dépourvues d'effecteurs en produisent (Shin and Cornelis, 2007). De même, les cellules HeLa infectées par un triple mutant *yopEHJ* produisent plus d'IL-8 que celles infectées par une souche sauvage (Mejia *et al.*, 2008; Viboud *et al.*, 2003). Ces effecteurs sont donc capables de réguler l'activité du translocon, empêchant ainsi l'injection des toxines dans les cellules cibles.

Dans le cas de *P. aeruginosa*, il a été montré que l'exotoxine ExoS contrôle négativement la translocation des toxines et donc sa propre translocation (Cisz *et al.*, 2008). Les deux activités GAP et ADPRT d'ExoS sont nécessaires pour cette inhibition de la translocation. Ceci sous-entend que des facteurs cellulaires qui seraient inactivés par ExoS sont sans doute impliqués dans la régulation de la translocation.

Les liaisons de haute affinité de YadA et de l'invasine de *Yersinia* avec les intégrines activent Rac et Rho (cf Introduction §II.2.3). L'insertion dans les membranes de YopB et YopD déclencherait un signal qui coopérant avec la signalisation par les intégrines renforcerait l'activation de Rho (*Figure 16*) (Mejia *et al.*, 2008; Viboud and Bliska, 2001). La polymérisation de l'actine qui résulte de l'activation de Rho induirait le rassemblement de radeaux lipidiques au niveau du site de contact avec la bactérie. Une quantité plus grande d'injectisome interagirait alors avec les radeaux lipidiques et une plus grande quantité d'effecteurs Yop serait transloquée dans la cellule. Dès que suffisamment d'effecteurs ont été transloqués, le processus s'inverserait du fait de l'activité inhibitrice de YopE et YopT sur les GTPases.

L'ensemble de ces données montrent l'existence d'un dialogue entre les bactéries et les cellules cibles faisant appel à des mécanismes et voies de signalisation nécessaires à l'induction de la fonctionnalité du pore de translocation et à l'injection de toxines par le SST3. Dans le cas de *P. aeruginosa*, les réponses cellulaires conduisant à la fonctionnalité du translocon n'ont pour le moment pas été élucidées.

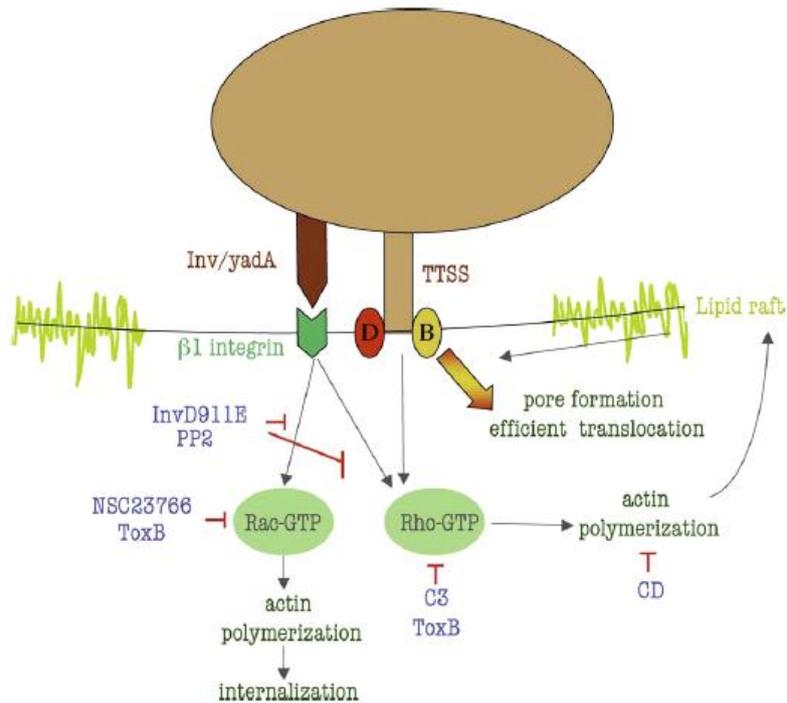


Figure 16 : Induction de la fonctionnalité du translocon du SST3 de Yersinia (Mejia et al., 2008)

Au contact de la cellule cible, *YadA* interagit avec les intégrines β_1 . *Rho* est alors activé et induit la polymérisation du cytosquelette d'actine sous la membrane plasmique au niveau des radeaux lipidiques. L'insertion du pore est alors possible et permet l'injection des effecteurs dans les cellules cibles. *PP2* : inhibiteur des kinases de la famille *Src* ; *ToxB* (Toxine B de *Clostridium difficile*) : inhibiteur de *Rho*, *Rac* et *cdc42* ; *CD* : cytochalasine *D* : inhibiteur de la polymérisation de l'actine; *InvD911E* : *YadA* dont le motif *RGD* a été modifié en substituant l'acide aspartique par l'acide glutamique en position 911 (*D911E*), altérant ainsi sa capacité de fixation aux intégrines; *NCS23766* : inhibiteur de *Rac1*.

IV - Objectif du travail de thèse

En 2005, Rucks décrivait la modification des petites GTPases induite par l'activité ADPRT d'ExoS suite à l'infection avec la souche P388 de *P. aeruginosa* des cellules HL-60 non différenciées (ND). De façon surprenante, les GTPases de la famille Ras, Rab et Rac n'étaient pas modifiées. En revanche, les cellules HL-60 différenciées en présence de TPA (Phosbol-12-Myristate-13-Acetate) devenaient sensibles aux effets toxiques d'ExoS, caractérisés par l'ADP-ribosylation des GTPases (Rucks and Olson, 2005).

Au début de mes travaux, la lignée HL-60 ND était le seul type cellulaire connu pour être résistant à l'injection d'ExoS. En 2008, Mejia et son équipe ont identifié des voies de signalisations dans les cellules eucaryotes cibles importantes pour l'injection de toxines chez *Yersinia*. En effet, les auteurs ont montré que des GTPases de types Rho sont nécessaires pour permettre l'injection des effecteurs (Mejia *et al.*, 2008). Dans le cas de *Shigella*, des études ont montré que le sommet de l'aiguille joue un rôle de senseur lors d'un contact avec les cellules cibles. Il interagit avec des molécules des cellules cibles pour induire des changements de conformation de l'injectisome et permettre le passage des toxines dans les cellules (Blocker *et al.*, 2008). L'ensemble de ces résultats confirmaient donc l'implication de molécules et/ou de voies de signalisation dans les cellules eucaryotes pour induire l'injection des toxines par le SST3.

Dans le cas de *P. aeruginosa*, aucune étude n'avait encore identifié les mécanismes cellulaires impliqués dans l'injection. La lignée HL-60 constituait donc un modèle cellulaire pertinent pour notre étude. En effet, l'intérêt était de disposer d'une même lignée cellulaire à deux stades de différenciation, un résistant et l'autre sensible à l'injection des effecteurs. Cette différence de sensibilité devrait permettre de caractériser les molécules et les mécanismes cellulaires qui induisent l'injection des exotoxines par le SST3 de *P. aeruginosa*.

Plusieurs approches ont été utilisées :

- Mise au point d'un système rapporteur de l'injection de toxines
- Recherche des protéines du translocon dans les membranes plasmiques des cellules
- Identification des molécules et des voies de signalisation permettant d'induire l'injection des effecteurs
- Acquisition de la susceptibilité à l'injection des cellules HL-60 ND

MATERIELS ET METHODES

I - Bactéries et plasmides

I.1 - Répertoire des bactéries et plasmides utilisés

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés pour réaliser les expériences décrites dans ce manuscrit sont décrits dans le Tableau 1 et le Tableau 2. Les constructions et les souches n'ayant pas fait l'objet de publication sont référencées sous l'intitulé « Laboratoire ». Les souches de *P. aeruginosa* utilisées dérivent soit de la souche CHA, isolat clinique d'un patient atteint de la mucoviscidose (Toussaint *et al.*, 1993) soit de la souche PAO1F.

Souches	Description	Références
CHA	Souche mucoïde isolée des voies broncho-pulmonaires d'un patient atteint de mucoviscidose. Produit les exotoxines ExoS, ExoT et ExoY.	(Toussaint <i>et al.</i> , 1993)
CHAΔS	Souche CHA dont le gène <i>exoS</i> a été inactivé par insertion d'une cassette de résistance à la gentamycine (Gm ^R).	Laboratoire
CHAΔBD	Souche CHA dont les gènes <i>popB</i> et <i>popD</i> ont été inactivés par insertion d'une cassette de résistance à la gentamycine (Gm ^R).	(Goure <i>et al.</i> , 2004)
PAO1F	Souche PAO1 de référence. Produit les exotoxines ExoS, ExoT et ExoY.	(Cisz <i>et al.</i> , 2008)
PAO1FΔ3TOX	Souche PAO1F dont les gènes <i>exoS</i> , <i>exoT</i> et <i>exoY</i> ont été délétés.	(Cisz <i>et al.</i> , 2008)

Tableau 1 : Souches bactériennes utilisées dans cette étude

Plasmides	Description	Référence
<i>pIApCexoS-bla</i>	Fusion transcriptionnelle entre le promoteur de l'opéron <i>exsCEBA</i> (<i>pC</i>) et le gène <i>exoS-bla</i> . Cb ^R .	(Vérove <i>et al</i> , En révision)
<i>pIApCexoS_{R146A}-bla</i>	Fusion transcriptionnelle entre le promoteur de l'opéron <i>exsCEBA</i> (<i>pC</i>) et le gène <i>exoS_{R146A}-bla</i> . Cb ^R .	(Vérove <i>et al</i> , En révision)
<i>pIApCexoY-bla</i>	Fusion transcriptionnelle entre le promoteur de l'opéron <i>exsCEBA</i> (<i>pC</i>) et le gène <i>exoY-bla</i> . Cb ^R .	(Vérove <i>et al</i> , En révision)
<i>pIApx2gfp</i> (<i>pIApX2</i>)	Fusion transcriptionnelle entre le promoteur pX2 et le gène <i>gfp</i> . Cb ^R .	(Thibault <i>et al.</i> , 2009)
<i>pIApCgfp</i> (<i>pIApC</i>)	Fusion transcriptionnelle entre le promoteur de l'opéron <i>exsCEBA</i> (<i>pC</i>) et le gène <i>gfp</i> . Cb ^R .	(Dacheux <i>et al.</i> , 2001a)

Cb^R : Résistance à la Carbénicilline

Tableau 2 : Plasmides utilisés dans cette étude

I.2 - Culture de *P. aeruginosa*

I.2.1 - Généralités

Toutes les souches ont été cultivées à 37 °C en milieu LB (Luria Bertani) ou PIA (Pseudomonas Isolation Agar ; DIFCO, Détroit, USA) solide ou liquide en condition aérobie supplémenté ou non en antibiotiques de sélection. Pour 1 litre de culture, le milieu LB contient 10 g de Bactotryptone, 5 g d'extrait de levure et 10 g de NaCl. 15 g d'agar sont ajoutés pour préparer le milieu gélosé. Le milieu PIA est composé pour 1 litre, de 20 g de Peptone, 1,4 g de MgCl₂, 10 g de K₂SO₄, 13,6 g d'agar, 20 ml de glycérol et de 0,025 g d'IRGASANTM. L'IRGASANTM est un antimicrobien à large spectre qui n'affecte pas la croissance de *P. aeruginosa*.

Après culture sur milieu gélosé, les bactéries sont conservées au maximum une semaine à 4 °C. Dans toutes les expériences nécessitant la standardisation du nombre de bactéries, une densité optique à 600 nm (DO_{600nm}) de 1 en milieu liquide est assimilée à 6.10⁸ bactéries par ml.

I.2.2 - Utilisation d'antibiotique

Les solutions sont stérilisées par filtration sur filtre Millipore de 0,22 µm. La carbénicilline est utilisée à 300 µg/ml pour la culture en milieu liquide de CHA et de PAO1F. Pour la culture sur gélose, elle est utilisée à 500 µg/ml pour CHA et à 300 µg/ml pour PAO1F.

I.2.3 - Conservation des souches de *P. aeruginosa*

Les souches de *P. aeruginosa* sont conservées à - 80 °C dans du milieu LB contenant 40 % (p/v) de glycérol et en présence de billes sur lesquelles les bactéries se fixent.

I.3 - Induction du SST3

Des pré-cultures de différentes souches de *P. aeruginosa* sont réalisées durant une nuit dans du milieu LB ou PIA contenant ou non des antibiotiques. Le lendemain, l'absorbance est mesurée. La pré-culture est diluée à une DO_{600nm} de 0,1 dans du LB contenant 20 mM de $MgCl_2$ et 5 mM d'EGTA afin de chélater le calcium pour permettre l'induction du SST3. La culture est menée jusqu'à une DO_{600nm} de 1.

I.4 - Transformation de *P. aeruginosa* par choc thermique

Les bactéries sont rendues compétentes par traitement au calcium et transformées par traitement thermique comme indiqué ci-après. 1 ml de culture de *P. aeruginosa* en phase stationnaire de croissance est centrifugé 1 min à 13 000 g. Le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans 1 ml de $MgCl_2$ 0,1 M à 4 °C. Après une nouvelle centrifugation de 1 min à 13 000 g, le culot est remis en suspension dans 1 ml d'une solution TG-salt à 4 °C ($CaCl_2$ 75 mM, $MgCl_2$ 6 mM et glycérol 15 % (p/v)). Les échantillons sont incubés 10 min à 4 °C. Après une centrifugation de 1 min à 13 000 g, le culot est remis en suspension dans 200 µl de TG-salts à 4 °C. 100 µl de cette suspension de bactéries devenues compétentes sont transférés dans un tube où sont ajoutés 100 à 1000 ng de plasmide (dilué dans de l'eau). Les échantillons sont incubés 15 min à 4 °C puis transférés 2 min dans un bain-marie à 37 °C. Ensuite, les bactéries sont immédiatement mises en présence de 500 µl de

LB puis incubées 1 h à 37 °C et à 200 rpm. Les bactéries sont ensuite étalées sur gélose PIA en présence de l'antibiotique de sélection pendant une nuit à 37 °C. Les colonies observées le lendemain correspondent aux bactéries ayant incorporé le plasmide.

II - Techniques de biochimie

II.1 - Dosage de protéines

Les protéines totales d'un échantillon sont dosées par la méthode de Bradford. Ce dosage colorimétrique est basé sur le changement d'absorbance à 595 nm du bleu de Coomassie lorsqu'il se lie aux acides aminés aromatiques et hydrophobes des protéines. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, directement proportionnel à la concentration en protéines de l'échantillon. La concentration en protéines est déterminée par comparaison avec une gamme étalon de sérum-albumine de bœuf (SAB) de concentration comprise entre 0 et 1 mg/ml, dosée dans les mêmes conditions. Le volume de l'échantillon de protéines à doser est de 15 µl. A cela s'ajoute 750 µl de réactif de Bradford. Après une incubation de 1 h à 37 °C, l'absorbance est lue à 595 nm.

II.2 - Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

Les protéines migrent à travers un gel constitué de polyacrylamide en présence de SDS (Sodium Dodécylsulfate Sodium). Les protéines dénaturées et chargées négativement par le SDS migrent selon leur masse moléculaire. Le gel de polyacrylamide est constitué d'un gel de « concentration » et d'un gel de « séparation ». Le pourcentage d'acrylamide du gel de séparation peut varier selon la masse de la protéine à analyser, les concentrations utilisées sont présentées dans le Tableau 3. Les échantillons sont traités en condition dénaturante et réductrice dans un tampon Leammli (1X : Tris-HCl 50 mM, SDS 4 % (p/v), β-mercaptoéthanol 10 % (v/v), glycérol 40 % (v/v) et Bleu de bromophénol 0,04 % (p/v), pH 6,8) et chauffés 5 min à 100 °C puis déposés sur le gel. La migration est réalisée à 30 mA dans un tampon Tris-Glycine (Tris 25 mM, Glycine 200 mM et SDS 0,1 %, pH 8,3).

	Gel de		
	concentration	Gel de séparation	
Concentrations des gels	5 %	10 %	12 %
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 (μ l)	10	4	4

Tableau 3 : Composition des gels d'acrylamide

II.2.1 - Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose ou PVDF

Les protéines contenues dans le gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose ou de PVDF (Polyfluorure de Vinylidène, Amersham). La fixation des protéines à la membrane se fait grâce à des interactions hydrophobes et ioniques entre la membrane et les protéines. Avant le transfert, la membrane de PVDF doit être trempée dans de l'éthanol 100 % puis déposée dans le tampon de transfert (Tris 25 mM, Glycine 200 mM, Ethanol 20 %, pH 8,3). Les différentes membranes sont placées dans l'ordre suivant : Cathode, feuille de papier Whatman, gel de protéine, membrane de nitrocellulose ou PVDF, feuille de papier Whatman, anode. Le transfert s'effectue pendant 90 min sous une intensité constante de 125 mA.

II.2.2 - Immunodétection

L'électrotransfert terminé, la membrane est saturée pendant 1 h à température ambiante sous agitation dans un tampon TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 138 mM, KCl 2,7 mM, pH 8,0) contenant 5 % (p/v) de lait demi-écrémé ou de 1 mg/ml de SAB (sérum albumine bovine, fraction V). La membrane est ensuite lavée 10 min avec un tampon TBS contenant 0,1 % de Tween 20 (TBST) puis incubée 1 h à température ambiante ou une nuit à 4 °C sous agitation en présence d'anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt (*Tableau 4*).

Anticorps	Dilution	Source
Anti-PcrV	1/5000 ^{ème}	Anticorps polyclonaux de lapin purifiés par chromatographie d'affinité, obtenus au laboratoire.
Anti-PopB	1/1000 ^{ème}	
Anti-PopD	1/1000 ^{ème}	Anticorps polyclonaux de lapin purifiés par chromatographie d'affinité sur protéine A-Sepharose, obtenus au laboratoire.
Anti-β-lactamase	1/1000 ^{ème}	Anticorps polyclonaux de lapin (Millipore)
Anti-Pyk2	1/1000 ^{ème}	Anticorps polyclonaux de lapin (Cell Signaling Technology)
Anti-RpoA	1/1000 ^{ème}	Anticorps monoclonaux de souris (Neoclone Biotechnology)
Anti-flottiline-1	1/200 ^{ème}	Anticorps polyclonaux de lapin (Santa Cruz Biotechnolgy)

Tableau 4 : Anticorps utilisés dans cette étude

La révélation est réalisée par une réaction de chimioluminescence en utilisant le système ECL™ (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham Pharmacia Biotech). Les membranes sont exposées à un film autoradiographique (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech) selon la technique donnée par le fabricant. Le poids moléculaire des bandes spécifiques ainsi révélées est déterminé grâce à la migration de marqueurs de poids moléculaires connus (SeeBlue Plus2 PreStained Standard, Invitrogen).

II.3 - Isolement des membranes et radeaux lipidiques de cellules eucaryotes par flottaison sur gradient de sucrose

II.3.1 - Extraction et préparation des membranes totales par lyse mécanique

L'extraction des membranes totales est réalisée d'après le protocole de Roehrich et son équipe (Roehrich *et al.*, 2010). L'intégralité de l'expérience s'effectue à 4 °C. Après infection, 5.10^7 cellules sont lavées trois fois avec du PBS froid et une fois avec un tampon d'homogénéisation (imidazole 3 mM, sucrose 250 mM, EDTA 0.5 mM, pH 7,4 contenant des inhibiteurs de protéases (PIC, Roche) dilués au 1/100^{ème} (Sigma)). La suspension de cellules est transférée dans une seringue de 1 ml connectée à une seconde seringue par une fine tubulure en plastique. Les cellules eucaryotes sont lysées en effectuant 40 passages entre chaque seringue. La lyse des cellules est vérifiée au bleu de Trypan par microscopie. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée 15 min à 850 g pour éliminer les débris cellulaires et les noyaux. Le surnageant (1 ml) est ajouté à 2 ml de sucrose à 63 % dans un tampon 3 mM imidazole pH 7,4 contenant des inhibiteurs de protéases (PIC) dilués au 1/100^{ème} (Sigma), la concentration finale en sucrose est donc de 42 % (p/v). Ces 3 ml sont ensuite transférés dans un tube de centrifugation pour rotor SW 50.1 (Beckman Coulter). Dans ce même tube, 1 ml de sucrose 40 % (dans le tampon imidazole précédent) puis 1 ml de sucrose 15 % (dans le tampon imidazole précédent) sont ajoutés délicatement sans perturber les interfaces entre les différentes solutions de sucrose. Le tube est ensuite centrifugé 16 h à 15 000 g et à 4 °C.

II.3.2 - Extraction et purification des radeaux lipidiques ou DRM (Detergent Resistant Membrane)

Une des particularités des radeaux lipidiques est d'être résistant à la solubilisation par le Triton X-100. Toutes les étapes sont réalisées à 4 °C. Tous les tampons et toutes les solutions utilisées contiennent les inhibiteurs de protéases suivants : PIC dilués au 1/100^{ème} et benzamidine 1 mM.

Après infection, $1,8 \cdot 10^8$ cellules sont lavées une fois avec du RPMI, puis lysées dans 1,5 ml d'un tampon MBS (MES 25 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5) contenant 1 % de Triton X-100. Après une centrifugation à 3 200 g durant 10 min, le surnageant est homogénéisé dans 2 ml de MBS contenant 85 % de sucrose, puis transféré dans un tube d'ultracentrifugation pour rotor Beckman Coulter SW 41. Sont ensuite ajoutés dans ce tube, sans perturber les interfaces des différentes solutions, 6,3 ml de MBS contenant 35 % de sucrose puis 2 ml de MBS contenant 5 % de sucrose. Les tubes sont centrifugés à 260 000 g durant 18 h à 4 °C. Les fractions contenant les DRM sont collectées à l'interface 35 % / 5 % de sucrose puis diluées avec 1,4 ml de MBS et centrifugées à 376 000 g durant 30 min. Les culots sont solubilisés dans 100 µl de MBS et les protéines dosées par Bradford.

III - Techniques de biologie cellulaire

III.1 - Conditions de culture des cellules eucaryotes

Tous les types cellulaires sont maintenus entre 10^5 et 10^6 cellules/ml dans du milieu RPMI 1640-glutaMAXTM (Invitrogen) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen) décomplémenté, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (Invitrogen) à 37 °C sous atmosphère humide à 5 % de CO₂.

Les cellules HL-60-Bla ont été obtenues après transfection avec un plasmide pEF contenant le gène codant pour la β-lactamase. Le clone obtenu est cultivé en présence de 500 µg/ml de G418 (Invitrogen).

Lignées cellulaires	Description	Références
HL-60	Clone dérivé de la lignée promyélocytaire HL-60 isolée d'un patient atteint d'une leucémie myéloïde aiguë. Peut être différenciée en monocyte, macrophage ou en neutrophile.	(Tardif <i>et al.</i> , 1998)
HL-60-Bla	Lignée HL-60 exprimant la β -lactamase.	(Vérove <i>et al.</i> , En révision)
U937	Pro-monocyte isolé d'un patient atteint d'un lymphome histiocytaire. Peut être différencié en monocyte et en macrophage.	ATCC
THP1	Pro-monocyte isolé d'un patient atteint d'un lymphome histiocytaire. Peut être différencié en monocyte et en macrophage.	ECACC
Bjab	Lymphocytes B isolés d'un patient atteint d'un lymphome de Burkitt.	ATCC
Jurkat	Lymphocytes T isolés d'un patient atteint d'une leucémie à lymphocytes T.	ECACC
A549	Cellules épithéliales pulmonaires isolées d'un patient atteint d'un cancer du poumon.	ATCC

Tableau 5 : Les différentes lignées cellulaires utilisées. ATCC: American Type Culture Collection, ECACC : European Collection of Cell Cultures.

III.2 - Différenciation cellulaire des lignées myéloïdes HL-60, U937 et THP1

La différenciation des cellules HL-60, THP1 et U937 en monocyte est induite en présence de $1\alpha, 25$ Dihydroxyvitamine D3 (VitD3) 100 nM pendant 4 jours. La différenciation en macrophage des cellules HL-60 et U937 est réalisée en présence d'acétate myristate de phorbol (PMA) 5 ng/ml pendant 2 jours. Les cellules HL-60 sont différenciées en neutrophile en présence de diméthylsulfoxyde (DMSO) 1,25 % (v/v) pendant 5 jours. La différenciation cellulaire est vérifiée en analysant l'expression de CD11b.

III.3 - Cytométrie en flux

III.3.1 - Principe

La cytométrie est une technique permettant de mesurer simultanément plusieurs caractéristiques physiques d'une cellule telles que sa taille, sa granularité ou son intensité relative de fluorescence à une vitesse variant entre 500 et 5000 objets par seconde.

La mesure de composants particuliers de la cellule nécessite leur marquage préalable, soit à l'aide de fluorochromes spécifiques, soit par immunomarquage fluorescent. Les cellules sont ensuite injectées au centre d'une gaine liquide réalisée par l'intermédiaire d'une buse de 50 à 100 μm de diamètre. Le jet résultant va permettre aux cellules de défiler les unes derrière les autres avec suffisamment d'espace entre elles pour être analysées séparément. A la sortie de la buse, les cellules passent dans un faisceau lumineux focalisé sur le centre du jet et généralement fourni par un laser. L'interaction entre le faisceau et les particules est à l'origine de signaux lumineux, lesquels sont séparés et sélectionnés par un jeu de miroirs et de filtres puis collectés par des photodétecteurs (photodiodes et photomultiplicateurs) qui vont les transformer de façon proportionnelle en signaux électriques. Enfin, l'analyseur multicanaux va permettre le traitement des signaux électriques afin d'obtenir un histogramme mono ou biparamétré, donnant la répartition des cellules en fonction du ou des paramètres étudiés (*Figure 17*). La cytométrie en flux permet également de trier et de séparer physiquement des sous-populations de cellules mises en évidence par l'analyse.

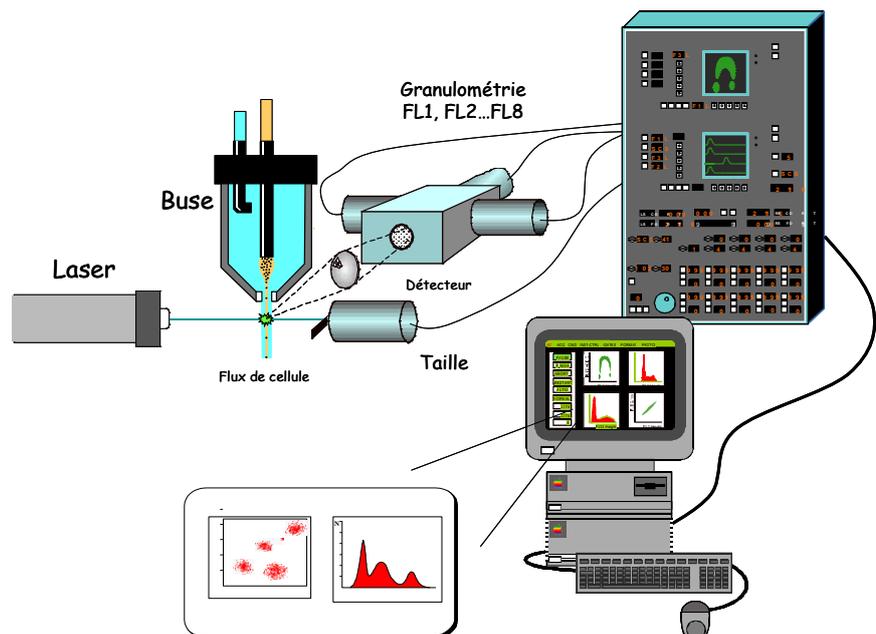


Figure 17 : Principe de la cytométrie en flux

III.3.2 - Etude de l'expression de différents CD

Le marquage est réalisé en plaque 96 puits ce qui permet de limiter les volumes des solutions d'anticorps à utiliser. Les étapes de lavage sont réalisées en centrifugeant la plaque 1 min à 1 000 g avant de la retourner vivement pour éliminer le surnageant. Un anticorps monoclonal de souris (clone bear 1, Beckman Coulter) spécifique de CD11b humain marqué au FITC est utilisé au 1/50^{ème}. Les cellules ($2 \cdot 10^5$ cellules par puits) sont lavées avec 200 µl de PBS-Fluo (Phosphate de sodium 10 mM, NaCl 138 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4) contenant 3 % de SVF et 0.05 % d'azide de sodium. Les cellules sont ensuite lavées une fois avec 200 µl de PBS-Fluo puis incubées avec 50 µl de solution d'anticorps durant 30 min à 4 °C. Après deux lavages avec 200 µl de PBS-Fluo, les cellules sont remises en suspension dans 400 µl de PBS contenant ou non 1 µg/ml d'iodure de propidium (IP). L'analyse en cytométrie en flux est réalisée avec un appareil FACScalibur (Becton-Dickinson). Le FITC et l'IP sont excités à 488 nm. La fluorescence d'émission du FITC est détectée à 530/540 nm dans le canal FL1, celle de l'IP à 650 nm et plus est lu dans le canal FL3.

III.3.3 - Etude de la viabilité cellulaire

Le marquage à l'annexine V et à l'iodure de propidium (IP) est réalisé avec le kit « FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I » commercialisé par BD Pharmingen. 10^5 cellules sont lavées en présence de 200 µl de PBS à 4 °C, centrifugées et remises en suspension dans 100 µl de tampon « Annexin V Binding Buffer » (Hepes-NaOH 0,01 M, NaCl 0,14 M, CaCl₂ 0,25 mM, pH 7.4). 5 µl de solution d'annexine V FITC et 5 µl d'IP sont ensuite ajoutés. Après 15 min d'incubation à température ambiante sous agitation à l'obscurité, 400 µl de tampon « Annexin V Binding Buffer » sont ajoutés. L'analyse de la fluorescence est réalisée comme décrit dans la partie III.3.2 du matériel et méthodes. Les cellules annexine V positives et IP négatives sont dans une phase précoce de l'apoptose, alors que les cellules annexine V positives et IP positives sont nécrotiques ou se situent dans une phase tardive de l'apoptose.

III.4 - Infection des cellules eucaryotes par *P. aeruginosa*

Une pré-culture liquide en milieu LB ou PIA contenant ou non des antibiotiques est réalisée à 37 °C pendant une nuit sous agitation. La pré-culture est diluée à une DO_{600nm} de 0,1 et la culture est menée jusqu'à une DO_{600nm} comprise entre 0,8 et 1,2.

Après un lavage avec du milieu RPMI contenant 10 % SVF mais sans antibiotique, les cellules eucaryotes sont mises en présence des bactéries dans ce même milieu de culture durant 3 h à 37 °C. Les bactéries sont ajoutées aux cellules afin d'obtenir une MOI (Multiplicity Of Infection ou rapport bactéries/cellules) comprise entre 10 et 500 en fonction de l'expérience.

III.5 - Mesure du clivage du CCF2/AM, substrat de la β -lactamase, par cytométrie en flux ou par spectrofluorimétrie

La solution de CCF2/AM (LiveBLAzer™ FRET – B/G Loading Kit, Invitrogen) est préparée en suivant les instructions du fournisseur. Une solution intermédiaire à une concentration de 6 μ M en CCF2 est préparée afin d'être diluée extemporanément dans la suspension de cellules pour obtenir une concentration finale de 1 μ M. L'ajout de probénicidate à une concentration finale comprise entre 6 et 15 mM permet d'inhiber le transport actif du CCF2 à l'extérieur de la cellule par les transporteurs anioniques. Pour la plupart des cellules les conditions standards d'incubation sont utilisées, à savoir dilution du CCF2 directement dans la suspension de cellules elles-mêmes en RPMI SVF 10 %. Par contre pour les cellules A549, le chargement en CCF2 est totalement inhibé par la présence de SVF et doit être effectué en tampon PBS et durant 1 h30. Après 30 min ou 1 h30 d'incubation à température ambiante et à l'obscurité avec le CCF2, les cellules sont lavées une fois avec 10 ml de PBS contenant 10 μ g/ml de polymixine B (Sigma) puis remises en suspension dans 400 μ l de PBS et filtrées sur un filtre de 35 μ m de porosité lors de leur transfert dans le tube d'analyse. Les cellules sont analysées avec un cytomètre en flux de type MoFlo (Dako Cytomation).

Le CCF2 est excité dans l'Ultra Violet (UV) à une longueur d'onde de 350 nm par un laser Spectra-Physics series 2000. L'émission de fluorescence du CCF2 non clivé est mesurée dans le canal FL7 à 530/15 nm (fluorescence verte), celle du CCF2 clivé dans le canal FL8 à 450/15 nm (fluorescence bleue). La taille (paramètre FSC) et la granulométrie (paramètre SSC) sont mesurées en excitant les cellules à 488 nm.

Dans le cas d'une analyse par spectrofluorimétrie, les cellules HL-60 ou HL-60-Bla sont incubées en présence de CCF2 dans les mêmes conditions que pour une analyse par cytométrie en flux. Le CCF2 est excité avec une excitation à 350 nm (longueur d'onde du laser du FACS MoFlo) et avec une excitation à 409 nm (longueur d'onde d'excitation optimale). Le signal d'émission du CCF2 est ensuite mesuré entre 420 nm et 560 nm.

III.6 - Molécules testées dans l'étude de la susceptibilité à l'injection des toxines par le SST3

Les inhibiteurs utilisés sont décrits dans le tableau ci-dessous :

Molécule (Fournisseur)	Cible	Solubilisé en	Temps d'incubation avant infection
Cytosquelette			
Cytochalasine D (Sigma)	Dépolymérisation de l'actine filamenteuse	Ethanol ou DMSO	30 min
Latrunculine B (Sigma)	Dépolymérisation de l'actine en séquestrant l'actine monomérique	DMSO	30 min
Signalisation cellulaire			
Wortmannine (Sigma)	Inhibiteur des PI3 kinases	DMSO	30 min
LY-294002 (Sigma)		DMSO	2 h
Génisteine (Sigma)	Inhibiteur des Tyrosines kinases	DMSO	2 h
PF-573-228 (Calbiochem)	Inhibiteur de la famille FAK kinases	DMSO	2 h
PP2 (Sigma ou Calbiochem)	Inhibiteur de la famille des Scr kinases	DMSO	2 h
Y-27632 (Sigma)	Inhibiteur de ROCK	DMSO	2 h
Toxine Tat-C3 de <i>C. Botulinum</i> (Cytoskeleton)	Inhibiteur de RhoA, B et C	PBS	2 h
Toxine B de <i>C. difficile</i> (Sigma)	Inhibiteur de Rho/Rac/cdc42 inhibitor	TBS	2 h
Ac-YVAD-CMK (Calbiochem)	Bloque le clivage de la Caspase-1	DMSO	2 h
Lipides de la membrane cellulaire			
Methyl β -cyclodextrine (Sigma)	Chélateur du cholestérol	PBS	(voir IV.5 partie résultats)
α -cyclodextrine (Sigma)	Cyclodextrine sans effet sur la chélation du cholestérol	PBS	(voir IV.5 partie résultats)
Imipramine (Sigma)	Inhibiteur de l'acide shingomyélinase	H ₂ O	2 h

Anticorps			
Spécificité	Effet	Clones	Temps d'incubation avant l'infection
Anticorps monoclonaux anti- β_1 (CD29) (Millipore)	Bloque l'adhérence et l'activité de toutes les intégrines à chaînes β_1	Clone P4C10 Clone TDM29	30 min
Anticorps monoclonaux anti- β_2 (CD18) (Millipore)	Bloque l'adhérence et l'activité de toutes les intégrines à chaînes β_2	Clone PID6 Clone MEM48	30 min

Tableau 6 : Inhibiteurs et anticorps testés dans l'étude de la susceptibilité des cellules à l'injection de toxines par le SST3

Pour le traitement à la Me β CD, les cellules sont cultivées durant une semaine dans un milieu RPMI contenant 1 % de Nutridoma (Roche). Le Nutridoma est un additif permettant de cultiver les cellules en absence de SVF, dans notre cas il a été utilisé essentiellement afin de disposer d'un milieu de culture appauvri en cholestérol. En effet, il s'avère que les cellules HL-60 résistent mieux au traitement à la Me β CD lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu pauvre en cholestérol.

III.7 - Mesure de l'association des bactéries aux cellules par cytométrie en flux

Ce test est réalisé avec la souche CHA *pX2gfp* qui exprime la GFP qui peut être détectée dans le canal FL1 du cytomètre. Après un lavage avec du RPMI SVF 10 % sans antibiotique, 5.10^5 cellules sont incubées avec les bactéries à une MOI de 10 dans les puits d'une plaque 24 puits dans du RPMI SVF 10 %. Après 3 h d'incubation, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS à 4 °C puis analysées en cytométrie de flux (FacsCalibur).

III.8 - Mesure de l'association des bactéries aux cellules par protection à la gentamycine

Le principe de ce test repose sur l'imperméabilité des membranes plasmiques des cellules eucaryotes à la gentamycine. Des bactéries internalisées dans des cellules sont donc protégées de l'action de la gentamycine et peuvent être quantifiées suite à la lyse des cellules eucaryotes. A l'opposé si les bactéries sont seulement associées à la surface des cellules, elles sont alors sensibles à l'action de la gentamycine. Lors de ce test, nous avons également utilisé la cytochalasine D qui bloque la polymérisation de l'actine et empêche ainsi l'internalisation ou la phagocytose des bactéries. Après un lavage avec du RPMI SVF 10 % sans antibiotique, les cellules HL-60 sont traitées ou non avec 10 μM de cytochalasine durant 30 min puis infectées pendant 3 h à 37 °C en présence de la souche CHA *pX2gfp* et en présence de cytochalasine. Après infection, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS à 4 °C puis sont incubées pendant 60 min en présence de 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamycine à 37 °C. Les cellules sont lysées dans du PBS contenant 1 % de Triton X-100 qui ne solubilise pas les membranes bactériennes. Le lysat est ensuite étalé sur un milieu PIA gélosé contenant 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de carbénicilline. Après 24 h d'incubation, les colonies formées (UFC) sont comptées.

III.9 - « Panning » des cellules avec des anticorps

La technique de « panning » est une technique utilisée initialement pour réaliser la purification d'un type cellulaire dans les puits d'une plaque de culture à l'aide d'anticorps immobilisés au fond de ces puits (Wysocki and Sato, 1978). Les cellules récupérées par simple pipetage conservent leurs propriétés.

Les puits d'une plaque 24 puits sont incubés avec une solution d'anticorps toute la nuit à 4 °C et lavés trois fois avec 1 ml de PBS. Les anticorps suivants ont été utilisés : anticorps monoclonal de souris spécifique de CD43 (sialoglycoprotéine exprimée sur tous les leucocytes et jouant un rôle important dans les phénomènes pro ou anti-adhésifs), clone 1G10 (BD Pharmingen) utilisé à 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, clone L60 (BD Pharmingen) utilisé à 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Une suspension de 5.10^5 cellules dans du RPMI SVF 10 % sans antibiotique est déposée dans les puits et infectées avec *P. aeruginosa*.

III.10 - Traitement des cellules en présence de SAB ou OVA

Les cellules HL-60 ND ont été lavées puis remises en suspension dans du RPMI contenant soit du SVF 10 %, soit différentes concentrations de sérum albumine bovine (SAB) ou d'ovalbumine (OVA). Les cellules sont ensuite infectées avec *P. aeruginosa*. Ces différents milieux affectent grandement la capacité des cellules HL-60 à adhérer ou non au support plastique. Les cellules en suspension sont prélevées et énumérées sur lame de Neubauer.

III.11 - Inhibition de l'inflammasome en présence de KCl

L'activité de l'inflammasome (NLRP3 et NLRC4) conduit à une sortie importante du potassium de la cellule. Cette sortie de potassium peut être contrôlée par la concentration extracellulaire en KCl du milieu de culture. Deux types de milieux de culture ont été préparés, un milieu à faible concentration en potassium (5 mM) et un milieu à forte concentration en potassium (140 mM). Les cellules HL-60 ND ou HL-60 VitD3 sont mises en suspension dans un milieu de Hanks (NaCl 140 mM, HEPES 10 mM, CaCl₂ 1,3 mM, MgCl₂ 0,5 mM, K₂HPO₄ 0,36 mM, KH₂PO₄ 0,44 mM, D-glucose 5,5 mM, NaHCO₃ 4,2 mM, pH 7,4) contenant 5 mM ou 150 mM de KCl. Les cellules sont ensuite infectées en présence d'une souche de *P. aeruginosa*.

RESULTATS

I - Détection de l'injection des toxines dans les cellules cibles

La fonctionnalité du SST3 de *P. aeruginosa* est directement reliée au passage des effecteurs dans le cytoplasme de la cellule cible. L'analyse de la présence des effecteurs ou de leurs effets constitue donc une méthode souvent utilisée. Une autre approche consiste à évaluer la cytotoxicité c'est-à-dire l'altération de l'étanchéité de la membrane plasmique de la cellule cible induite par l'insertion du pore de translocation du SST3 constitué des protéines PopB et PopD. Néanmoins cette approche est indirecte et ne traduit pas nécessairement l'injection des effecteurs (Vance *et al.*, 2005).

I.1 - La β -lactamase comme rapporteur de l'injection de toxines

Différentes techniques ont été mises au point pour détecter directement l'injection de toxines dans les cellules cibles par le SST3 de bactéries pathogènes. Il est possible de détecter l'activité enzymatique de certains effecteurs tels qu'ExoS. L'ADP-ribosylation par ExoS, des petites protéines G telles que Ras, Rho ou CD42 se traduit par une modification détectable de la masse moléculaire de ces substrats (Fraylick *et al.*, 2002).

Une autre approche consiste à rechercher, non pas le résultat de l'action enzymatique de l'effecteur, mais l'effecteur lui-même. Des exotoxines de SST3 ont ainsi été fusionnées à une séquence de 13 acides aminés de la Glycogen Synthase Kinase-3 β humaine (GSK-Tag) contenant une sérine phosphorylable par des kinases cytoplasmiques. La phosphorylation de la toxine chimérique injectée dans la cellule cible est alors analysée par immunorévélation à l'aide d'anticorps anti-phosphosérine (Garcia *et al.*, 2006).

Ces deux techniques présentent l'inconvénient de leur sensibilité limitée et de la lourdeur de leur mise en place pour des analyses réalisées sur de multiples échantillons. Nous avons donc développé un système rapporteur fluorescent sensible basé sur l'utilisation d'une enzyme, la β -lactamase.

I.1.1 - Utilisation du système rapporteur β -lactamase/CCF2

La β -lactamase est une enzyme bactérienne ne présentant pas d'homologue avec les protéines des cellules mammifères et son injection dans une cellule eucaryote n'induit aucune toxicité. L'activité enzymatique d'une centaine de molécules de β -lactamase induit le clivage

de suffisamment de molécules de substrat pour permettre la détection d'un signal significatif à l'intérieur des cellules alors qu'avec la GFP 10^5 à 10^6 molécules par cellules sont requises. De plus, la détection de la β -lactamase est 10 fois plus sensible qu'une autre enzyme : la β -galactosidase et ne nécessite pas d'étape de traitement des cellules par choc hypotonique afin de faciliter l'entrée du substrat comme c'est le cas pour la β -galactosidase (Knapp *et al.*, 2003).

La première utilisation de la β -lactamase comme rapporteur de l'injection de toxines d'un SST3, celui de *E. coli* entéropathogène, remonte à 2004 (Charpentier and Oswald, 2004). L'effecteur Cif avait été fusionné à la β -lactamase TEM-1. La présence de la protéine de fusion dans la cellule est révélée grâce au CCF2/AM (Coumarin Cephalosporin Fluorescein 2/AcetoxyMethyl) substrat fluorescent de la β -lactamase, élaboré par Zlokarnik en 1998 (Zlokarnik *et al.*, 1998).

Le CCF2/AM est commercialisé par Invitrogen sous le nom de LiveBLAzer™ FRET. Cette molécule est composée d'un fluorophore donneur d'énergie, la 7-hydroxycoumarine (coumarine), et d'un fluorophore accepteur d'énergie, la fluorescéine (*Figure 18*). Ces deux molécules sont reliées entre elles par une céphalosporine comprenant un noyau β -lactame. Le CCF2 est estérifié par des groupements acétyl, butyryl et acetoxyméthyl conférant une charge neutre à la molécule ce qui lui permet de diffuser à travers la membrane plasmique. Lorsqu'il est dans la cellule, le CCF2/AM est déestérifié par des estérases intracellulaires (et devient CCF2), il est alors retenu à l'intérieur de la cellule (*Figure 18A*). En raison des différents groupements esters, le CCF2/AM n'émet aucune fluorescence, la fluorescence est acquise dès lors que le CCF2/AM est entré dans la cellule et clivé en CCF2 par les estérases.

Par un mécanisme de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) l'excitation de la coumarine à 409 nm permet un transfert d'énergie à la fluorescéine qui émet alors une fluorescence verte à une longueur d'onde de 520 nm (*Figure 18B*). En présence de β -lactamase le noyau β -lactame de la céphalosporine est clivé séparant la coumarine de la fluorescéine empêchant ainsi le FRET. La coumarine excitée à 409 nm émet alors un signal de fluorescence bleu à une longueur d'onde de 447 nm (*Figure 18B*). Le signal de la fluorescéine obtenu avec le CCF2 non clivé est mesuré dans le canal d'émission FL7 (530/15 nm). Le signal de la coumarine obtenu quand le CCF2 est clivé par la β -lactamase est mesuré dans le canal FL8 (450/15 nm) (*Figure 18B*).

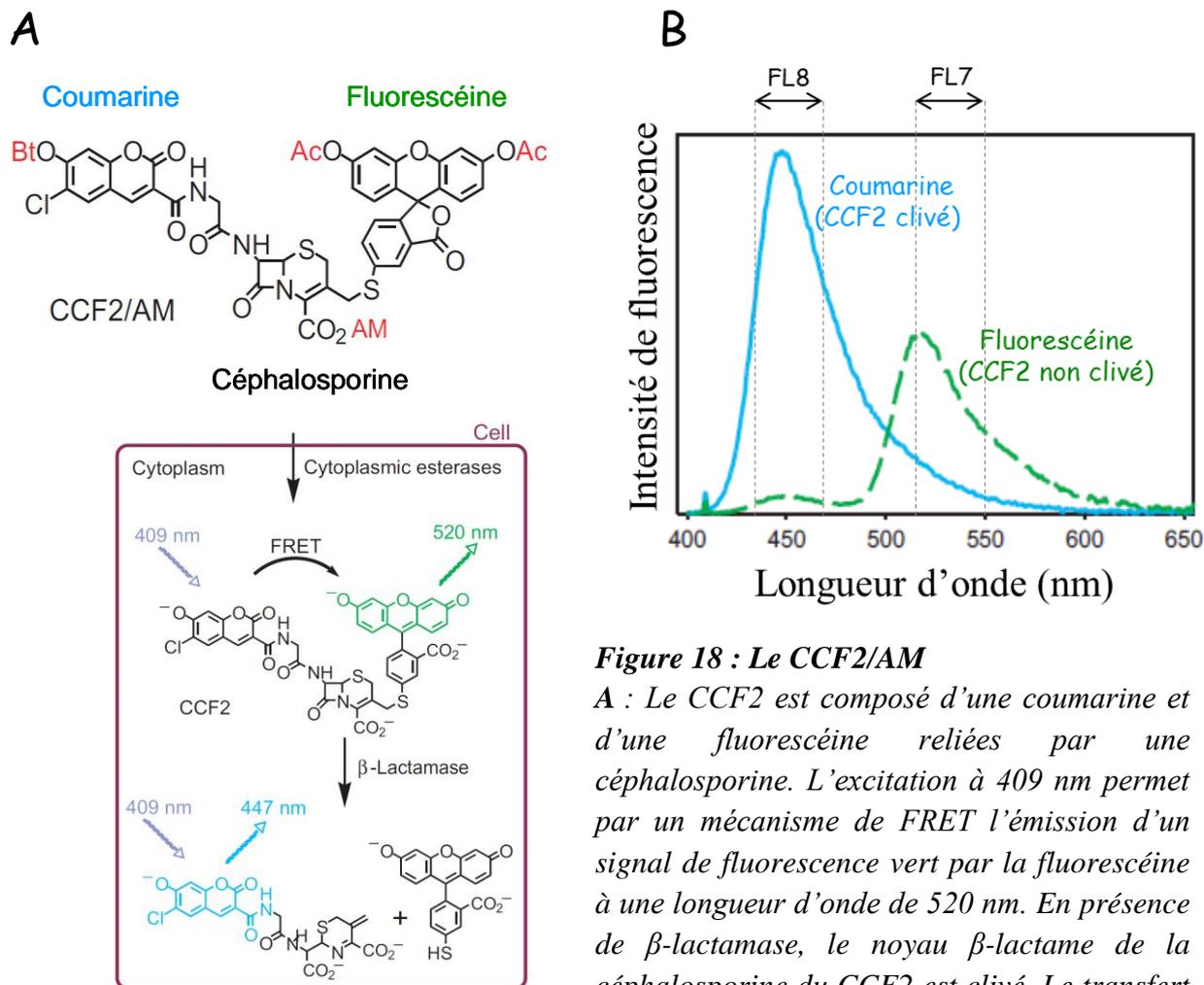


Figure 18 : Le CCF2/AM

A : Le CCF2 est composé d'une coumarine et d'une fluorescéine reliées par une céphalosporine. L'excitation à 409 nm permet par un mécanisme de FRET l'émission d'un signal de fluorescence vert par la fluorescéine à une longueur d'onde de 520 nm. En présence de β -lactamase, le noyau β -lactame de la céphalosporine du CCF2 est clivé. Le transfert d'énergie (FRET) ne peut plus se produire et l'excitation à 409 nm conduit à l'émission d'un

signal de fluorescence bleu par la coumarine à 447 nm. Ac : Acétyl ; Bt : Butyryl ; AM : Acétoxyméthyl.

B : Spectre d'émission de la coumarine et de la fluorescéine pour une excitation à une longueur d'onde de 409 nm. La courbe bleue représente le spectre d'émission de la coumarine (CCF2 clivé par la β -lactamase), la courbe verte en pointillée représente le spectre d'émission de la fluorescéine (CCF2 non clivé).

Le cytomètre dont nous disposons (FACS MoFlo) ne possédant pas de laser à 409 nm, le CCF2 a été excité dans l'Ultra Violet à une longueur d'onde de 350 nm. Afin d'estimer la différence de rendement du signal de fluorescence, nous avons analysé par spectrofluorimétrie deux populations de cellules préalablement incubées avec le CCF2 : des cellules HL-60 dans lesquelles le CCF2 n'est pas clivé, et des cellules HL-60-Bla exprimant constitutivement la β -lactamase dans lesquelles tout ou une partie du CCF2 est clivé. Le signal d'émission du CCF2 a été mesuré avec une excitation à 350 nm, longueur d'onde du laser du FACS MoFlo, et avec une excitation à 409 nm, longueur d'onde d'excitation optimale (Figure 19). Le spectre

d'émission des cellules HL-60 (dans lesquelles le CCF2 n'est pas clivé) indique une longueur d'onde optimale d'émission de 520 nm pour les deux longueurs d'onde d'excitation utilisée. Mais le signal de fluorescence est 4,5 fois plus élevé pour une excitation à 409 nm. De la même manière, l'optimum d'excitation est observé à 450 nm pour les cellules HL-60-Bla (dans lesquelles tout ou partie du CCF2 est clivé) pour les deux longueurs d'onde d'excitation. On observe également un signal de fluorescence 9 fois supérieur lorsque l'excitation est réalisée à 409 nm. La longueur d'onde d'excitation à 350 nm n'est donc pas optimale en termes d'intensité du signal observé mais permet toutefois une détection aisée du signal du CCF2 non clivé et du signal du CCF2 clivé. En effet le ratio bleu/vert observé pour les cellules HL-60-Bla est de 14/3 soit 4,66 avec une excitation optimale à 409 nm et de 1,6/0.55 soit 2,9 pour une excitation à 350 nm, longueur d'onde utilisée avec le cytomètre MoFlo.

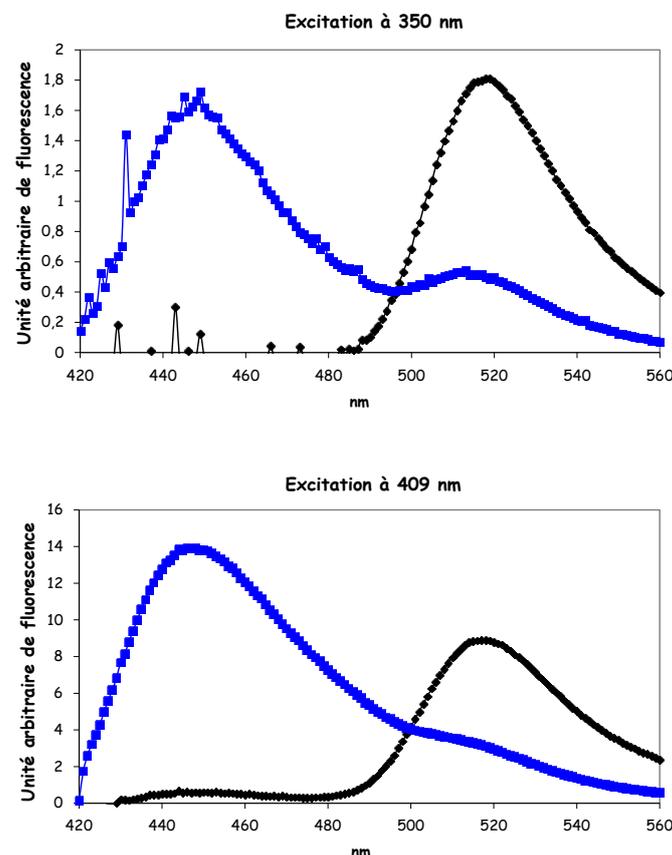


Figure 19 : Mesure du spectre d'émission des cellules HL-60 et HL-60-Bla incubées en présence de CCF2

2.10^6 cellules HL-60 (courbes noires) ou 2.10^6 cellules HL-60-Bla (courbes bleues) ont été incubées 30 min en présence de CCF2 en respectant les conditions du fournisseur. Les cellules ont ensuite été analysées avec un spectrofluorimètre en utilisant deux longueurs d'onde d'excitation : soit 350 nm, longueur d'onde correspondant à celle utilisée au FACS, soit 409 nm, longueur d'onde optimale d'excitation du CCF2.

Cette expérience nous a également permis d'estimer la quantité de CCF2 non clivé contenu dans les cellules HL-60-Bla pour une excitation à 350 nm. L'aire sous la courbe du pic à 520 nm observé avec les cellules HL-60-Bla représente environ 15 % de l'aire sous la courbe du pic observé à 450 nm. Ceci nous permet donc d'estimer à 15 % le CCF2 non clivé contenu dans les cellules HL-60-Bla. Cette estimation nous est nécessaire pour le réglage des compensations développé dans la partie I.2.2 des résultats. L'absence de clivage de la totalité du CCF2 peut être due au fait qu'il n'est pas accessible à la β -lactamase car situé dans des compartiments cellulaires différents.

I.1.2 - Le système β -lactamase/CCF2 appliqué à *P. aeruginosa*

La toxine chimérique ExoS-Bla (environ 60 kDa) que nous avons construite est capable de passer à travers l'aiguille du SST3. Pour cela, les 23 premiers acides aminés de la β -lactamase TEM-1 qui constituent le site d'adressage au périplasme des bactéries ont été retirés lors de la construction. Deux protéines chimères ont été construites en fusionnant la β -lactamase aux séquences d'ExoS ou d'ExoY. Dans le cas d'ExoS, la région N-terminale, constituée de la séquence d'adressage (S), du domaine de liaison à la chaperonne (CBD), de la région de localisation à la membrane (MLD) et enfin du domaine GAP, a été fusionnée par son extrémité C-terminale à la β -lactamase pour obtenir la protéine chimérique ExoS/ β -lactamase ou ExoS-Bla (*Figure 20*). Le site catalytique du domaine GAP a été invalidé en remplaçant l'arginine 146 par une alanine (R146A). Pour ExoY, la séquence de 211 acides aminés situés en N-ter et dépourvue de l'activité catalytique adénylate-cyclase a été fusionnée par son extrémité C-terminale à la β -lactamase (*Figure 20*). Le gène codant pour ces protéines chimériques est inséré en aval du promoteur de l'opéron régulateur du SST3, pexsCEBA dans un plasmide répliatif.

Les souches de *P. aeruginosa* utilisées exprimant les différentes exotoxines chimériques dans ce travail sont décrites dans le Tableau 1 de la partie Matériels et Méthodes.

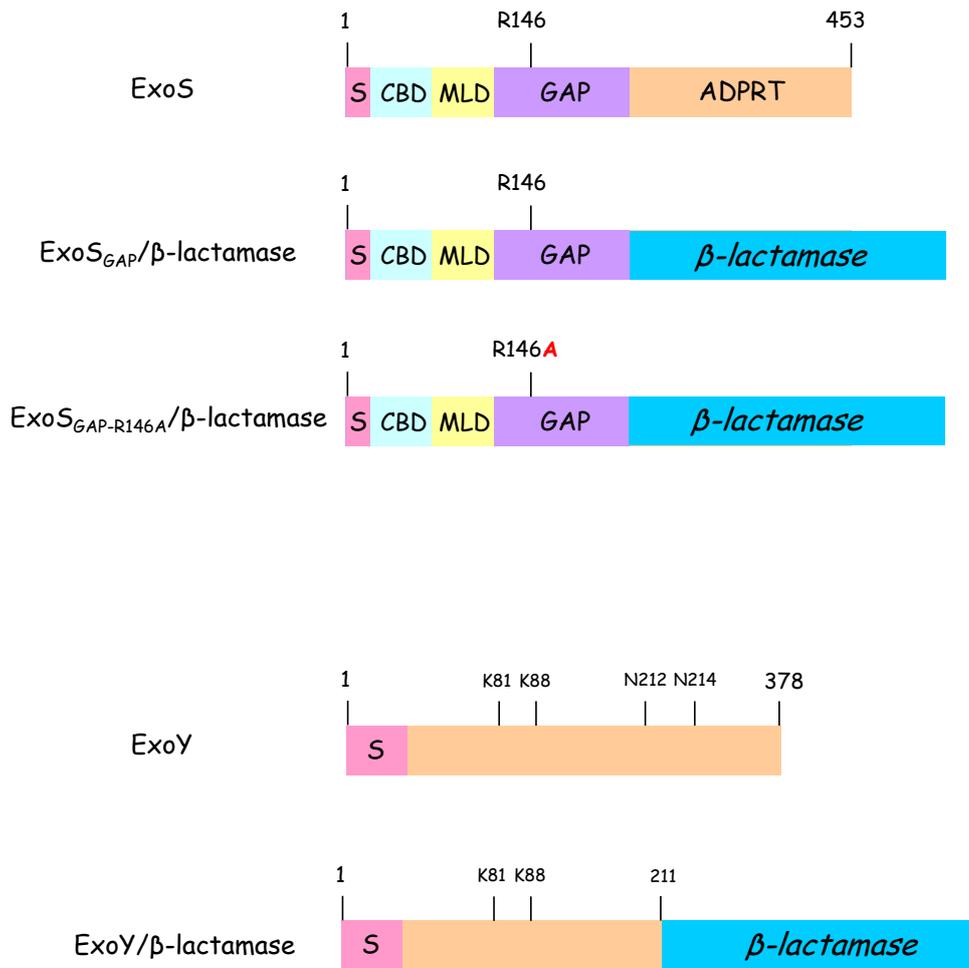


Figure 20 : Les toxines chimériques ExoS-Bla et ExoY-Bla

Le domaine GAP d'ExoS est fusionné à la β-lactamase. Par mutagenèse dirigée, l'arginine 146 du site actif du domaine GAP est substituée par une alanine (R146A). La partie 212 à 378 de l'exotoxine ExoY a été retirée. La β-lactamase est ensuite fusionnée du côté C-terminal des toxines modifiées.

Après incubation des cellules avec les bactéries, le CCF2 est ajouté. Le nombre de cellules bleues contenant du CCF2 clivé, et ayant donc reçu une injection de toxines chimériques est quantifié par cytométrie en flux (Figure 21).

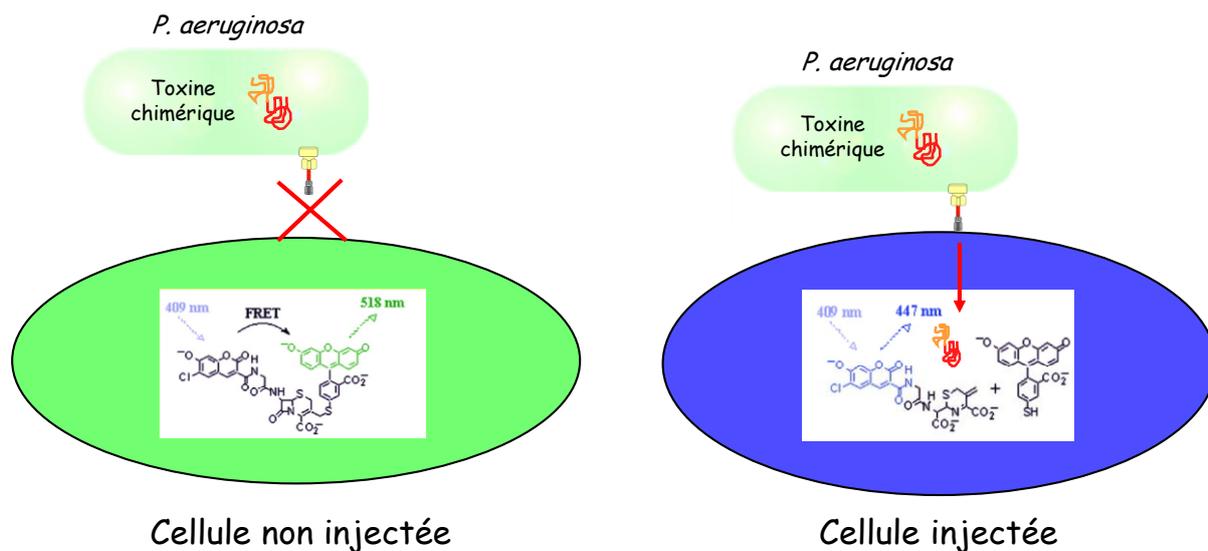


Figure 21 : Utilisation du système CCF2/ β -lactamase pour l'étude de l'injection de toxines de *P. aeruginosa* dans les cellules eucaryotes

Différentes souches de *P. aeruginosa* ont été transformées pour exprimer une toxine chimérique contenant une partie d'ExoS ou d'ExoY fusionnée à la β -lactamase. En absence d'injection, le CCF2 n'est pas clivé et son excitation à 350 nm permet, par un mécanisme de FRET, l'émission d'un signal de fluorescence vert à 518 nm. Suite à l'injection de toxines chimériques dans la cellule, le CCF2 est clivé. L'excitation à 350 nm conduit alors à l'émission d'un signal de fluorescence bleu détecté à 447 nm.

I.2 - Analyse par cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet l'analyse individuelle des cellules et la réalisation d'analyses statistiques concernant des populations importantes de cellules. Deux paramètres ont été utilisés : la MFI (Mean Fluorescence Intensity) et le pourcentage de cellules injectées. La MFI mesurée dans le canal FL8 (450/15 nm), traduit l'intensité relative de fluorescence proportionnelle à la quantité de CCF2 clivée, elle-même directement reliée à la quantité de toxines chimériques transloquées dans la cellule. Le pourcentage de cellules injectées définit le nombre de cellules contenant du CCF2 clivé, c'est-à-dire présentant une fluorescence mesurable dans le canal FL8.

I.2.1 - Optimisation des conditions de chargement en CCF2

L'efficacité de chargement en CCF2 dépend de la vitesse d'entrée du CCF2 mais surtout de sa rétention à l'intérieur des cellules. Nous avons donc tout d'abord évalué la cinétique de chargement en CCF2 de plusieurs types cellulaires.

La lignée HL-60 non différenciée (ND) ou différenciée en DMSO a été incubée avec 1 μM de CCF2 pendant 15, 30, 60 min et 2 h à 20 °C dans le milieu de culture RPMI contenant 10 % de SVF. L'analyse de la fluorescence dans le canal FL7 (530/15 nm) montre que l'intensité maximale du signal des cellules HL-60 est atteinte dès 15 min d'incubation. La fluorescence reste stable pendant au moins 2 h dans ces cellules (*Figure 22*). Ces résultats nous ont permis de vérifier que l'entrée et la rétention du CCF2 étaient les mêmes dans les cellules HL-60 non différenciées et différenciées.

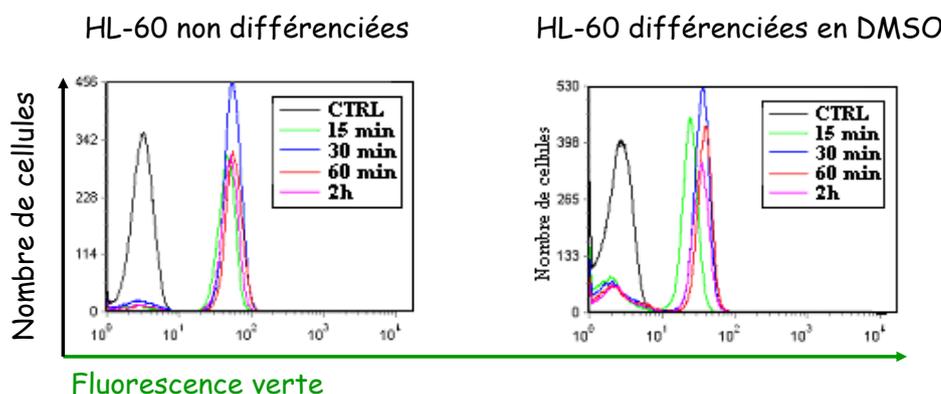


Figure 22 : Détermination des conditions de chargement des cellules HL-60 en CCF2

Les cellules HL-60 non différenciées ou différenciées en DMSO ont été incubées en présence de 1 μM de CCF2 à différents temps (15, 30, 60 min et 2 h) à 20 °C. La courbe noire (CTRL) représente la fluorescence des cellules en absence de CCF2.

Les cellules des lignées lymphocytaires Bjab et Jurkat ainsi que les cellules des lignées promonocytaires U937 et THP1 se chargent en CCF2 dans les mêmes conditions que les cellules HL-60. En revanche, la présence de SVF inhibe sensiblement l'entrée du CCF2 dans les cellules A549, cette inhibition est probablement due à l'activité hydrolytique du SVF vis-à-vis des liaisons esters (Zlokarnik, 2000). Ce phénomène est d'autant plus perceptible que le temps nécessaire à l'entrée du CCF2 dans la cellule est long, ce qui est le cas pour les cellules A549. Pour ce type cellulaire l'incubation a donc été réalisée en PBS durant 1 h30 et en doublant la concentration en CCF2 soit à une concentration de 2 μM .

I.2.2 - Réglage des compensations

Les molécules fluorescentes utilisées en cytométrie de flux présentent fréquemment des chevauchements de spectres, le CCF2 non clivé et clivé ne font pas exception (*Figure 18*). Ces chevauchements de spectres d'émission de fluorescence peuvent perturber l'interprétation des résultats. Aussi, le réglage des compensations permet de soustraire artificiellement la fluorescence bleue qui résulte de la fuite de fluorescence verte du CCF2 non clivé dans le canal FL8. De la même manière, la fluorescence verte du CCF2 clivé qui fuit dans le canal FL7 doit être soustraite à la fluorescence verte du CCF2 non clivé. Ces réglages de compensation nécessitent de disposer de cellules contrôles possédant seulement un signal de fluorescence vert et d'autres cellules contrôles possédant seulement un signal de fluorescence bleu. Le premier contrôle (cellules vertes) est aisé à obtenir dans la mesure où les cellules HL-60 n'expriment pas la β -lactamase et se chargent facilement en CCF2. Par contre, le deuxième contrôle (cellules bleues) a nécessité la réalisation d'une lignée cellulaire exprimant constitutivement la β -lactamase. La lignée cellulaire HL-60 a été transfectée avec le plasmide pEF contenant le gène codant pour la β -lactamase pour l'exprimer constitutivement (lignée HL-60-Bla). Néanmoins, après le chargement des cellules HL-60-Bla en CCF2, la difficulté consiste à déterminer si la totalité du CCF2 rentré a été clivé. C'est pourquoi l'analyse réalisée en spectrofluorométrie classique (*Figure 19*) a été réalisée et nous a permis de conclure qu'environ 85 % du CCF2 était clivé dans ces cellules. Cette donnée nous permis de vérifier la pertinence du réglage des compensations.

Après 30 min d'incubation en présence de CCF2, les cellules HL-60 ou HL-60-Bla ont été analysées en cytométrie de flux et la représentation bi-paramétrée en nuage de points (chaque cellule est matérialisée par un point) a été utilisée (*Figure 23*). Comme dans toutes les expériences de cytométrie présentées, seules les cellules vivantes (sur la base des paramètres FSC (taille) et SSC (granulométrie) qui constituent en moyenne plus de 85 % des cellules, ont été prises en compte pour l'analyse.

Le contrôle obtenu avec les cellules sans CCF2 permet de visualiser le signal d'auto-fluorescence des cellules (*Figure 23A, panneau de gauche*). Après incubation avec le CCF2 toutes les cellules HL-60-Bla présentent une fluorescence verte et bleue (*Figure 23A ; panneau de droite*). Ces résultats indiquent que l'expression de la β -lactamase dans les cellules HL-60 conduit à un clivage du CCF2 dans toutes les cellules, néanmoins à ce stade il

est difficile de savoir si le signal de fluorescence vert observable est dû à un clivage partiel du CCF2 ou à un problème d'absence de réglage de la compensation.

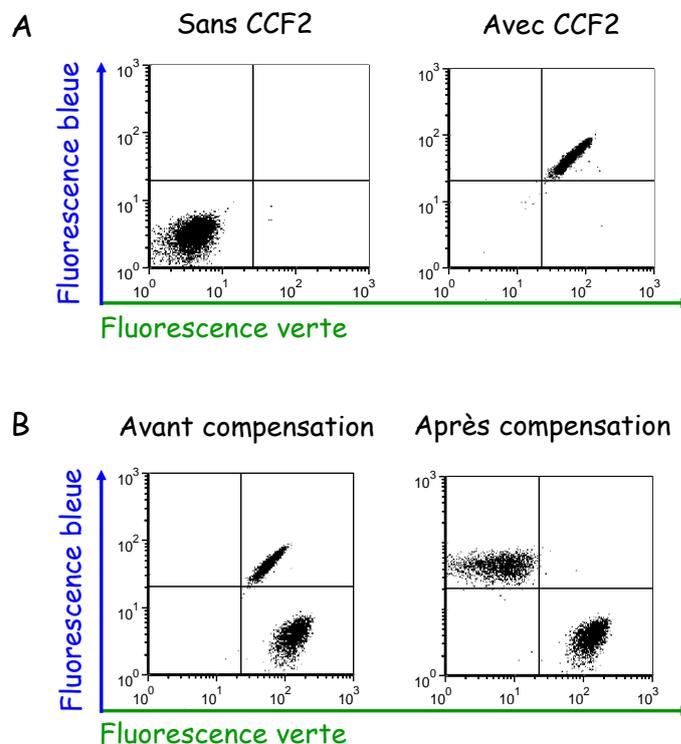


Figure 23 : Mise au point de la compensation de la fluorescence du CCF2 par cytométrie en flux

A : Les cellules HL-60-Bla sont incubées en absence (panneau de gauche) ou en présence (panneau de droite) de CCF2.

B : Un mélange contenant 50 % de cellules HL-60-Bla et 50 % de cellules HL-60 est incubé en présence de 1 μM de CCF2. Les résultats avant compensation (graphique de gauche) et après compensation (graphique de droite) sont représentés.

L'analyse du panneau B nous a permis de répondre à cette question. L'objectif de la compensation est de supprimer la contribution de la fluorescence verte mesurée dans le canal de fluorescence bleue.

Pour réaliser cette compensation, un mélange de 50 % de cellules HL-60 et de 50 % de cellules HL-60-Bla est incubé en présence de CCF2. Les cellules HL-60 incubées avec le CCF2 constituent le contrôle dans lequel seule une fluorescence verte est présente. Les cellules HL-60-Bla constituent quant à elles le contrôle dans lequel seule la fluorescence bleue doit être observée en raison d'une expression élevée de la β -lactamase. Deux nuages de points sont observés (*Figure 23B ; avant compensation*) : le premier situé en bas à droite

correspond aux cellules HL-60. Le second situé en haut à droite correspond aux cellules HL-60-Bla exprimant la β -lactamase. La fluorescence verte détectable dans le canal d'émission bleue est soustraite à l'aide du logiciel d'analyse en prenant soin de ne pas affecter le signal de fluorescence verte des cellules HL-60 qui n'expriment pas la β -lactamase. Une compensation de 130 % du signal de fluorescence vert permet le décalage du nuage de point vers la gauche. Les cellules HL-60-Bla apparaissent alors pour la plupart bleues (*Figure 23B ; après compensation*) ce qui signifie que l'intégralité du CCF2 a été clivé pour la plupart des cellules, les quelques pourcents de cellules situés à droite de la valeur 10 de fluorescence verte correspondent aux 15 % de cellules dans lesquelles tout le CCF2 n'a pas été clivé (résultats en accord avec ceux obtenus dans la Figure 19).

Ce réglage des compensations a été utilisé afin d'aboutir à la MFI et au pourcentage de cellules injectées présentés dans la suite de ce manuscrit.

I.2.3 - Mise en évidence de l'injection d'ExoS-Bla par le SST3 de *P. aeruginosa*

Disposant de la bactérie *P. aeruginosa* exprimant la toxine chimérique ExoS-Bla, et disposant d'un moyen de mesurer le signal du CCF2 en cytométrie de flux nous avons testé l'efficacité globale du système rapporteur β -lactamase/CCF2 pour l'injection par le SST3 dans des cellules humaines. La première cellule testée a été la lignée épithéliale pulmonaire A549 connue pour être sensible à l'injection de toxines par le SST3 de *P. aeruginosa*. Les cellules A549 ont été infectées par quatre souches de *P. aeruginosa* : la souche CHA S-Bla (*Figure 24, colonne 3*), la souche CHA Δ S/S-Bla (*Figure 24, colonne 4*) la souche CHA Δ S/S_{R146A}-Bla (*Figure 24, colonne 5*) et la souche CHA Δ BD/S_{R46A}-Bla (*Figure 24, colonne 6*). Les colonnes 1 et 2 représentent respectivement les cellules A549 non infectées incubées en absence ou en présence de CCF2.

La Figure 24 présente les deux types de représentation obtenues lors de l'analyse en cytométrie de flux : panneau A, représentation bi-paramétrée en nuage de points représentant la fluorescence verte (FL7) et la fluorescence bleue (FL8) ; panneau B (histogramme monoparamétré), répartition de l'intensité de fluorescence bleue (FL8). Dans la suite des expériences ne seront présentés que les résultats d'analyse statistique déduit de l'histogramme monoparamétré représentant la fluorescence bleue (FL8).

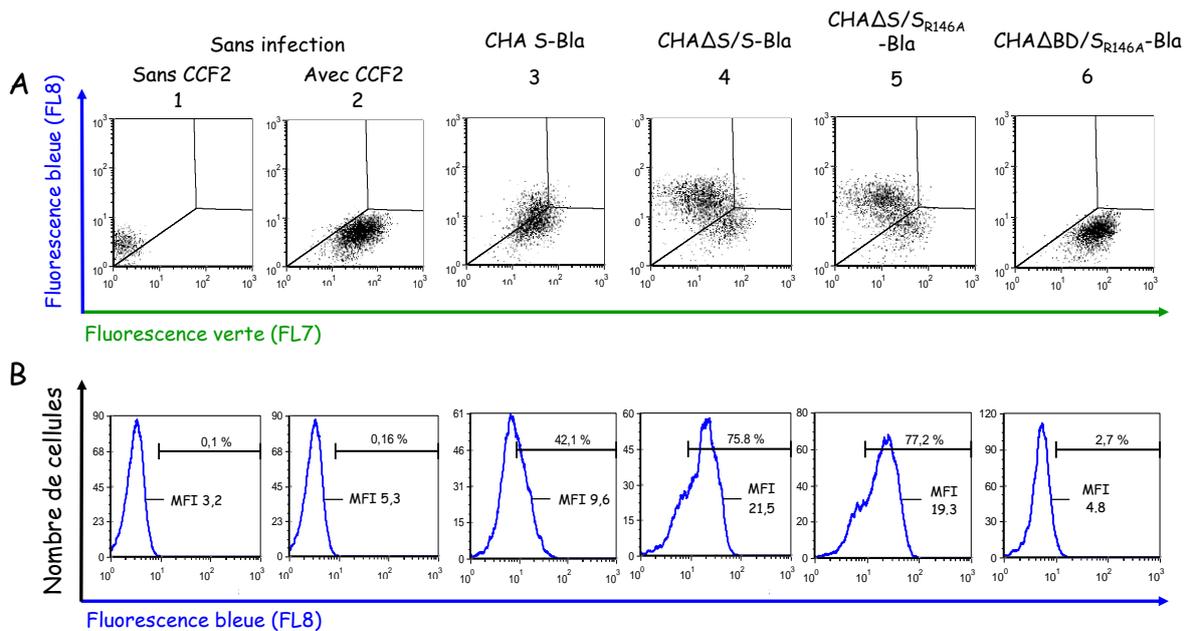


Figure 24 : Mise en évidence de l'injection d'ExoS-Bla dans les cellules épithéliales A549
 Les cellules A549 sont non infectées (colonne 1 et 2) ou infectées 3 h par la souche CHA S-Bla (colonne 3), CHAΔS/S-Bla (colonne 4), CHAΔS/S_{R146A}-Bla (colonne 5) ou CHAΔBD/S_{R146A}-Bla (colonne 6) à une MOI de 50. Après 3 h d'infection, les cellules sont incubées en présence de 1 μM de CCF2 pendant 90 min et analysées par cytométrie en flux. **A** : Histogramme bi-paramétré en nuage de points. **B** : Histogramme mono-paramétré.

La MFI est directement proportionnelle à la quantité de CCF2 clivée présente à l'intérieur de la cellule, elle-même directement reliée à la quantité de toxines chimériques injectée. Il est à noter que les valeurs des MFI obtenues ici sont relativement faibles comparativement à d'autres résultats, mais comme indiqué dans la Figure 19, l'excitation à 350 nm donne un signal de fluorescence 9 fois inférieur à celui obtenu avec une excitation réalisée à la longueur d'onde optimale de 409 nm.

Les MFI mesurées en absence de CCF2 (MFI : 3,2), ou en présence de CCF2 sans infection (MFI : 5,3) sont proches. Lorsque les cellules A549 sont infectées par la souche CHA S-Bla, cette MFI passe à 9,6 et monte à 21,5 pour les cellules infectées par la souche CHAΔS/S-Bla et à 19,2 pour les cellules infectées par la souche CHAΔS/S_{R146A}-Bla. En présence de la souche CHAΔBD/S_{R146A}-Bla la valeur de la MFI (4,75) est très similaire à celle des cellules non infectées. L'analyse du pourcentage de cellules présentant une intensité de fluorescence supérieure à celle du contrôle donne des résultats similaires. Alors que seulement 42 % des cellules fluorescent dans le bleu après une infection par CHA S-Bla, ce pourcentage atteint plus de 75 % pour les cellules infectées par les souches CHAΔS/S-Bla et

CHAΔS/S_{R146A}-Bla. En revanche, l'infection avec la souche CHAΔBD/S_{R46A}-Bla conduit à seulement 2,7 % des cellules contenant du CCF2 clivé.

Il apparaît très clairement que le système rapporteur ExoS-Bla est fonctionnel pour étudier l'injection d'ExoS-Bla par le SST3. La souche de *P. aeruginosa* CHA S-Bla exprime la toxine ExoS alors que les souches CHAΔS/S-Bla et CHAΔS/S_{R146A}-Bla ne l'expriment plus. Cette différence se traduit par une MFI deux fois inférieure avec la souche CHA S-Bla. Cette différence de MFI traduit un niveau d'injection plus faible certainement dû à un phénomène de compétition entre ExoS et ExoS-Bla soit pour l'interaction avec la chaperonne SpcS dans la bactérie, soit pour le passage à travers l'aiguille. Que le domaine GAP de ExoS soit fonctionnel (CHAΔS/S-Bla) ou non (CHAΔS/S_{R146A}-Bla) dans la toxine chimérique, la MFI et le pourcentage de cellules injectées ne sont pas affectés. Ceci indique que dans notre modèle d'injection, le phénomène de rétrocontrôle négatif de l'activation du SST3 de *P. aeruginosa* dû à l'action d'ExoS sur la cellule cible (Cisz *et al.*, 2008) n'est pas perceptible peut-être en raison de sa haute sensibilité qui conduit à un signal de fluorescence maximal pour une faible quantité de toxines chimériques injectées.

La souche CHAΔBD/S_{R146A}-Bla n'exprime pas les translocateurs mais sécrète encore les effecteurs. Elle n'est cependant pas capable d'injecter ExoS-Bla dans la cellule A549, ce qui démontre clairement que l'injection est dépendante du SST3 et donc de la capacité de la souche à insérer un translocon fonctionnel dans les membranes.

L'utilisation du système rapporteur fluorescent β-lactamase/CCF2 couplée à une analyse par cytométrie en flux permet donc de quantifier les cellules permissives à l'injection d'ExoS-Bla et de réaliser des analyses statistiques. Dans la suite des expériences, seul le pourcentage de cellules bleues ayant reçues une injection de toxines est indiqué.

I.3 - Discussion

Après avoir été développé initialement chez *E. coli* (Charpentier and Oswald, 2004), le système rapporteur β-lactamase CCF2 a été optimisé dans un grand nombre de bactéries afin de suivre l'injection des effecteurs du SST3 dans les cellules cibles. Mais lorsque nous avons débuté ce travail, aucune donnée concernant l'utilisation de ce système chez *P. aeruginosa* n'était disponible. Les travaux ont d'abord consisté à réaliser deux toxines chimériques : ExoS-Bla et ExoY-Bla puis à obtenir différentes souches de bactéries CHA ou PAO1 exprimant l'une ou l'autre de ces deux toxines. Les conditions de chargement en CCF2 des

différents types cellulaires ont été optimisées, et nous sommes parvenus à déterminer que tous les types cellulaires d'origine hématopoïétique testés pouvaient être utilisés avec les conditions standards données par le fabricant du CCF2. En revanche, la lignée cellulaire épithéliale pulmonaire A549 s'est révélée plus difficile à manipuler, très probablement en raison d'une vitesse d'entrée du CCF2 inférieure aux autres types cellulaires entraînant une sensibilité accrue du CCF2 aux activités de type estérase contenues dans le SVF. Le réglage des conditions de mesure de la fluorescence du CCF2 clivé *versus* CCF2 non clivé a pu être établi et maîtrisé dans le cadre de l'analyse en cytométrie de flux. Finalement l'analyse de la susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla dans les cellules A549 a démontré la parfaite adaptation du système rapporteur β -lactamase CCF2 à notre problématique. En effet, nous sommes en mesure de détecter l'injection d'une toxine chimérique transloquée par le SST3 de *P. aeruginosa* dans une cellule cible.

Globalement cette approche permet de coupler la puissance du système β -lactamase/CCF2 à la puissance analytique de la cytométrie en flux : mesure directe de la translocation des toxines chimériques, analyse de population importante de cellules, possibilité de mesurer la quantité de toxines injectée dans chaque cellule, ce qui permet d'appréhender un comportement hétérogène au sein d'une même population.

Ces outils ont également été utilisés par d'autres personnes du laboratoire mais en utilisant une lecture par spectrofluorimétrie en plaque 96 puits. Cette approche ne permet pas contrairement à la cytométrie en flux de réaliser une analyse cellule par cellule, mais est toutefois adaptée pour développer des approches de screening.

Durant la réalisation de ma thèse, des travaux basés sur l'utilisation de la protéine chimérique ExoU/ β lactamase ont permis d'identifier les cellules phagocytaires comme principales cibles de l'injection d'ExoU *in vivo* chez la souris (Diaz and Hauser, 2010). Ces travaux furent les premiers avec ceux de Aiello (Aiello *et al.*, 2010) qui décrivent l'utilisation de ce système chez *P. aeruginosa*.

II - Etude de l'injection d'ExoS-Bla par le SST3 de *P. aeruginosa* dans différentes lignées cellulaires

Les voies aériennes pulmonaires sont les portes d'entrées privilégiées de *P. aeruginosa*. Chez l'homme, les cibles principales de *P. aeruginosa* sont les cellules épithéliales pulmonaires mais également les cellules myéloïdes comme les macrophages résidents et les neutrophiles recrutés suite à l'infection. Dans un modèle d'infection intranasale murin, le répertoire des leucocytes ayant reçu une injection de toxines reflète strictement l'abondance relative des cellules dans les poumons (Diaz and Hauser, 2010). Nous avons donc voulu évaluer la susceptibilité à l'injection de toxines de différentes lignées cellulaires humaines en utilisant le système rapporteur CCF2/ β -lactamase.

II.1 - Les cellules sensibles à l'injection d'ExoS-Bla

Des cellules de la lignée épithéliales pulmonaires A549, des lymphocytes B Bjab ainsi que des lymphocytes T Jurkat sont infectés en présence de la souche CHA Δ S/S_{R146A}-Bla (*Figure 25A*) ou de la souche PAO1F Δ 3TOX/S_{R146A}-Bla (*Figure 25B*). La souche PAO1F Δ 3TOX n'exprime aucune exotoxine, contrairement à CHA Δ S qui exprime ExoT et ExoY. Après 3 h d'infection à une MOI de 10, les cellules sont mises en présence de CCF2 et sont analysées par cytométrie en flux.

Les trois types cellulaires sont susceptibles à l'injection d'ExoS-Bla par la souche CHA Δ S/S_{R146A}-Bla avec un pourcentage de cellules injectées voisin de 80 % (*Figure 25A*). L'infection avec une souche différente, appelée PAO1F Δ 3TOX/S_{R146A}-Bla conduit à un pourcentage comparable de cellules injectées (*Figure 25B*). Or, en plus d'être dépourvue d'ExoS comme la souche CHA, cette souche est dépourvue des deux effecteurs ExoT et ExoY. Donc si l'un de ces deux effecteurs avait eu un impact négatif sur l'injection d'ExoS-Bla, le pourcentage de cellules injectées aurait probablement été inférieur avec la souche CHA Δ S/S_{R146A}-Bla. Les trois types cellulaires, cellules épithéliales, lymphocytes B et lymphocytes T humains présentent donc la même susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla par les deux souches CHA Δ S/S_{R146A}-Bla et PAO1F Δ 3TOX/S_{R146A}-Bla.

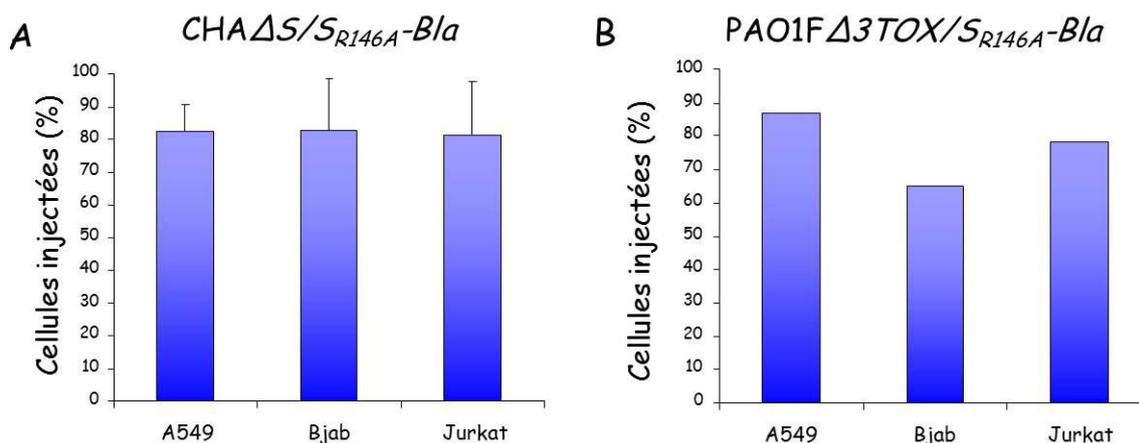


Figure 25 : Susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla de différents types cellulaires

Les cellules A549, BJAB et Jurkat sont infectées par la souche CHAΔS/S_{R146A}-Bla (A) ou PAO1FΔ3TOX/S_{R146A}-Bla (B) à une MOI de 10. Après 3 h d'infection, les cellules A549 sont mises en présence de 1 μM de CCF2 pendant 90 min, les cellules BJAB et Jurkat sont mises en présence de 1 μM de CCF2 pendant 30 min. L'intensité de fluorescence bleue est analysée par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules dans lesquelles la toxine ExoS-Bla a été injectée.

II.2 - Les cellules résistantes à l'injection

II.2.1 - Les cellules myéloïdes HL-60, U937 et THP1

Les lignées HL-60, U937 et THP1 sont toutes issues de patients atteints de leucémie aiguë. La lignée HL-60 a été isolée dans le sang d'un patient en 1977 (Collins *et al.*, 1977). Cette lignée dite promyélocytaire se situe à un stade de différenciation entre le progéniteur myéloïde et le progéniteur granulocytaire. Elle est de forme arrondie, n'adhère pas et ne phagocyte pas. La lignée U937 a été isolée à partir d'un lymphome histiocytaire en 1976 (Sundstrom and Nilsson, 1976) et la lignée THP1 dans le sang d'un patient en 1980 (Tsuchiya *et al.*, 1980). Ces deux dernières lignées dites promonocytaires sont plus engagées dans l'hématopoïèse que les cellules HL-60 (Figure 26). Elles n'adhèrent pas, sont relativement rondes.

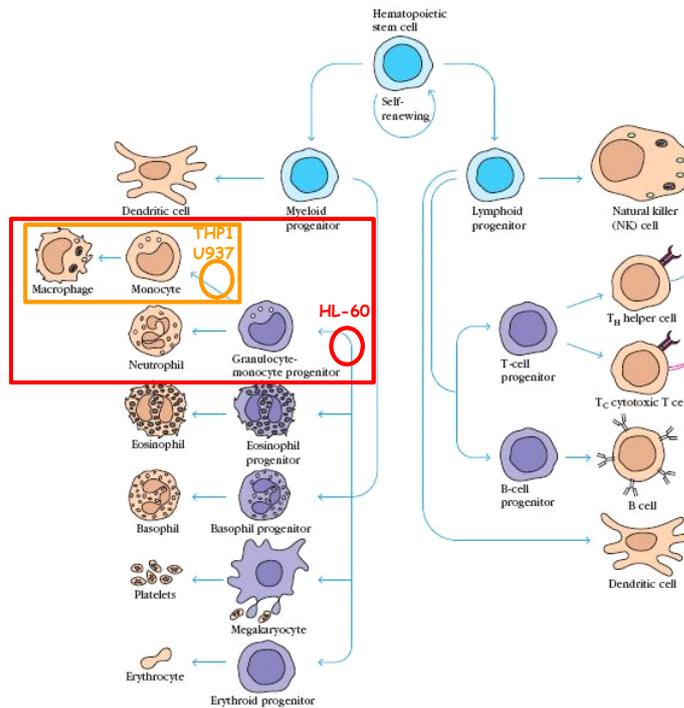


Figure 26 : Situation des cellules HL-60, U937 et THP1 par rapport à la différenciation hématopoïétique

La lignée cellulaire HL-60 se situe entre le stade progéniteur myéloïde et le stade progéniteur des granulocytes (en rouge). Les cellules U937 et THP1 sont dites promonocytaires car engagées dans la voie de différenciation en monocyte ou en macrophage (en orange). Toutes ces lignées peuvent être différenciées en monocyte/macrophage. Les cellules HL-60 peuvent également être différenciées en neutrophile.

La caractéristique de ces trois lignées est d’être bloquée à un stade précis de la différenciation mais surtout de pouvoir être différenciée en un stade plus mature en présence de différentes molécules. Lors de mes recherches, les cellules HL-60 ont été différenciées en neutrophiles en présence de diméthylsulfoxyde (DMSO) (Collins *et al.*, 1978), en monocytes par la 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ (VitD3) (Tanaka *et al.*, 1983) et enfin en macrophages par le 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) ou d’acétate myristate de phorbol (PMA) (Rovera *et al.*, 1979). Les cellules U937 et THP1 peuvent être différenciées en monocyte ou macrophage (Figure 27). La différenciation entraîne un changement de morphologie des cellules. En présence de PMA, les cellules sont adhérentes. L’adhérence est moins prononcée dans le cas d’une différenciation par la VitD3 ou le DMSO.

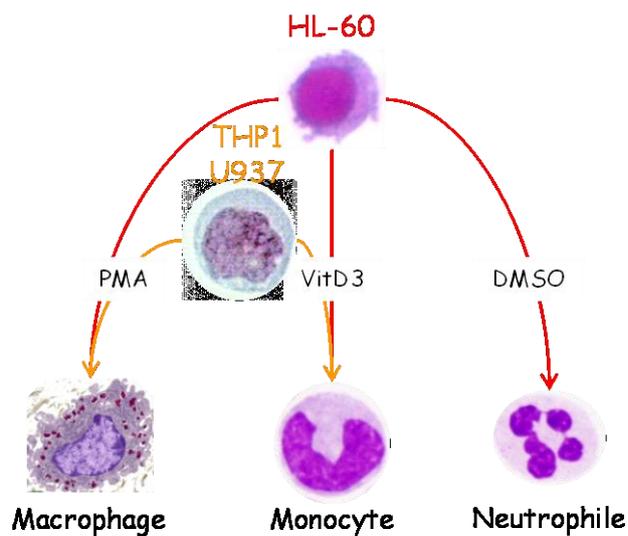


Figure 27 : Différenciation des cellules HL-60, U937 et THP1

Les cellules HL-60, U937 et THP1 peuvent se différencier en monocyte en présence de 1 α ,25 DihydroxyvitamineD3 (VitD3), en macrophage en présence d'acétate myristate de phorbol (PMA). Les cellules HL-60 peuvent également se différencier en neutrophile en présence de diméthylsulfoxyde (DMSO).

II.2.2 - Caractérisation de la lignée cellulaire HL-60

La différenciation des cellules HL-60 s'accompagne d'un ralentissement, voir de l'arrêt de la croissance selon l'agent de différenciation, de modifications morphologiques, et de modifications des propriétés d'adhérence. La modulation (augmentation ou diminution) de l'expression de gènes affecte également l'expression de différents CD (Cluster of Differentiation) utilisés pour suivre la différenciation. Parmi ces marqueurs CD11b (chaîne α de l'intégrine Mac1), absent dans les cellules HL-60 non différenciées (ND), est exprimé par les neutrophiles, les monocytes et les macrophages issus de la différenciation des HL-60 (White *et al.*, 2005). La recherche de la présence de CD11b à la surface des cellules HL-60 différenciées nous a permis de suivre le degré de différenciation.

L'intérêt de ce modèle cellulaire est donc d'étudier la susceptibilité à l'injection par le SST3 de *P. aeruginosa* avec la même cellule mais à deux stades de différenciation différents.

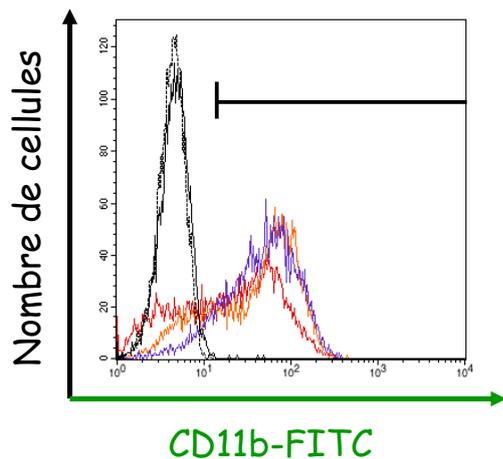


Figure 28 : Expression de CD11b à la surface des cellules HL-60 non différenciées ou différenciées en DMSO, VitD3 ou PMA.

Les cellules HL-60 sont différenciées en présence de 1,25 % de DMSO pendant 5 jours (rouge), de 10 ng/ml de PMA (violet) pendant 2 jours ou de 100 nM de VitD3 (orange) pendant 4 jours. Les cellules sont ensuite incubées avec un anticorps anti-CD11b couplé au FITC. Les cellules non différenciées sont représentées par la courbe noire en pointillés, les cellules incubées en absence d'anticorps sont représentées par la courbe noire.

L'expression de CD11b a été analysée par cytométrie en flux pour les trois conditions de différenciation (Figure 28). Comme attendu, CD11b est absent de la surface des cellules HL-60 ND mais est exprimé par 65 % des cellules HL-60 différenciées en DMSO, 92 % des cellules différenciées en PMA et 84 % des cellules différenciées en VitD3.

Un changement morphologique est également observé pour ces trois types de différenciation où des extensions cytoplasmiques sont visualisées. La totalité des cellules HL-60 PMA adhèrent alors que dans le cas des cellules HL-60 VitD3 et HL-60 DMSO, une partie de la population cellulaire reste encore en suspension.

La différenciation induite par ces trois molécules s'accompagne parfois d'une mortalité cellulaire importante que nous avons évaluée pour la suite de nos expériences. En effet, l'objectif était d'étudier la susceptibilité à l'injection des effecteurs par le SST3 dans des cellules vivantes. De plus, la rétention du CCF2 à l'intérieur des cellules est affectée par l'état de viabilité des cellules. La viabilité des cellules HL-60 a donc été testée après différenciation en utilisant l'iodure de propidium (IP), intercalant de l'ADN et de l'ARN. L'IP pénètre dans les cellules en phase tardive de l'apoptose ou dans les cellules nécrotiques dont la membrane est altérée.

Le pourcentage de cellules vivantes, c'est-à-dire IP négatives, est de 95 % pour les cellules HL-60 ND. De plus, 61 % des cellules HL-60 différenciées en DMSO, 73 % des cellules HL-60 différenciées en PMA et 95 % des cellules différenciées en VitD3 n'ont pas incorporé l'IP et sont donc vivantes (

Figure 29).

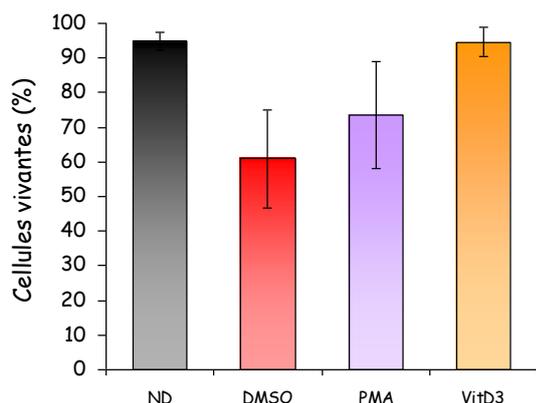


Figure 29 : Viabilité des cellules HL-60 après différenciation

Les cellules HL-60 non différenciées ou différenciées en DMSO, PMA ou VitD3 sont mises en présence d'iodure de propidium (IP) puis analysées par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules vivantes (négatives pour l'IP) est représenté.

Sur la base de l'expression du marqueur de surface CD11b, ainsi que sur la base de la viabilité des cellules, la différenciation par la VitD3 a été retenue dans la plupart des expériences suivantes.

II.2.2.1 - Le niveau de différenciation des cellules HL-60 conditionne la susceptibilité à l'intoxication par ExoS-Bla.

Rucks et Olson ont montré que les cellules HL-60 étaient résistantes à l'injection d'ExoS à l'état non différencié et sensibles lorsqu'elles étaient différenciées en PMA (Rucks and Olson, 2005). Dans un premier temps nous avons voulu vérifier cette hypothèse et l'étendre à différentes conditions de différenciation puis à d'autres types cellulaires et toxines.

La susceptibilité à l'injection de toxines par le SST3 a été étudiée avec des cellules HL-60 soit non différenciées (ND) soit différenciées en DMSO, PMA ou VitD3 en utilisant le système rapporteur β -lactamase/CCF2 (Figure 30).

L'infection des cellules HL-60 ND avec la souche CHA Δ S/S-Bla conduit à l'injection d'ExoS-Bla dans environ 10 % des cellules. A l'opposé plus de 80 % des cellules différenciées en DMSO, 50 % des cellules différenciées en PMA et 70 % des cellules différenciées en VitD3 ont été intoxiquées par ExoS-Bla. Le pourcentage de cellules HL-60 ND injectées s'explique très probablement par l'auto-différenciation spontanée de 5 à 10 % des cellules HL-60 fréquemment observée en culture (Fleck *et al.*, 2005).

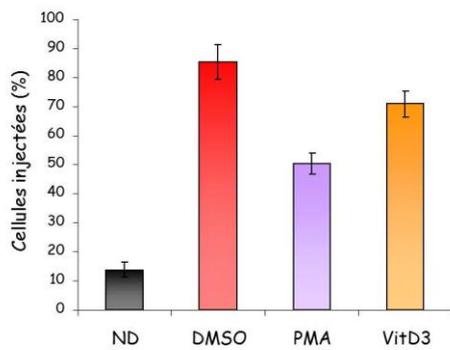


Figure 30 : Susceptibilité des cellules myéloïdes HL-60 ND ou différenciées à l'injection d'ExoS-Bla

Les cellules HL-60 non différenciées et différenciées en DMSO, PMA ou VitD3 sont infectées par la souche CHAΔS/S-Bla avec une MOI de 50. Après 3 h d'infection, les cellules sont incubées en présence de CCF2 pendant 30 min et analysées par cytométrie en flux.

Le niveau d'injection est comparable pour les HL-60 différenciées en VitD3 (70 %) ou différenciées en DMSO (80 %) mais il est clairement inférieur pour les cellules HL-60 différenciées en présence de PMA (50 %). La comparaison de ces résultats avec les résultats de différenciation présentés dans la Figure 28 nous indique qu'il n'y pas de corrélation stricte entre le pourcentage de cellules exprimant CD11b et le pourcentage de cellules intoxiquées par ExoS-Bla. Nous avons donc voulu déterminer l'influence du niveau de différenciation en VitD3 mesuré par la présence de CD11b sur la susceptibilité à l'intoxication par ExoS-Bla (Figure 31).

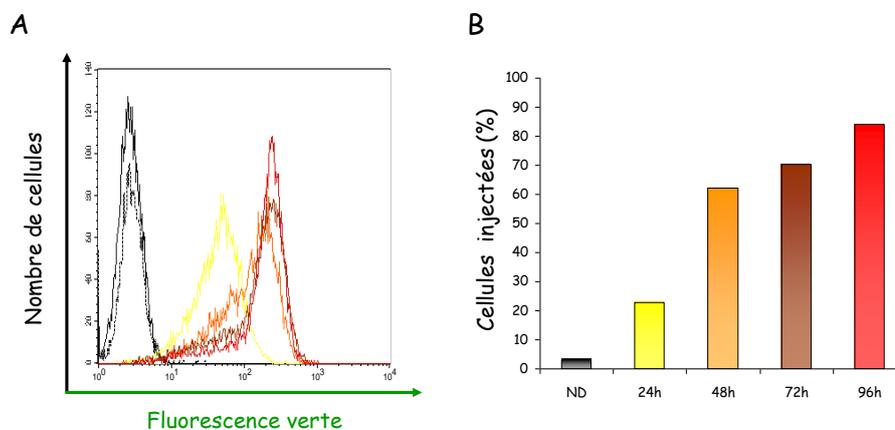


Figure 31: Cinétique de différenciation et d'injection d'ExoS-Bla dans les cellules HL-60 VitD3

A : Cinétique de différenciation des cellules HL-60 en présence de VitD3. Les cellules sont mises en présence de VitD3 pendant 24 h (jaune), 48 h (orange), 72 h (marron) et 96 h (rouge) puis sont incubées avec un anticorps anti-CD11b couplé au FITC et analysées par cytométrie en flux. La courbe noire représente les cellules HL-60 ND mises en présence de l'anticorps anti-CD11b. La courbe noire en pointillés représente les cellules HL-60 VitD3 incubées sans anticorps. Les MFI obtenues sont de 29 à J1, 113 à J2, 154 à J3, et 180 à J4.

B : Les cellules HL-60 différenciées en VitD3 pendant 24 h, 48 h, 72 h et 96 h sont infectées par la souche CHAΔS/S-Bla avec une MOI de 50. Après 3 h d'infection, les cellules sont incubées en présence de CCF2 pendant 30 min et analysées par cytométrie en flux.

Après 24 h en présence de VitD3, alors que toutes les cellules sont positives pour l'expression de CD11b mais avec un niveau d'expression faible (MFI de 29), seulement 23 % sont susceptibles à l'intoxication par ExoS-Bla.

Entre 48 h et 96 h de différenciation, une augmentation de l'expression de CD11b à la surface des cellules est observée avec des MFI respectives de 113 à J2, 154 à J3 et 180 à J4 (*Figure 31A*). La susceptibilité à l'injection de toxines devient également supérieure avec plus de 80 % de cellules injectées (*Figure 31B*). Le niveau d'expression de CD11b à J1 est 6 fois inférieur à celui observé à J4, jour pour lequel l'intoxication par ExoS-Bla est maximale. Ces résultats indiquent que la différenciation induit bien une acquisition de la sensibilité à l'injection d'ExoS-Bla par le SST3 de *P. aeruginosa* et que le niveau d'expression de CD11b est important.

En résumé, la différenciation cellulaire semble induire le passage d'un état de résistance à un état de sensibilité à l'injection de toxines. Ces résultats indiquent clairement que les cellules HL-60 ND sont résistantes à l'injection d'ExoS-Bla et que dès qu'elles sont différenciées en monocytes, macrophages ou neutrophiles elles acquièrent une susceptibilité à l'intoxication par le SST3 de *P. aeruginosa*. Ces résultats sont en accord avec ceux démontrant l'ADP-ribosylation des substrats d'ExoS observés dans les cellules HL-60 différenciées en PMA mais pas dans les HL-60 ND (Rucks and Olson, 2005).

Nous avons également testé l'injection d'une autre toxine avec le même système rapporteur, la toxine ExoY-Bla (*Figure 32*). La souche PAO1FΔ3TOX n'exprimant aucune des trois toxines ExoS, ExoY et ExoT a été transformée pour exprimer soit la toxine ExoS-Bla soit la toxine ExoY-Bla. Des HL-60 ND ou des HL-60 VitD3 ou HL-60 PMA ont été mises en présence des souches CHA et PAO1F. Comme déjà observé pour ExoS-Bla, ExoY-Bla n'est pas injectée dans les HL-60 ND alors que le pourcentage d'injection dans les HL-60 VitD3 ou HL-60 PMA est compris entre 60 et 80 %. La capacité des cellules HL-60 ND à résister à l'injection des toxines par le SST3 concerne donc deux toxines différentes ExoY et ExoS.

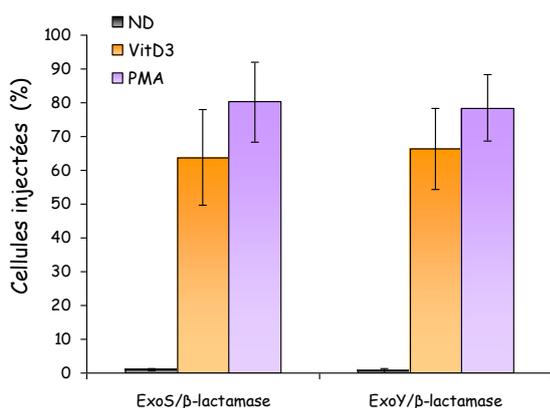


Figure 32 : Susceptibilité des cellules HL-60 à l'injection d'ExoS-Bla et d'ExoY-Bla.

Les cellules HL-60 non différenciées (noir) ou différenciées en VitD3 (orange) ou en PMA (violet) sont infectées par la souche PAO1FΔ3TOX/S_{RI46A}-Bla ou PAO1FΔ3TOX-Y-Bla à une MOI de 10. Après 3 h d'infection, les cellules sont incubées en présence de CCF2 pendant 30 min et analysées par cytométrie en flux.

II.2.2.2 - Effet de la MOI sur l'injection d'ExoS-Bla

L'influence de la MOI (Multiplicity Of Infection, ou rapport bactéries/cellules) a été étudiée afin de déterminer une MOI optimale. Les cellules HL-60 ND ou différenciées en VitD3 ont été infectées en présence de la souche CHAΔS/S-Bla à des MOI comprises entre 1 et 500 (Figure 33).

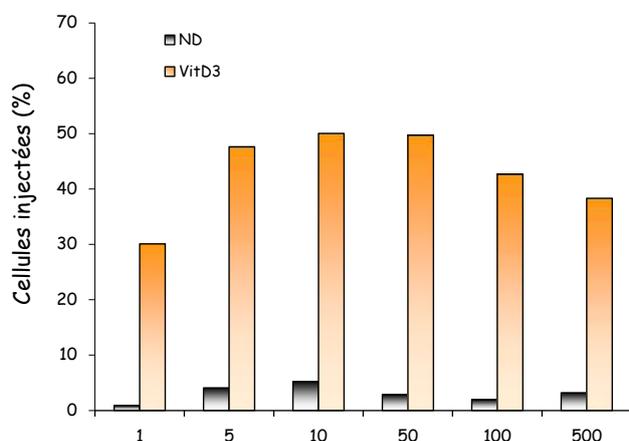


Figure 33 : Effet de la MOI sur la susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla dans les cellules HL-60 ND ou HL-60 VitD3

Les cellules HL-60 non différenciées (noir) ou différenciées en VitD3 (orange) sont infectées par la souche CHAΔS/S-Bla à une MOI de 1, 5, 10, 50, 100 ou 500. Après 3 h d'infection, les cellules sont incubées en présence de CCF2 pendant 30 min et analysées par cytométrie en flux.

Quelle que soit la MOI utilisée, les cellules HL-60 ND sont toujours résistantes à l'injection d'ExoS-Bla avec moins de 10 % de cellules intoxiquées. Pour les cellules HL-60 différenciées en VitD3 on observe une augmentation du pourcentage de cellules intoxiquées de 30 à 50 % quand la MOI passe de 1 à 10, une stabilisation à 50 % pour une MOI de 50, puis une légère diminution pour les MOI de 100 et de 500. Cette légère diminution observée

pour les MOI élevées s'explique peut-être par un effet de compétition des bactéries. La MOI optimale est donc comprise entre 5 et 50 et toutes les expériences ont donc été effectuées avec ces MOI. Il est à noter que le pourcentage de cellules intoxiquées, donc bleues varie d'une expérience à l'autre et se situe généralement entre 50 % et 90 % de cellules injectées

II.2.2.3 - Viabilité des cellules HL-60 après infection

La souche CHAΔS de *P. aeruginosa* injecte les effecteurs ExoT et ExoY, alors que la souche PAO1FΔ3TOX n'injecte aucune toxine par le SST3. Selon le type cellulaire injecté, l'effet des effecteurs est variable et peut aller d'une simple modification du cytosquelette à l'apoptose de la cellule. La souche CHAΔS est dépourvue d'ExoS fonctionnel mais contient encore ExoT et ExoY. Nous avons donc voulu déterminer l'incidence de l'injection de ces effecteurs par la souche CHAΔS/S-Bla sur la viabilité des cellules HL-60 VitD3 (Figure 34).

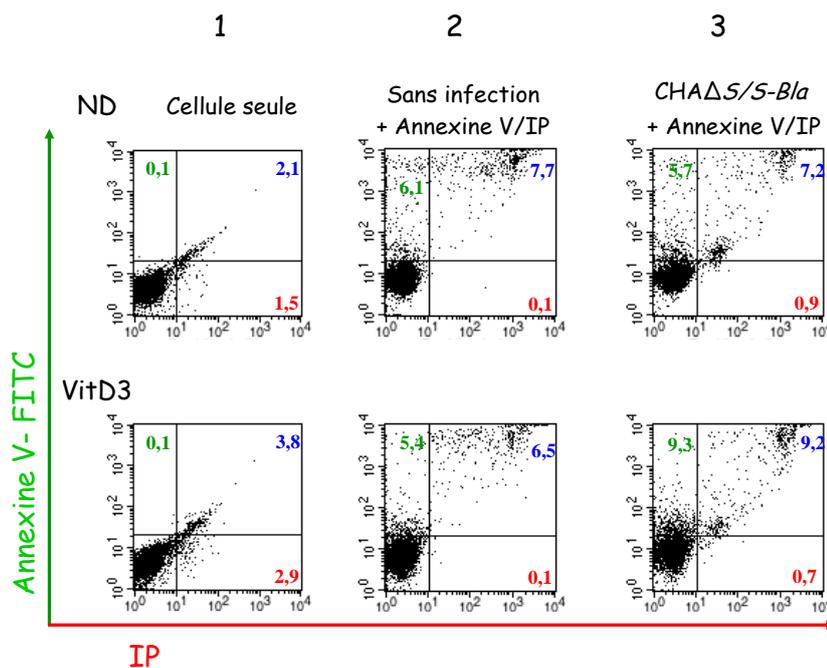


Figure 34 : Viabilité des cellules HL-60 après infection

Les cellules HL-60 ND ou HL-60 VitD3 sont infectées ou non en présence de la souche CHAΔS/S-Bla pendant 3 h puis sont incubées en présence d'annexine V couplé au FITC et d'iodure de propidium (IP) et analysées par cytométrie en flux. Les populations de cellules pré-apoptotiques émettant une fluorescence verte de l'annexine V-FITC sont visualisées dans les quadrants supérieurs, les cellules apoptotiques ou nécrotiques émettant une fluorescence rouge de l'IP sont visibles dans les quadrants de droite. Le nombre de cellules est indiqué dans chaque quadrant.

Les cellules HL-60 non différenciées et différenciées en VitD3 ont été incubées en absence (*Figure 34, colonne 1 et 2*) ou en présence de la souche CHAΔS/S-Bla (*Figure 34, colonne 3*). Le marquage à l'annexine V (AV) et à l'iodure de propidium (IP) permet de distinguer 4 populations de cellules : les cellules négatives pour l'AV et l'IP (*quadrant inférieur gauche*), qui sont des cellules vivantes, les cellules AV positives et IP négatives (*quadrant supérieur gauche*), qui sont des cellules en début d'apoptose, les cellules AV positives et IP positives (*quadrant supérieur droit*) qui sont des cellules en phase tardive d'apoptose ou en début de nécrose, et les cellules AV négatives et IP positives (*quadrant supérieur droit*) qui sont des cellules nécrotiques. En absence d'infection, 6,1 % des cellules HL-60 ND et 6,4 % des cellules HL-60 VitD3 sont en apoptose précoce et 7,7 % des cellules HL-60 ND et 6,5 % des cellules HL-60 VitD3 sont en apoptose tardive (*Figure 34, colonne 2*). Après infection par la souche CHAΔS/S-Bla, le nombre de cellules HL-60 ND en apoptose précoce (5,7 %) ou tardive (7,2 %) ne varie pas significativement (*Figure 34, colonne 3*). Par contre le nombre de cellules HL-60 VitD3 en apoptose précoce augmente légèrement et passe de 5,4 à 9,3 % et le nombre de cellules en apoptose tardive passe de 6,5 à 9,2 % (*Figure 34, colonne 3*).

Une infection avec CHAΔS/S-Bla n'a pas d'effet sur la viabilité des cellules HL-60 ND et induit une augmentation significative du nombre de cellules HL-60 VitD3 apoptotiques mais ce pourcentage est relativement faible comparativement au nombre de cellules vivantes qui reste voisin de 80 %. En conclusion, dans les conditions d'infection avec la souche mutante dépourvue d'ExoS active, la viabilité cellulaire est très faiblement affectée et reste compatible avec l'utilisation du système rapporteur ExoS-Bla/CCF2.

II.2.3 - Susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla des cellules U937 et THP1

Contrairement aux cellules HL-60 qui sont bloquées à un stade de différenciation plus précoce (stade promyélocytaire) et qui peuvent être engagées dans une voie de différenciation en monocyte ou en granulocyte, les cellules U937 et THP1 sont bloquées plus en aval ; elles sont dites pro-monocytaires et ne peuvent être engagées que dans la voie de différenciation en monocyte en présence de VitD3 ou en macrophage en présence de PMA.

Le phénotype des cellules obtenues avant ou après différenciation en VitD3 a été analysé par cytométrie en flux sur la base de l'expression du marqueur CD11b. Les cellules

U937 ou THP1 non différenciées expriment un niveau basal de CD11b avec une MFI respective de 13 et de 60,8. Après différenciation en VitD3, le niveau d'expression de CD11b augmente d'un facteur 6 avec une MFI de 76 pour les U937 et d'un facteur 4 avec une MFI de 260 pour les THP1 (*Figure 35*). L'expression constitutive d'un faible niveau de CD11b peut être reliée au fait que ces deux types cellulaires sont déjà engagés dans une voie de différenciation de type monocyte, contrairement aux cellules HL-60 qui sont bloquées plus en amont.

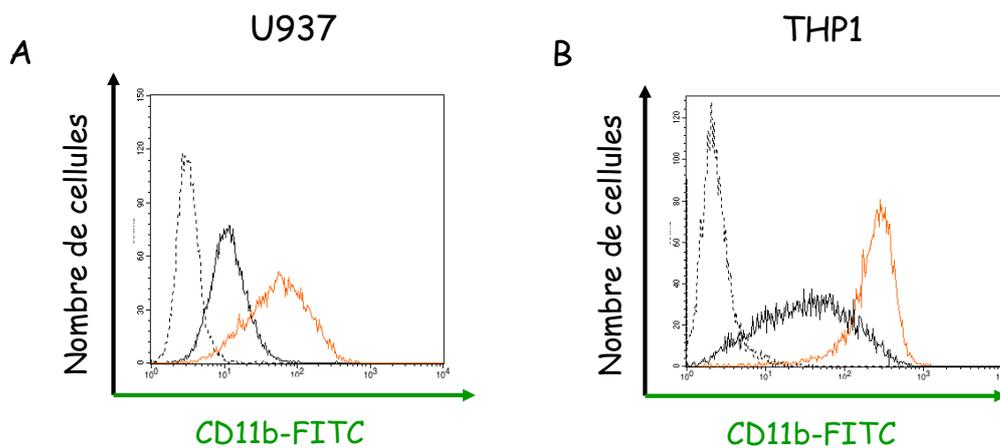


Figure 35 : Expression de CD11b à la surface des cellules U937 et THP1 non différenciées ou différenciées en VitD3 ou PMA.

Les cellules U937 (A) et THP1 (B) sont différenciées en présence de 100 nM de VitD3 (en orange). Les cellules sont ensuite incubées avec un anticorps anti-CD11b couplé au FITC. Les cellules incubées en absence d'anticorps sont représentées par la courbe noire en pointillés. Les cellules non différenciées sont représentées par la courbe noire pleine.

Les cellules U937 et THP1 non différenciées ou différenciées en VitD3 ont été infectées par la souche PAO1FΔ3TOX/S_{R146A}-Bla ou par la souche PAO1FΔ3TOX/Y-Bla (*Figure 36*). Une faible quantité de cellules U937 ND est sensible (12 %) à l'injection d'ExoS-Bla et d'ExoY-Bla. La différenciation en VitD3 induit une augmentation importante de la susceptibilité à l'injection avec 70 % de cellules injectées (*Figure 36A*).

Pour les cellules THP1 non différenciées, 50 % des cellules sont sensibles à l'injection d'ExoS-Bla. La différenciation en VitD3 induit la susceptibilité à l'injection de la quasi-totalité des cellules THP1 (*Figure 36B*). Contrairement aux cellules HL-60 ND qui sont toutes négatives pour l'expression de CD11b mais résistantes à l'injection d'ExoS-Bla, les cellules U937 et THP1 déjà engagées dans une voie de différenciation sur le lignage monocyte expriment constitutivement un faible niveau de CD11b qui est plus important pour les cellules

THP1 que pour les cellules U937. Or, les cellules U937 ND présentent une résistance équivalente à celle observée avec les HL-60 ND, alors que les cellules THP1 sont partiellement sensibles à l'injection à l'état non différencié. Ces résultats sont à relier à ceux de la Figure 35 qui montrent un lien étroit entre le niveau d'expression de CD11b et la susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla.

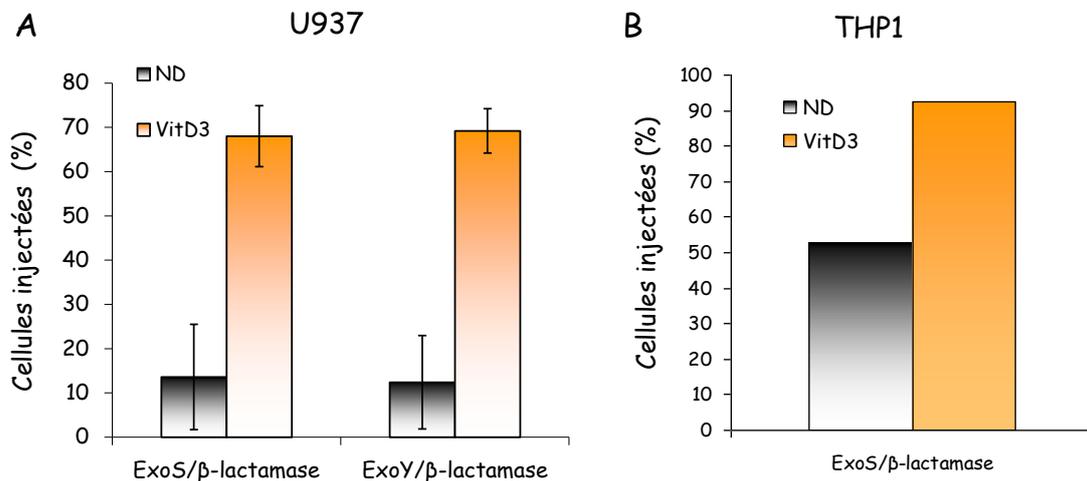


Figure 36 : Susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla et d'ExoY-Bla des cellules U937 et THP1 non différenciées ou différenciées.

A : Les cellules U937 ND (noir) ou U937 VitD3 (orange) sont infectées par la souche PAO1FΔ3TOX/S_{R146A}-Bla ou PAO1FΔ3TOX/Y-Bla à une MOI de 10.

B : Les cellules THP1 ND (noir) ou THP1 VitD3 (orange) sont infectées par la souche PAO1FΔ3TOX/S_{R146A}-Bla à une MOI de 10. Après 3 h d'infection, les cellules sont incubées en présence de CCF2 pendant 30 min et analysées par cytométrie en flux.

Ces résultats nous montrent une résistance totale des cellules HL-60 ND à l'injection d'ExoS-Bla ou d'ExoY-Bla, suite à la différenciation des cellules, cette résistance est levée et les cellules deviennent toutes sensibles à l'injection. Ce phénomène de résistance à l'état non différencié est également retrouvé dans un des deux types cellulaires proche des cellules HL-60 : les cellules U937. Les cellules THP1, bien que similaire d'un point de vue phénotypique aux cellules U937, se comportent de manière intermédiaire entre les cellules HL-60 et tous les autres types cellulaires testés (A549, BJAB, Jurkat) : elles sont partiellement résistantes à l'injection. La suite des travaux présentés a donc eu pour objectif de déterminer l'origine de cette résistance à l'injection par le SST3 de *P. aeruginosa*.

II.3 - L'induction du SST3 de *P. aeruginosa* est identique suite au contact avec les cellules HL-60 non différenciées ou différenciées

L'activation du SST3 constitue un préalable nécessaire à l'injection des effecteurs dans les cellules cibles. Cette activation requiert la sécrétion d'ExsE par l'aiguille afin de libérer ExsC qui peut alors interagir avec ExsD libérant ainsi ExsA qui régule alors sa propre synthèse ainsi que celle des autres protéines du SST3 (Diaz *et al.*, 2011). L'activation du SST3 peut être induite par deux moyens, soit une déplétion en calcium en présence d'EGTA, soit la mise en contact avec des cellules eucaryotes. Pour notre étude, il était nécessaire de vérifier qu'une variation de l'induction du SST3 de *P. aeruginosa* n'était pas à l'origine de la différence de susceptibilité à l'injection des cellules HL-60 ND et HL-60 différenciées et que les deux types de cellules induisaient une activation du SST3 équivalente.

La souche CHA a été transformée par un plasmide *pIAPC-gfp* permettant l'expression du gène codant la GFP (Green Fluorescence Protein) sous le contrôle du promoteur *pexsCEBA*, cible du facteur de transcription ExsA (souche CHA *pCgfp*). L'augmentation de l'expression d'ExsA, et donc l'induction du SST3 en présence d'EGTA ou au contact des cellules HL-60 a été analysée et quantifiée par cytométrie en flux en détectant le signal de fluorescence de GFP dans les bactéries (*Figure 37*).

La souche CHA qui n'exprime pas la GFP constitue le contrôle négatif avec une MFI de 2,6 (*Figure 37A*). En absence d'EGTA, deux populations de bactéries positives pour l'expression de la GFP avec des MFI respectives de 8,5 et de 60 sont observées (*Figure 37A*). Ces résultats indiquent une activation basale du SST3 en milieu LB mais avec une population dont le SST3 est faiblement induit et une autre population pour laquelle le niveau d'induction est 7 fois supérieur. En présence d'EGTA, on obtient un marquage homogène avec une seule population dont le niveau d'expression de la GFP est augmenté avec une MFI de 83 (*Figure 37A*).

La fluorescence de CHA *pCgfp* est ensuite analysée lorsque les bactéries sont mises en présence de RPMI contenant 10 % de SVF. La fluorescence des bactéries est fortement augmentée avec une MFI de 133 (*Figure 37B*) mais avec un pic dissymétrique traduisant une hétérogénéité dans l'induction du SST3. Le milieu de culture à lui seul induit une expression plus forte des gènes du SST3 qu'en présence d'EGTA. Le SVF contient des facteurs appelés TSF (Type III Secretion Factors) tels que l'albumine qui possède une faible affinité mais de nombreux sites de fixations pour les ions Ca^{2+} permettant de chélater le calcium et conduisant

à l'activation du SST3 (Kim *et al.*, 2005). Ceci pourrait donc expliquer l'induction du SST3 observée avec le milieu RPMI SVF 10 %.

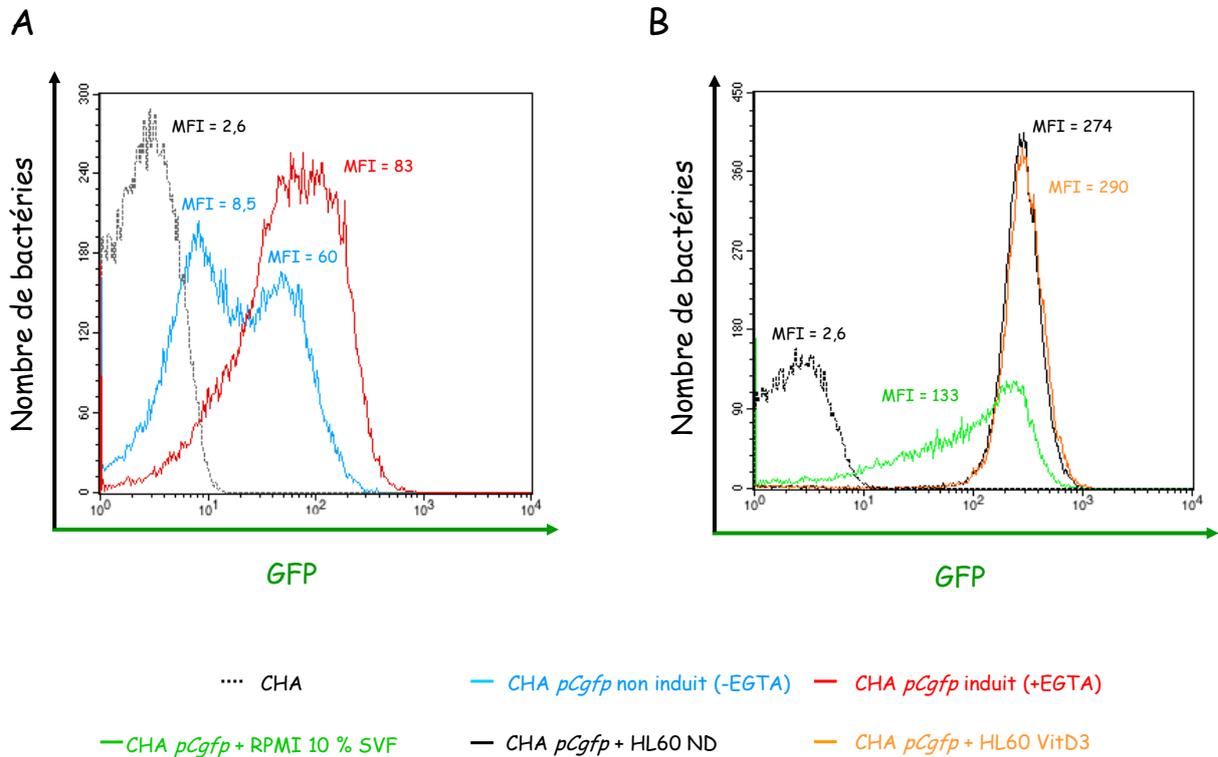


Figure 37 : Induction du SST3 de *P. aeruginosa* en présence d'EGTA et des cellules HL-60 ND ou HL-60 VitD3

A : Induction du SST3 par l'EGTA. La souche CHA pCgfp est incubée en présence (rouge) ou en absence (bleu) de 5 mM d'EGTA dans le milieu LB à une DO_{600nm} de 0,1. La fluorescence de la GFP présente dans les bactéries est mesurée par cytométrie en flux quand la DO_{600nm} atteint 1. La souche CHA est représentée par la courbe noire en pointillée.

B : Induction du SST3 au contact des cellules HL-60. La souche CHA pCgfp est mise en présence de milieu RPMI contenant 10 % de SVF (vert) ou incubée avec les cellules HL-60 ND (courbe noire pleine) ou avec les cellules HL-60 VitD3 (orange) dans du milieu RPMI contenant 10 % de SVF durant 3 h à une MOI de 50. La souche CHA est représentée par la courbe noire en pointillée. La fluorescence de la GFP présente dans les bactéries est analysée par cytométrie en flux.

Lorsque la souche CHA pCgfp est mise en présence de cellules HL-60 non différenciées, la fluorescence des bactéries est fortement augmentée avec une MFI de 274. Le même niveau d'expression de la GFP est observé en présence de cellules HL-60 VitD3 avec une MFI équivalente de 290 (Figure 37B). Dans les deux cas, HL-60 ND ou HL-60 VitD3, les pics obtenus sont fins et symétriques traduisant un niveau d'induction homogène. Le niveau

d'induction du SST3 est donc deux fois plus élevé quand CHA *pCgfp* est mis en présence de cellules HL-60 ND ou HL-60 VitD3 comparativement à l'incubation en RPMI SVF 10 %. Ces résultats confirment l'implication d'un contact avec les cellules cibles dans l'augmentation de l'expression des gènes du SST3. Que les cellules soient différenciées ou non, l'induction du SST3 est donc identique. La résistance des cellules HL-60 ND à l'injection de toxines n'est donc pas due à un défaut d'induction du SST3 de *P. aeruginosa*.

II.4 - Adhérence de *P. aeruginosa* aux cellules HL-60

La résistance des cellules HL-60 ND à l'injection de toxines peut s'expliquer par un défaut d'association des bactéries aux cellules, étape préalable nécessaire pour permettre l'induction du SST3 et l'injection des effecteurs dans la cellule. Nous avons donc comparé l'interaction de la souche CHA avec les cellules HL-60 ND ou HL-60 VitD3. L'association des bactéries aux cellules a été mesurée en présence ou en absence de cytochalasine D (CytoD), un inhibiteur de la phagocytose. Des cellules HL-60 ND et HL-60 VitD3 prétraitées ou non avec de la CytoD, sont mises en présence d'une souche CHA exprimant la GFP sous le contrôle d'un promoteur constitutif pX2 (souche CHA *pX2gfp*). Après 3 h d'infection avec la souche CHA *pX2gfp* les cellules ont été lavées trois fois pour éliminer les bactéries non associées puis analysées par cytométrie de flux.

La Figure 38 montre qu'en absence de CytoD le pourcentage de cellules associées à CHA *pX2gfp* est de 3 % pour les cellules HL-60 ND et de 23 % pour les cellules HL-60 VitD3. Avec le traitement à la CytoD, le nombre de cellules associées aux bactéries ne varie pas significativement, ce qui indique une absence de bactéries intracellulaires.

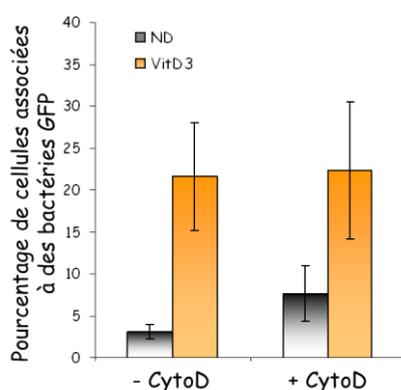


Figure 38 : Association de la souche CHA *pX2gfp* aux cellules HL-60

Les cellules HL-60 ND (noir) et HL-60 VitD3 (orange) sont traitées ou non avec 10 μ M de CytoD pendant 30 min puis incubées avec la souche CHA *pX2gfp* en présence ou non de CytoD. Les cellules sont ensuite lavées trois fois avec du PBS puis analysées en cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules vertes correspondant au nombre de cellules associées à CHA *pX2gfp* est représenté.

Ces résultats démontrent que l'adhérence de CHA *pX2gfp* aux cellules HL-60 VitD3 est favorisée par rapport aux cellules HL-60 ND. En revanche, cette technique ne permet pas de déterminer le nombre exact de bactéries par cellules.

Nous avons donc déterminé le nombre de bactéries par cellule sur milieu gélosé après lyse des cellules HL-60. Les cellules HL-60 ND ou HL-60 VitD3, préalablement infectées avec la souche CHA *pX2gfp*, sont traitées en présence de gentamycine. Cet antibiotique est un bactéricide qui détruit les bactéries extracellulaires associées aux cellules sans affecter la viabilité des bactéries ayant été internalisées dans la cellule. Les cellules ont été prétraitées ou non à la CytoD puis infectées. Après trois lavages, les cellules sont incubées ou non en présence de gentamycine puis sont lysées. Le lysat est ensuite étalé sur un milieu gélosé LB Agar (Tableau 7).

	Traitement	Nombre de bactéries par cellule
HL-60 ND	Aucun	4,1+/-0,5
	Gentamycine	0,5+/-0,7
	Cytochalasine D	4,2+/-0,8
	Gentamycine + Cytochalasine D	0,4+/-0,5
HL-60 VitD3	Aucun	5,7+/-0,5
	Gentamycine	0,6+/-0,6
	Cytochalasine D	5,4+/-0,3
	Gentamycine + Cytochalasine D	0,6+/-0,8

Tableau 7 : Détermination du nombre de bactéries associées aux cellules HL-60

Les cellules HL-60 ND et HL-60 VitD3 prétraitées ou non en présence de 10 µM de cytochalasine D sont infectées par la souche CHA pX2gfp pendant 3 h. Après trois lavages avec du PBS et une incubation des cellules en présence de 800 µg/ml de gentamycine pendant 1 h, les cellules sont lysées dans du PBS contenant 1 % de Triton X-100. Une partie du lysat est étalé sur un milieu LB gélosé contenant 300 µg/ml de carbénicilline. Après 24 h d'incubation, les colonies sont comptées.

Sans traitement (absence de gentamycine et de cytochalasine D) on compte 4,1 bactéries par cellule HL-60 ND et 5,7 bactéries par cellule HL-60 VitD3. La quantité de bactéries associées aux cellules HL-60 ND n'est donc pas sensiblement différente de celle associée aux cellules HL-60 VitD3. Que les cellules soient différenciées ou non, aucune

colonie n'a été observée suite au traitement à la gentamycine. Le traitement des cellules avec la CytoD n'a quant à lui aucun effet sur le nombre de colonies confirmant ainsi l'absence de bactéries intracellulaires observée précédemment par cytométrie en flux.

En associant ces résultats avec ceux de cytométrie, on obtient 23 % de cellules HL-60 VitD3 associées à 5,7 bactéries. Il n'existe pas de lien direct entre le nombre de cellules HL-60 VitD3 sensibles à l'injection d'ExoS-Bla (environ 70 %) et le nombre de cellules ayant des bactéries associées (environ 23 %). En effet, l'association des bactéries aux cellules HL-60 VitD3 semble transitoire puisque le nombre de cellules ayant reçues une injection d'ExoS-Bla est très supérieur au nombre de cellules HL-60 VitD3 retrouvées associées à des bactéries pour une même durée d'incubation de 3 heures.

Pour les HL-60 ND, on obtient seulement 7 % des cellules associées à 4,1 bactéries, soit un niveau 3 fois plus faible que pour les cellules HL-60 VitD3. A ce stade des résultats, nous ne pouvons exclure que le plus faible nombre de bactéries associées aux cellules HL-60 ND soit à l'origine de la plus faible injection d'ExoS-Bla dans ces cellules. Néanmoins, le fait que le niveau d'induction du SST3 (*Figure 37*) soit identique entre les deux types cellulaires semble en contradiction avec ces résultats et irait également dans le sens de la réversibilité de l'association bactérie/cellule.

Par des expériences d'étalement, Rucks avait montré que les cellules HL-60 ND possédaient plus de bactéries à leur surface que les cellules HL-60 PMA (HL-60 ND : $25,6 \pm 2,6$ bactéries par cellule ; HL-60 PMA : $8,5 \pm 0,8$) (Rucks and Olson, 2005). Ces études ayant été réalisées avec une souche différente, la souche P388, il est possible que la capacité d'adhérence des bactéries aux cellules soit différente.

II.5 - Discussion

Le système rapporteur CCF2/ β -lactamase nous a permis de tester la susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla et d'ExoY-Bla de différents types cellulaires. L'intérêt de ce système est de pouvoir quantifier le nombre de cellules injectées par des toxines, contrairement aux travaux de Rucks qui utilise une approche qualitative en détectant la modification des petites GTPases par ExoS (Rucks and Olson, 2005). Nous avons montré qu'ExoS-Bla et ExoY-Bla étaient injectées dans les cellules de la lignée épithéliale A549, des lignées lymphocytaires Jurkat et Bjab ainsi que des lignées myéloïdes HL-60, U937 et THP1 différenciées. Nous avons confirmé la résistance des cellules HL-60 ND à l'injection des effecteurs et avons

démontré qu'un autre type cellulaire proche en termes d'origine hématopoïétique, la lignée U937, présentait également une résistance à l'intoxication par les effecteurs de *P. aeruginosa*. Les cellules THP1 ND sont situées à un stade de différenciation plus avancé que les U937 ND, et présentent un profil de sensibilité intermédiaire avec environ 50 % des cellules sensibles à l'injection d'ExoS-Bla. Cette corrélation entre niveau de différenciation et susceptibilité à l'injection a également été vérifiée en montrant la corrélation entre le niveau d'expression de CD11b à la surface des cellules HL-60 et le degré de sensibilité à l'injection de toxines. A ce jour, les cellules HL-60 et U937 sont les deux seuls types cellulaires présentant une résistance à l'injection des effecteurs par le SST3 de *P. aeruginosa*.

Nous avons ensuite vérifié que l'induction du SST3 de *P. aeruginosa* était équivalente entre les deux types cellulaires : HL-60 ND et HL-60 VitD3. Les études menées en cytométrie de flux sur des bactéries exprimant la GFP comme rapporteur de l'expression des gènes du SST3 montrent que le SST3 est induit avec le même niveau d'expression en présence des cellules HL-60 ND et HL-60 VitD3. Ces observations sont équivalentes aux résultats de Rucks qui montrent la sécrétion de PopD dans les surnageants de culture des cellules HL-60 ND et HL-60 PMA infectées (Rucks and Olson, 2005). La résistance des cellules HL-60 ND à l'injection de toxines n'est donc pas reliée à un défaut d'induction du SST3 de *P. aeruginosa*. Ceci peut apparaître contradictoire avec le fait que le nombre de cellules HL-60 ND et HL-60 VitD3 associées aux bactéries est sensiblement différent. Il est donc très probable que l'association des bactéries aux cellules soit transitoire dans la mesure où le nombre de cellules HL-60 VitD3 associées à des bactéries (23 %) n'est pas directement relié au nombre de cellules injectées (entre 50 % à 90 %). Par des expériences d'étalement, Rucks et son équipe ont en revanche montré la présence d'une quantité un peu plus importante de bactéries associées aux cellules HL-60 ND qu'aux cellules HL-60 PMA (Rucks and Olson, 2005). Bien que ces résultats soient différents des nôtres (probablement en raison d'une souche différente de *P. aeruginosa*), ils prouvent encore une fois que l'adhérence des bactéries aux cellules HL-60 différenciées mesurée au bout de 3 h d'infection n'est pas corrélée à l'injection des toxines.

L'adhérence plus importante des bactéries aux cellules différenciées s'explique peut-être par un niveau d'expression plus important des récepteurs impliqués dans l'interaction avec *P. aeruginosa*. Alors que TRL2 est absent, TLR4 est présent à un même niveau d'expression dans les HL-60 ND et HL-60 VitD3 (Li *et al.*, 2002), il est donc peu probable que ces deux protéines jouent un rôle dans l'interaction avec *P. aeruginosa*. L'expression de CFTR est augmentée dans les cellules HL-60 différenciées en DMSO

comparativement aux cellules HL-60 ND (Painter *et al.*, 2006), mais sa présence dans les HL-60 VitD3 n'est pas connue à ce jour, son rôle n'est donc pas à exclure. La présence d'un récepteur spécifiquement exprimé par les HL-60 VitD3 est donc encore une hypothèse ouverte pour expliquer une association plus importante des bactéries aux cellules HL-60 VitD3.

III - Insertion du translocon dans les membranes plasmiques des cellules HL-60

Le passage des toxines de l'injectisome jusqu'au cytoplasme des cellules nécessite l'export puis l'insertion des deux protéines PopB et PopD dans la membrane plasmique de la cellule cible. Le translocon ainsi formé assure la continuité entre l'aiguille de *P. aeruginosa* et le cytoplasme de la cellule cible, ce qui permet aux effecteurs d'atteindre leur cible. A ce stade, les indications dont nous disposons concernant la résistance des cellules HL-60 ND à l'injection d'ExoS-B1a permettaient d'exclure une absence d'induction du SST3 et reposaient seulement sur une quantité de bactéries associées aux cellules plus faible pour les cellules HL-60 ND. Nous avons donc cherché à déterminer si l'insertion des protéines PopB et PopD dans la membrane plasmique était équivalente pour les cellules HL-60 ND et pour les cellules HL-60 VitD3 infectées. Cette insertion peut être étudiée en recherchant la présence des translocateurs PopB et PopD parmi les protéines totales isolées des membranes plasmiques ou des radeaux lipidiques par immunorévélation. Nous avons notamment recherché les protéines PopB et PopD dans les membranes des cellules HL-60 infectées par les souches CHA ou PAO1F.

III.1 - Le translocon est présent dans les membranes des cellules HL-60 ND résistantes à l'injection de toxines

La recherche du translocon associé aux membranes plasmiques des cellules HL-60 a été effectuée en utilisant l'approche développée pour visualiser la présence des protéines du translocon IpaB et IpaC de *Shigella flexneri* dans les membranes des cellules épithéliales HeLa (Roehrich *et al.*, 2010). Les membranes plasmiques sont purifiées sur gradient discontinu de sucrose en absence de détergent, contrairement à l'extraction des radeaux

lipidiques. Deux fractions contenant des membranes sont collectées, une supérieure (S) et une inférieure (I) (Figure 39).

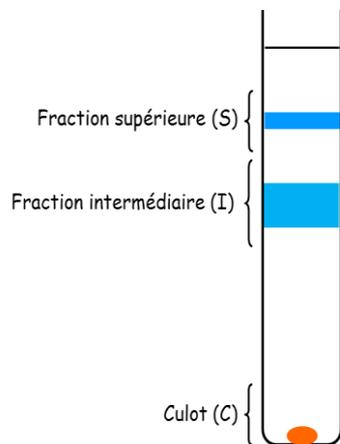


Figure 39 : Profil de migration des membranes purifiées de cellules HL-60 par flottaison sur gradient discontinu de sucrose

Les cellules HL-60 non différenciées ou différenciées sont infectées avec la souche CHA Δ S/S_{R146A}-Bla ou PAO1F Δ 3TOX/S_{R146A}-Bla à une MOI de 50. Après 3 h d'infection, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS et remises en suspension dans un tampon 3 mM imidazole pH 7,4, 250 mM de sucrose, 0,5 mM EDTA et contenant un cocktail d'anti-protéases puis lysées mécaniquement par passages successifs dans deux seringues reliées par un capillaire de 250 μ m de diamètre. Après 40 passages, le lysat est centrifugé pour éliminer les débris cellulaires et le surnageant est déposé sur un gradient discontinu de sucrose (cf Matériels et Méthodes §II.3.1) puis centrifugé. Après 16 h de centrifugation à 15 000 g et à 4 °C, deux fractions contenant des membranes sont observées (bleu sur le schéma), ainsi qu'un culot (orange sur le schéma).

Les fractions membranaires collectées sont déposées sur gel SDS-PAGE puis transférées sur une membrane. Les protéines du translocon PopB et PopD ont été ensuite recherchées par immunorévélation (Figure 40).

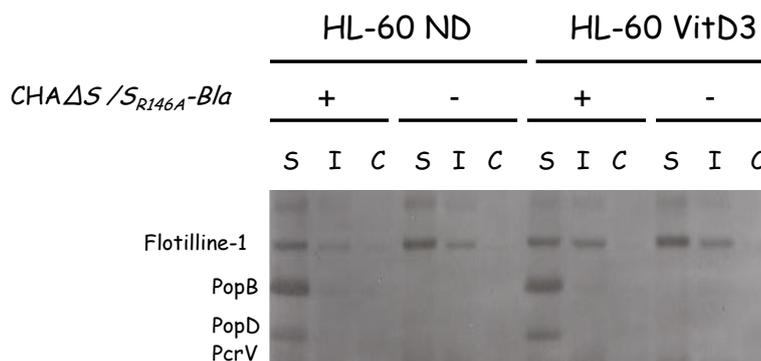


Figure 40 : Présence des protéines du translocon dans les membranes plasmiques des cellules HL-60

Les cellules HL-60 ND et HL-60 VitD3 sont traitées comme indiqué dans la Figure 39. Des quantités de protéines équivalentes (7,5 μ g) issues des différentes fractions membranaires (S, I) et du culot (C) sont séparées sur gel SDS-PAGE, puis transférées sur membrane. La présence des protéines d'intérêts est révélée avec des anticorps anti-PopB, anti-PopD, anti-flotilline-1 et anti-PcrV.

La flotilline-1 est une protéine transmembranaire ubiquiste présente dans les membranes lipidiques riches en sphingomyéline et en cholestérol constituant les radeaux lipidiques. Elle est utilisée ici pour comparer la quantité de radeaux lipidiques présente dans les fractions membranaires supérieures (S) et inférieures (I).

Pour les quatre conditions testées (HL-60 ND +/- CHA, et HL-60 VitD3 +/- CHA) la flotilline-1 est présente dans les fractions membranaires (S) et (I) mais est absente du culot (C) (*Figure 40*). Elle est cependant plus représentée dans la fraction membranaire (S) indiquant ainsi que les fractions membranaires (S) et (I) ont des compositions différentes, avec les radeaux lipidiques plutôt présents dans la fraction (S). La différenciation des cellules HL-60 ou l'infection avec CHA ne modifie pas ce profil de répartition de la flotilline. Quand les cellules HL-60 VitD3 sont infectées, les protéines PopB et PopD sont détectées dans la fraction (S), ce qui est relié à leur susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla. De façon plus surprenante, PopB et PopD sont retrouvées dans la fraction (S) issue des cellules HL-60 ND infectées par CHA. La protéine PcrV, quant à elle, n'est jamais retrouvée dans les fractions membranaires, ce qui est en accord avec les résultats précédemment obtenus au laboratoire démontrant l'absence de PcrV dans les membranes (Goure *et al.*, 2004). Cette absence de PcrV est un argument permettant d'affirmer que la présence de bactéries « contaminantes » n'est pas à l'origine des protéines PopB et PopD détectées dans les fractions membranaires.

Nous avons voulu conforter cet argument en révélant avec des anticorps dirigés contre PopB et RpoA les protéines des fractions membranaires issues de cultures de cellules HL-60 ND ou HL-60 VitD3 infectées (*Figure 41*). Un anticorps dirigé contre la sous unité de l'ARN polymérase RpoA (RNA polymerase subunit A) a été utilisé. Cet anticorps permet la détection de 2.10^5 bactéries provenant des co-cultures avec les cellules HL-60 ND (pistes 4) et HL-60 VitD3 (pistes 6). Le signal obtenu est proportionnel à la quantité de bactéries déposées. Avec l'anticorps anti-PopB, le signal obtenu suit la même variation avec une bande observée très intense pour 2.10^6 bactéries (pistes 3 et 5) et beaucoup moins intense pour 2.10^5 bactéries (pistes 4 et 6). Lorsqu'on analyse les signaux obtenus à partir des fractions membranaires, la quantité de RpoA visualisée est très faible et équivalente à celle observée pour un dépôt de 2.10^5 bactéries pour les HL-60 ND (piste 1) alors qu'aucun signal n'est observé pour les HL-60 VitD3 (piste 2). Par contre le signal obtenu avec l'anticorps anti-PopB dans ces mêmes fractions membranaires de cellules HL-60 ND (piste 1) et de cellules HL-60 VitD3 (piste 2) est très supérieur à celui observé pour 2.10^5 bactéries (piste 4 et 6), il est même supérieur à celui observé pour un dépôt de 2.10^6 bactéries (piste 3 et 4).

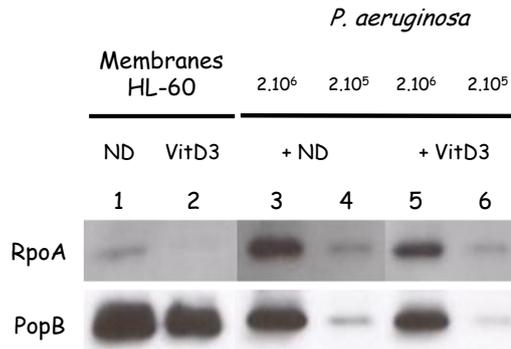


Figure 41: La présence du translocon dans les membranes des cellules HL-60 n'est pas due à des bactéries contaminantes

Les cellules HL-60 ND et HL-60 VitD3 sont infectées par la souche *CHAΔS/S_{R146A}-Bla* à une MOI de 50. Après 3 h d'infection, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS, lysées, centrifugées et le surnageant est déposé sur gradient discontinu de sucrose. 2.10⁶ et 2.10⁵ bactéries sont quantifiées par mesure de la DO_{600nm} et prélevées à partir des cultures de cellules HL-60 ND ou HL-60 VitD3 infectées. Les protéines issues des membranes purifiées et celles du lysat de bactéries sont séparées sur gel SDS-PAGE, transférées sur membrane puis révélées avec des anticorps anti-PopB et anti-RpoA.

Ces résultats confirment que la protéine PopB du translocon provient exclusivement de l'insertion du translocon par le SST3 de *P. aeruginosa* dans les membranes des cellules HL-60 ND ou HL-60 VitD3. En conclusion, nous pouvons donc affirmer que la résistance à l'injection d'ExoS-Bla des cellules HL-60 ND n'est pas due à l'absence d'insertion du translocon dans les membranes plasmiques. Lorsque *P. aeruginosa* est mis au contact des cellules HL-60 ND, il a donc la capacité d'interagir avec ces cellules et d'insérer les protéines PopB et PopD dans la membrane. Par contre, malgré l'insertion de ces deux protéines, *P. aeruginosa* n'a pas la capacité d'injecter ExoS-Bla dans les cellules HL-60 ND.

Des expériences similaires ont été effectuées en comparant une infection des cellules HL-60 VitD3 avec la souche *CHAΔS/S_{R146A}-Bla* et avec la souche *PAO1FΔ3TOX/S_{R146A}-Bla* (Figure 42). PopB est observée en quantité significativement moins importante après une infection par la souche PAO1F qu'après une infection par la souche CHA. PopD, partiellement protéolysé, est retrouvée uniquement dans les membranes des cellules infectées par la souche CHA.

Ces résultats indiquent clairement que la souche PAO1F insère moins de translocon dans les membranes des cellules HL-60 que la souche CHA. Or les deux souches injectent avec la même efficacité ExoS-Bla dans les cellules HL-60 VitD3. La quantité de translocon ne reflète

donc pas directement la capacité d'une souche de *P. aeruginosa* à injecter des exotoxines dans les cellules cibles.

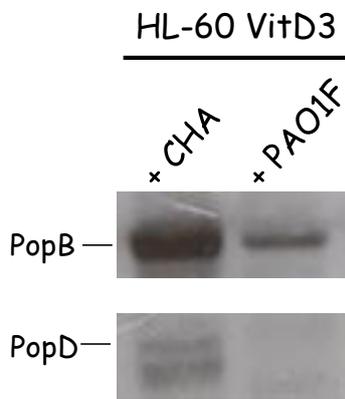


Figure 42 : La quantité de translocon inséré varie suivant la souche utilisée

Les cellules HL-60 VitD3 sont infectées par la souche CHA Δ S/S_{R146A}-Bla ou PAO1F Δ 3TOX/S_{R146A}-Bla à une MOI de 50. Après 3 h d'infection, les cellules sont lavées trois fois en PBS, lysées, centrifugées et le surnageant est déposé sur gradient discontinu de sucrose. Les protéines des fractions membranaires supérieures sont collectées, séparées sur gel SDS-PAGE, transférées puis révélées avec des anticorps anti-PopB et anti-PopD.

Bridge et ses collaborateurs n'ont en revanche pas observé le translocon dans les membranes des cellules HL-60 ND infectées par la souche P388 (Bridge *et al.*, 2010). Les auteurs admettent donc que la cause de la résistance des cellules HL-60 ND à l'injection de toxines est l'incapacité du translocon à s'insérer dans les membranes plasmiques.

Mais comme nous l'avons observé en comparant les deux souches CHA et PAO1F, la quantité de translocon inséré varie selon la souche et peut expliquer cette différence avec les résultats obtenus avec une autre souche, la souche P388, utilisée par Bridge.

III.2 - Présence du translocon dans les radeaux lipidiques des cellules HL-60

Nous avons pu observer que la flotilline-1, présente spécifiquement dans les radeaux lipidiques, était essentiellement retrouvée dans la fraction supérieure des gradients de sucrose où PopB et PopD sont observées (Figure 40). Le translocon du SST3 d'autres bactéries pathogènes telles que *Shigella* ou *Salmonella* colocalise au niveau des radeaux lipidiques (RL) (Hayward *et al.*, 2005; Lafont *et al.*, 2002). *In vitro*, les protéines PopB et PopD purifiées peuvent s'oligomériser, s'insérer et lyser des liposomes chargés en phosphatidylsérine et en cholestérol (Faudry *et al.*, 2006; Schoehn *et al.*, 2003). L'implication des RL lors d'une infection à *P. aeruginosa* a été démontrée dans les cellules épithéliales pulmonaires (Grassme *et al.*, 2003). Ces résultats en faveur d'un rôle particulier

des RL nous ont amené à réaliser des expériences de déplétion en cholestérol des membranes des cellules HL-60.

La perturbation de l'intégrité des RL par la méthyl- β -cyclodextrine (Me β CD) est un moyen efficace pour évaluer leur rôle dans les mécanismes d'injection de toxines. La Me β CD chélate le cholestérol des membranes lipidiques des cellules eucaryotes et induit une baisse de l'intégrité et de la fonctionnalité des RL (Simons and Toomre, 2000).

Le traitement des cellules à la Me β CD dans le milieu RPMI contenant 10 % de SVF altère fortement la viabilité cellulaire. Pour éviter cette importante mortalité, les cellules ont été cultivées pendant une semaine dans un milieu RPMI contenant 1 % de Nutridoma. Le Nutridoma contenant peu de cholestérol permet de diminuer progressivement la concentration en cholestérol dans les membranes plasmiques avant de réaliser le traitement à la Me β CD. Les cellules sont ensuite traitées de deux façons différentes avec la Me β CD puis infectées avec la souche CHA Δ S/S_{R146A}-Bla :

- 2 h de traitement en présence de 1 mM, 2 mM ou 3 mM de Me β CD suivi d'une infection de 3 h en présence de Me β CD.
- 1 h de traitement en présence de 10 mM ou 20 mM de Me β CD, lavage des cellules suivi d'une infection de 3 h en absence de Me β CD

En absence de traitement, la totalité des cellules est intoxiquée par ExoS-Bla. Avec les deux types de traitements à la Me β CD, on observe une diminution dose dépendante du nombre de cellules HL-60 injectées, passant de 100 % de cellules injectées à moins de 30 % en présence de 3 mM de Me β CD (*Figure 43*). Un traitement de 1 h en présence de 10 mM de Me β CD conduit à 70 % de cellules injectées, et un traitement avec 20 mM de Me β CD à moins de 50 % de cellules intoxiquées. L'isoforme α -cyclodextrine (α -CD), qui n'a pas la capacité de chélater le cholestérol, ne bloque pas l'injection. Ces résultats prouvent donc bien que la présence du cholestérol et l'intégrité des RL sont essentielles pour permettre l'injection de toxines par le SST3 de *P. aeruginosa*.

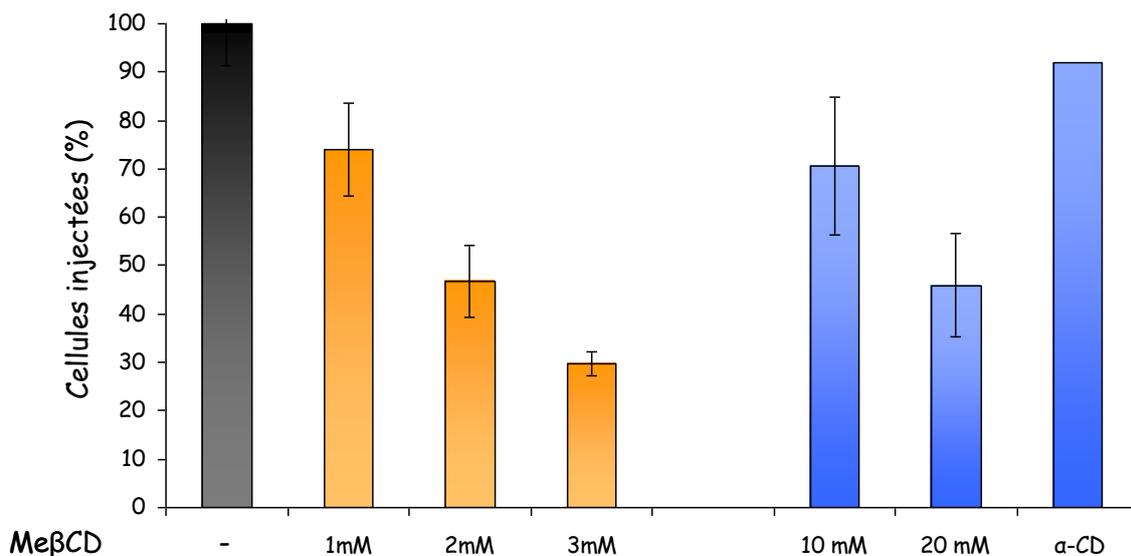


Figure 43 : La déplétion en cholestérol des cellules HL-60 diminue la susceptibilité à l'injection des toxines

Les cellules HL-60 VitD3 cultivées en RPMI + 1 % Nutridoma sont :

- Traitées pendant 2 h en présence de 1 mM, 2 mM ou 3 mM de MeβCD, puis infectées par la souche CHAΔS/S_{R146A}-Bla à une MOI de 10 en présence de MeβCD (Orange).

- Traitées pendant 1 h en présence de 10 mM ou 20 mM de MeβCD ou de 30 mM d'α-cyclodextrine puis sont lavées avec du milieu RPMI 1 % Nutridoma et finalement infectées par la souche CHAΔS/S_{R146A}-Bla à une MOI de 10 (Bleu).

Après 3 h d'infection, les cellules sont incubées en présence de CCF2 pendant 30 min et analysées par cytométrie en flux.

Nous ne savons pas en revanche si le traitement des cellules à la MeβCD bloque l'insertion du translocon dans les membranes plasmiques. La détection des protéines PopB et PopD dans des membranes de cellules purifiées sur gradient de sucrose permettrait de répondre à cette question.

La MeβCD affectant la susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla, l'étape suivante a consisté à rechercher la présence des protéines du translocon PopB et PopD de *P. aeruginosa* dans les radeaux lipidiques. La particularité des RL est d'être résistants à la solubilisation par certains détergents non ionique comme le Triton X-100 à 4 °C. Pour extraire les RL des cellules HL-60 infectées par la souche CHAΔS/S_{R146A}-Bla, les cellules sont lysées en présence de 1 % de Triton X-100 à 4 °C. Le lysat est ensuite centrifugé puis déposé sur un gradient discontinu de sucrose. Le lendemain, le gradient est divisé en plusieurs fractions de volume

identique et une quantité équivalente de protéines issue de chaque fraction est déposée sur un gel SDS-PAGE, transférée sur une membrane puis analysée par immunorévélation (*Figure 44*).

PopB est observée au niveau des fractions contenant la flotilline, ce qui confirme la présence du translocon dans les RL des cellules HL-60 ND et HL-60 VitD3. La présence de PopD n'a en revanche, pas pu être mise en évidence. De façon intéressante, PopB est visualisé avec une masse moléculaire apparente de moins de 36 kDa dans les RL des cellules HL-60 ND, alors que sa masse moléculaire théorique est de 44 kDa. Ceci suggère que PopB a subi une protéolyse lors de la préparation des RL.

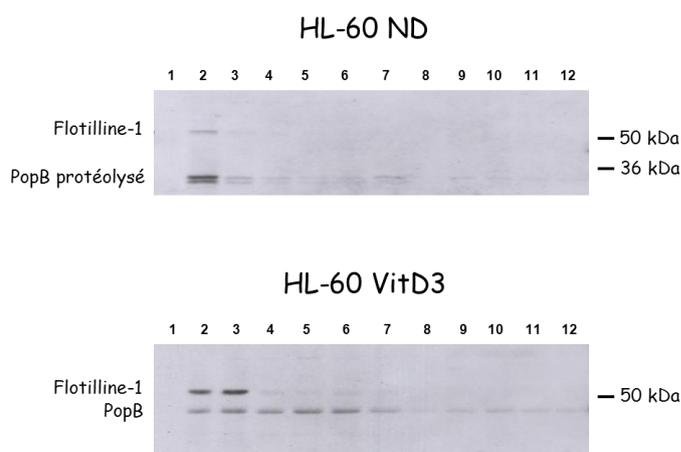


Figure 44 : Présence de PopB dans les radeaux lipidiques des cellules HL-60

Les cellules HL-60 ND et HL-60 VitD3 sont infectées par la souche CHAΔS/S_{R146A}-Bla à une MOI de 50. Après 3 h d'infection, les cellules sont lavées trois fois en PBS, lysées en présence d'un tampon MBS contenant 1 % de Triton X-100 en présence d'inhibiteurs de protéases (Protease Inhibitor Cocktail ; Sigma) à 4 °C. Le lysat est centrifugé à 3 200 g pendant 10 min et le surnageant est déposé sur gradient discontinu de sucrose puis centrifugé une nuit à 4 °C (cf Matériels et Méthodes §II.3.2). Le gradient est ensuite collecté par fractions de 1 ml. Les protéines sont dosées et une quantité équivalente de protéines de chaque fraction est déposée sur gel SDS-PAGE, transférée puis révélée avec des anticorps dirigés contre PopB, PopD et la flotilline-1.

D'après ces résultats, il est probable que PopB ne soit pas inséré correctement ou que sa conformation soit différente dans les membranes des cellules HL-60 ND. Des régions de la protéine seraient donc plus facilement accessibles aux protéases. Tout comme PopB, il est donc possible que PopD soit également plus sensibles aux protéases lors de l'extraction des RL, ce qui suggère une insertion différente et/ou inadéquate dans les membranes des cellules HL-60 ND. L'injection d'ExoS-Bla observée seulement dans les cellules HL-60 VitD3 et pas

dans les cellules HL-60 ND ne semble donc pas due à l'absence d'insertion des protéines PopB et PopD du pore de translocation, présentes à la fois dans les deux types cellulaires. En revanche, la susceptibilité différentielle à l'action des protéases des protéines PopB et PopD observée dans l'analyse des RL suggère que le translocon n'est pas inséré avec la même conformation dans les HL-60 ND et dans les HL-60 VitD3.

III.3 - Rôle des céramides des radeaux lipidiques dans l'injection de toxines

L'enrichissement des radeaux lipidiques en céramides est une étape importante pour l'infection et l'internalisation de *P. aeruginosa* par les cellules humaines. Lors d'un contact avec des cellules épithéliales pulmonaires, *P. aeruginosa* induit l'activation de la sphingomyélinase acide (ASM). L'ASM activée hydrolyse la sphingomyéline en céramide au niveau des RL des cellules cibles, conduisant alors à la formation de plateformes enrichies en céramide. Cette étape est nécessaire pour permettre le regroupement des récepteurs de surface induisant l'internalisation des bactéries, la mort des cellules par apoptose et la régulation de la sécrétion de cytokines inflammatoires (Grassme *et al.*, 2003).

Dans le cas des macrophages alvéolaires, l'ASM est activée lors d'un contact avec *P. aeruginosa* et une augmentation de la concentration en céramides est observée. Cette première étape est nécessaire pour permettre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) médiée par l'activation de la NADPH oxydase, induisant l'apoptose des macrophages (Zhang *et al.*, 2008). Il est possible que cet environnement lipidique modifié intervienne dans la sensibilité des cellules à l'injection de toxines par *P. aeruginosa*, en facilitant l'insertion du translocon dans la membrane des cellules cibles. La différence de sensibilité des cellules HL-60 ND et HL-60 VitD3 à l'injection des toxines pourrait s'expliquer par une composition différente de la membrane en céramides.

L'inhibition de l'activité de la sphingomyélinase acide (ASM) par des agents pharmacologiques comme l'imipramine empêche l'enrichissement en céramides des membranes plasmiques, nécessaires à l'infection par le *Rhinovirus* (Grassme *et al.*, 2005). Les cellules HL-60 ND ou différenciées en VitD3 ont été mises en présence d'imipramine avant l'infection afin de bloquer l'activité de l'ASM et donc l'enrichissement des radeaux lipidiques en céramides (*Figure 45*). Moins de 20 % de cellules HL-60 ND sont injectées en présence ou non d'imipramine. Ces cellules HL-60 ND restent donc résistantes à l'injection d'ExoS-Bla. Dans le cas des cellules différenciées en VitD3, aucune diminution significative du nombre de

cellules injectées n'est observée en présence d'imipramine. Ces résultats indiquent que l'enrichissement en céramide des radeaux lipidiques n'est pas nécessaire pour permettre l'injection de toxines dans les cellules HL-60 VitD3.

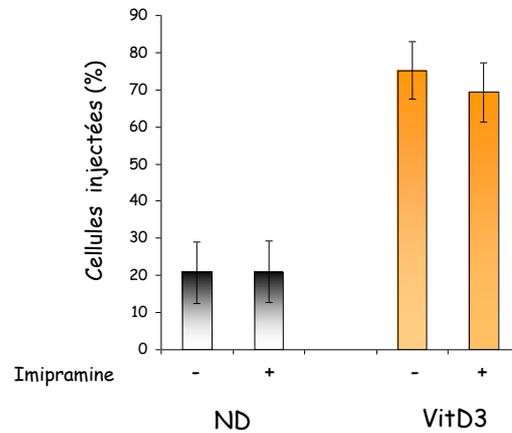


Figure 45 : Les céramides ne sont pas nécessaires à l'injection d'ExoS-Bla par le SST3 de *P. aeruginosa* dans les cellules HL-60

Les cellules HL-60 ND (noire) et HL-60 VitD3 (orange) sont traitées en présence (+) ou en absence (-) de 30 μ M d'imipramine pendant 30 min puis infectées par la souche CHA Δ S/S-Bla à une MOI de 50. Après 3 h d'infection, les cellules sont incubées en présence de CCF2 pendant 30 min et analysées par cytométrie en flux.

III.4 - Discussion

La différence de susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla entre les HL-60 ND et les HL-60 VitD3 n'est probablement pas due à l'activation du SST3 qui est équivalente pour les deux types de cellules. Par contre à ce stade du travail, la capacité de liaison des bactéries aux cellules montrait une différence avec une liaison plus importante de *P. aeruginosa* aux cellules HL-60 VitD3. Mais après avoir analysé les membranes plasmiques, nous avons montré la présence des protéines PopB et PopD du translocon en quantité équivalente dans les cellules HL-60 ND et HL-60 VitD3. Nous avons de plus vérifié que la présence d'une très faible quantité de bactéries non éliminées par les différents lavages lors de la préparation des membranes ne pouvait expliquer la présence des protéines PopB et PopD et que ces deux protéines étaient bien issues du translocon inséré dans la membrane plasmique des cellules. La résistance des cellules HL-60 ND à l'injection de toxines ne provient donc pas de l'incapacité de *P. aeruginosa* à insérer le translocon dans les membranes de ces cellules. En revanche, le fait que le translocon soit inséré dans les membranes des cellules HL-60 ND et

des HL-60 VitD3 conduit à exclure la participation d'un récepteur ou d'une molécule spécifiquement exprimé au stade HL-60 différencié pour cette étape d'insertion.

Il apparait de façon nette que la quantité de translocon (PopB et PopD) inséré dans la membrane varie selon la souche de *P. aeruginosa* utilisée. Nous avons notamment constaté que la souche CHA insérait une quantité de protéines PopB et PopD beaucoup plus importante que la souche PAO1F et ceci pour des conditions d'infection rigoureusement identiques. Or, ces deux souches se fixant avec la même efficacité aux cellules HL-60 VitD3 (entre 20 et 30 % de cellules HL-60 VitD3 associées à *P. aeruginosa*), il est possible que le nombre d'aiguilles synthétisées soit significativement différent ou que le nombre d'aiguilles qui s'insèrent dans la membrane de la cellule cible varie indépendamment du nombre total d'aiguilles synthétisées par la bactérie. De plus, l'efficacité de translocation de la toxine ExoS-Bla est équivalente pour ces deux souches (CHA et PAO1F) malgré une quantité de translocon inséré dans les membranes très différente. Néanmoins en raison de la très haute sensibilité de détection du signal avec le système β -lactamase/CCF2, nous ne sommes absolument pas certains que ce signal ne soit pas saturé et que la quantité d'ExoS-Bla injecté soit réellement équivalente pour les deux souches.

De ces résultats il découle que la présence du translocon n'est pas suffisante pour permettre l'injection d'ExoS-Bla dans les cellules HL-60 ND, or ces cellules possèdent la même capacité que les cellules HL-60 VitD3 à induire l'expression du SST3 de *P. aeruginosa*, et cette induction requiert elle-même l'injection du régulateur ExsE dans la cellule infectée (Urbanowski *et al.*, 2007). Comment envisager que le translocon permette le passage d'ExsE et pas celui d'ExoS ? Ou existe-t-il deux étapes totalement indépendantes, une pour le passage d'ExsE et l'autre pour le passage d'ExoS ? Il faut toutefois tenir compte de l'existence d'une voie indépendante de la sécrétion d'ExsE permettant l'activation du SST3 et qui serait activée par des facteurs présents dans les cellules cibles (Dasgupta *et al.*, 2006). La recherche de la présence d'ExsE dans les cellules HL-60 ND constituerait une approche intéressante pour répondre à ces questions.

Bridge n'a pas observé de translocon dans les membranes des cellules HL-60 ND. Or, la différence de quantité de translocon inséré dans les membranes à partir des deux souches testées (CHA et PAO1F) met en évidence la grande variabilité de ce paramètre. Ceci explique peut-être l'origine de cette différence avec la souche P388 pour laquelle Bridge et ses collaborateurs n'ont pas observé d'insertion de translocon dans les membranes (Bridge *et al.*, 2010).

Nous avons pu montrer l'importance des radeaux lipidiques dans l'injection d'ExoS-Bla dans les cellules HL-60 VitD3. Par contre, lorsque nous comparons les résultats de l'analyse des membranes totales et des radeaux lipidiques, deux différences apparaissent. Alors que PopB et PopD sont visualisés dans les membranes des cellules HL-60 ND et HL-60 VitD3, seul PopB est détecté dans les radeaux lipidiques issus de ces mêmes cellules. De plus, PopB est protéolysé dans les RL issus des cellules HL-60 ND. Les deux protocoles sont réalisés à 4 °C et sont basés sur la présence continue d'inhibiteurs de protéases mais la différence essentielle entre ces deux protocoles réside dans la manière dont les membranes cellulaires sont rompues. L'utilisation de Triton X-100 1 % pour la préparation des RL permet peut-être un relargage plus important des protéases intracellulaires ou alors une meilleure accessibilité de PopB et de PopD aux protéases. Néanmoins, le fait que l'accessibilité aux protéases de PopB et de PopD soit différente entre les cellules HL-60 ND et les HL-60 VitD3 suggère que l'insertion de PopB et de PopD dans les membranes plasmiques des cellules HL-60 ND est différente de celle des cellules HL-60 VitD3. La résistance des cellules HL-60 ND à l'injection serait due à une insertion inadéquate du translocon, rendant le pore non fonctionnel pour permettre le passage des exotoxines à l'intérieur des cellules HL-60 ND.

Une autre façon d'étudier l'insertion du pore de translocation est de mesurer ses effets sur l'intégrité de la membrane plasmique en analysant le relargage de LDH (Lactate DésHydrogénase). C'est ainsi que l'effet de l'insertion du translocon sur l'intégrité des membranes et la lyse des cellules par le SST3 de *Y. pseudotuberculosis* a été mis en évidence (Viboud and Bliska, 2002). Cette approche n'a malheureusement pas pu être utilisée avec les cellules HL-60 ND et différenciées qui se sont révélées totalement réfractaires au relargage de LDH contrairement aux neutrophiles humains et aux lignées de macrophages murins qui sont hautement sensibles à l'insertion du translocon dans les membranes en présence de la souche CHA (Dacheux *et al.*, 1999; Dacheux *et al.*, 2000). Suite à l'insertion d'un pore dans les membranes des cellules eucaryotes, un mécanisme de réparation de la membrane peut se mettre en place et aboutir à la survie de la cellule (Gurcel *et al.*, 2006). Il est donc possible que la capacité de réparation de la membrane soit très importante dans les cellules HL-60, ce qui expliquerait l'absence de relargage de LDH suite à l'infection par *P. aeruginosa*.

Nous avons également montré que la déplétion en cholestérol des cellules HL-60 VitD3 par la Me β CD inhibait l'injection d'ExoS-Bla par le SST3 de *P. aeruginosa*, ce qui démontre l'implication des RL dans l'injection des effecteurs. Par contre il ne semble pas que les céramides soient impliqués dans ce phénomène. La détection des protéines du translocon dans les RL des cellules HL-60 VitD3 incubées par la Me β CD n'a toutefois pas été entreprise.

Le fait que le traitement par la Me β CD empêche l'insertion du translocon du SST3 de *Shigella flexneri* dans les membranes de cellules infectées (Lafont *et al.*, 2002) suggère toutefois qu'il est probable que la Me β CD empêche également l'insertion de PopB et PopD dans les membranes des cellules HL-60 VitD3. La présence des RL est donc très importante pour l'insertion d'un pore fonctionnel. Ces résultats sont en accord avec une insertion préférentielle du translocon de *P. aeruginosa* dans des liposomes contenant du cholestérol (Schoehn *et al.*, 2003) et avec l'inhibition de l'invasion et de l'injection des toxines dans les cellules épithéliales après traitement par la méthyl- β -cyclodextrine (Me β CD) (Bridge *et al.*, 2010; Grassme *et al.*, 2003). De plus l'insertion du translocon d'autres bactéries pathogènes comme *Shigella flexneri* et *Salmonella thyphimurim* est fortement dépendante du cholestérol contenu dans les radeaux lipidiques (Hayward *et al.*, 2005; Lafont *et al.*, 2002; van der Goot *et al.*, 2004).

Les membranes des cellules HL-60 ND contiennent également des RL dans lesquelles PopB s'insère mais dans une conformation probablement différente de celle observée pour les HL-60 VitD3. La présence des RL suffit certainement pour permettre l'insertion du translocon dans les membranes, mais un autre ou d'autres facteurs sont nécessaires pour l'acquisition d'une conformation compatible avec la fonctionnalité de ce translocon en regard de l'injection des effecteurs.

Dans le cas de *Shigella flexneri*, IpaB joue le rôle de senseur qui, au contact des cellules cibles, relayerait un signal à IpaD ce qui conduirait à la sécrétion du second translocateur IpaC qui s'assemblerait avec IpaB pour former le pore de translocation. IpaB régulerait ainsi la formation et la conformation du pore dans les membranes plasmiques des cellules cibles pour permettre l'injection des toxines (Blocker *et al.*, 2008; Roehrich *et al.*, 2010; Veenendaal *et al.*, 2007). IpaB serait probablement reconnue par des molécules des cellules cibles pour réguler la fonctionnalité/conformation du translocon dans les membranes. L'incapacité des cellules HL-60 ND à détecter le translocon empêcherait l'insertion/conformation adéquate du translocon dans les membranes nécessaires à sa fonctionnalité, ce qui expliquerait cette sensibilité accrue aux protéases de PopB dans les radeaux lipidiques des cellules HL-60 ND. Blocker émet l'hypothèse qu'en absence de stimulus, l'injectisome de *Shigella flexneri* serait dans une conformation « fermée » empêchant la sécrétion des effecteurs. La détection d'un signal par les translocateurs situés au sommet de l'aiguille lors du contact avec les cellules cibles induirait des changements de conformations qui se répercuteraient au niveau de l'aiguille jusqu'au corps basal, induisant un état « ouvert » de l'injectisome (Blocker *et al.*, 2008). Il est donc possible que le translocon de

P. aeruginosa inséré dans les membranes des cellules HL-60 ND soit dans une conformation de type « fermée » qui ne lui permette pas d'injecter les exotoxines. Pour permettre le passage dans une conformation dite « ouverte » du pore, des voies de signalisation impliquant la cellule cible sont probablement requises

IV - L'injection d'ExoS-Bla par le SST3 de *P. aeruginosa* est régulée par un mécanisme dépendant de la cellule cible

Une autre partie de mon travail a consisté à étudier la participation de signaux délivrés par la cellule cible, signaux qui seraient fonctionnels seulement dans les HL-60 VitD3 mais pas dans les cellules HL-60 ND. Ces signaux permettraient de rendre le pore de translocation fonctionnel pour induire l'injection d'ExoS-Bla dans le cytoplasme des cellules cibles. En effet, comme cela a été montré le SST3 de *Y. pseudotuberculosis*, plusieurs voies de signalisation de la cellule cible semblent jouer un rôle dans l'acquisition de la fonctionnalité du translocon (Mejia *et al.*, 2008).

La suite du travail a donc consisté à tenter de bloquer l'injection d'ExoS-Bla dans les HL-60 VitD3 en utilisant des inhibiteurs ciblant certaines voies de signalisation cellulaire.

IV.1 - La dynamique de l'actine

Il a été montré que le traitement de cellules épithéliales par des inhibiteurs de la polymérisation de l'actine bloquait la cytotoxicité induite par le translocon et l'injection de toxines par le SST3 de *Yersinia pseudotuberculosis* (Mejia *et al.*, 2008). Ayant démontré dans le chapitre précédent le rôle des RL dans l'insertion du translocon de *P. aeruginosa*, nous avons étudié le rôle du cytosquelette d'actine (*Figure 46*).

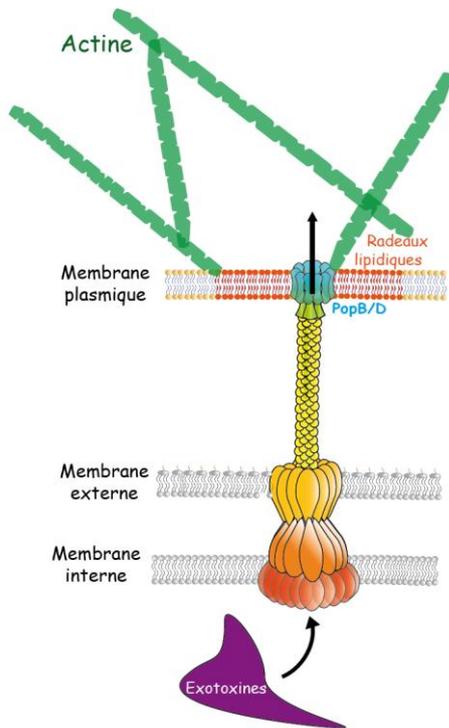


Figure 46 : Rôle de l'actine dans l'injection de toxines par *P. aeruginosa*

Nous avons évalué l'impact d'un traitement des cellules HL-60 VitD3 par la cytochalasine D (CytoD) (cytochalasine D (CytoD) (

Figure 47A) ou par la latrunculine B (LtrB) (

*Figure 47B) sur l'injection d'ExoS-Bla par le SST3 de *P.aeruginosa*.*

Ces deux molécules sont des inhibiteurs de la polymérisation du cytosquelette d'actine : la CytoD se lie à l'extrémité barbée des filaments d'actine alors que la latrunculine B séquestre les monomères d'actine. Ces deux inhibiteurs bloquent de façon dose dépendante l'injection d'ExoS-Bla dans les cellules HL-60 VitD3. Dès 0,4 μM de CytoD et 1 μM de LtrB, le nombre de cellules injectées est divisé par 4 et le maximum d'inhibition est observé. Des concentrations supérieures en CytoD ou en LtrB ne diminuent pas plus l'injection. La dynamique de polymérisation de l'actine dans les cellules HL-60 différenciées joue donc un rôle important dans l'acquisition de la fonctionnalité du translocon et dans l'injection de toxines.

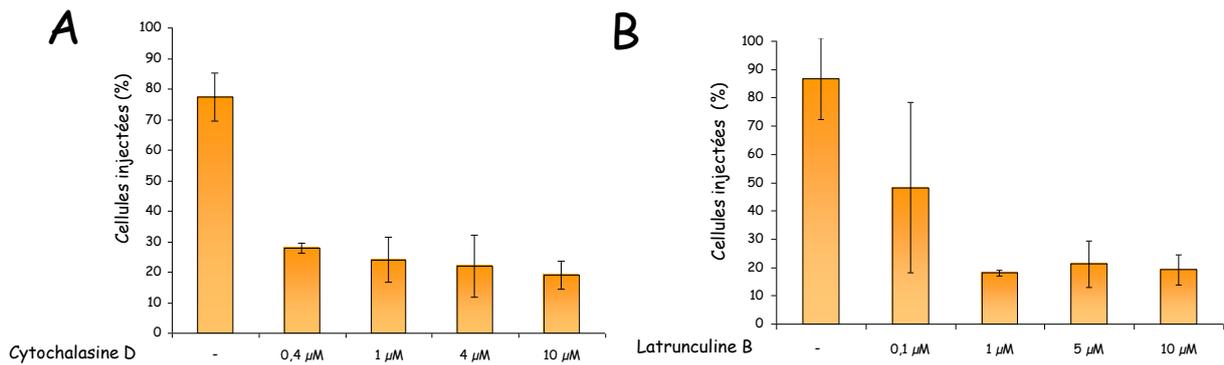


Figure 47 : La dynamique de formation du réseau d'actine est nécessaire à l'injection d'ExoS-Bla

Les cellules HL-60 VitD3 sont traitées en présence de différentes concentrations de cytochalasine D (A) ou de latrunculine B (B) pendant 30 min puis infectées par la souche PAO1F Δ 3TOX/S_{R146A}-Bla à une MOI de 10 en présence des inhibiteurs. Après 3 h d'infection, les cellules sont incubées en présence de CCF2 pendant 30 min et analysées par cytométrie en flux.

IV.2 - Les intégrines et les adhérences focales

Le regroupement des RL est indispensable pour l'oligomérisation de certains récepteurs nécessaire à leur activation. Cette étape est dépendante du cytosquelette d'actine qui, de part sa dynamique, permet le déplacement des RL à la surface de la membrane. La liaison de l'adhésine YadA de *Y. pseudotuberculosis* aux intégrines comportant la chaîne β_1 au niveau des radeaux lipidiques est primordiale pour induire l'insertion efficace du translocon et l'injection des effecteurs dans les cellules épithéliales (Mejia *et al.*, 2008). Bien qu'aucun homologue de YadA n'ait été identifiée, l'interaction de *P. aeruginosa* avec des intégrines de type β_1 des cellules épithéliales A549 a été démontrée (Roger *et al.*, 1999). Nous avons donc testé le rôle d'anticorps anti-intégrine bloquant les interactions cellulaires sur l'injection d'ExoS-Bla.

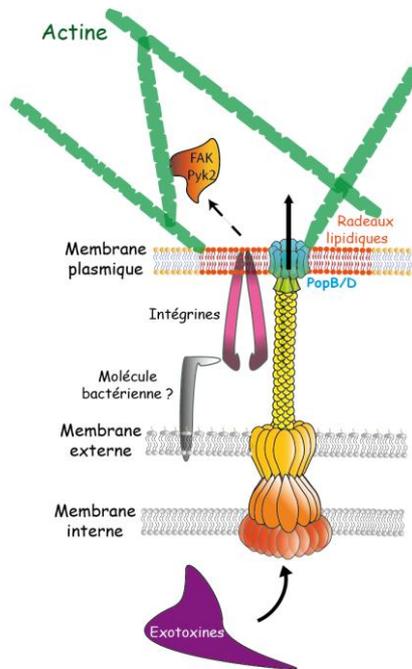


Figure 48 : Rôle des intégrines et des FAKs dans l'injection de toxines

Des cellules HL-60 VitD3 ont été mises en présence d'anticorps monoclonaux reconnaissant la chaîne β_1 ou β_2 des intégrines puis infectées par la souche PAO1F Δ 3TOX/S_{R146A}-Bla (Figure 49). Cependant, aucune diminution du nombre de cellules injectées, traitées ou non par des anticorps anti-intégrines, n'a été observée dans ces conditions.

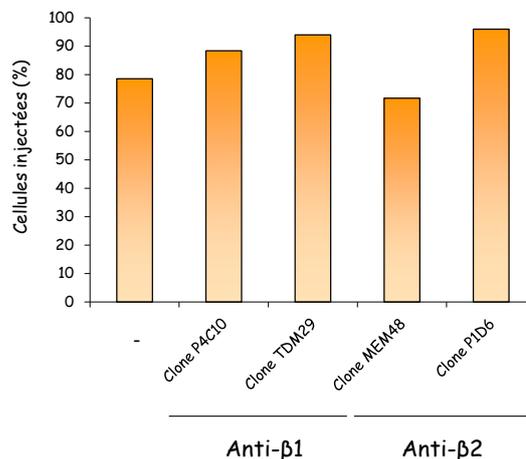


Figure 49 : Les intégrines ne sont pas nécessaires pour induire l'injection d'ExoS-Bla

Les cellules HL-60 VitD3 sont incubées en présence d'anticorps monoclonaux dirigés contre la chaîne β_1 (clones P4C10 à 20 $\mu\text{g/mL}$ et TDM29 à 40 $\mu\text{g/mL}$) ou β_2 (clones MEM48 à 60 $\mu\text{g/mL}$ et PID6 à 40 $\mu\text{g/mL}$) des intégrines pendant 30 min puis infectées par la souche PAO1F Δ 3TOX/S_{R146A}-Bla à une MOI de 10. Après 3 h d'infection, les cellules sont incubées en présence de CCF2 pendant 30 min et analysées par cytométrie en flux.

Les deux isoformes de FAKs (Focal Adhesion Kinase) : FAK et Pyk2 (Proline-rich tyrosine kinase 2) sont des tyrosines kinases cytoplasmiques participant à la transmission du signal relayé par les intégrines. L'activation de l'isoforme Pyk2 dans les cellules HL-60 différenciées en neutrophiles est fortement dépendante de la liaison aux intégrines β_2 au niveau des complexes focaux (Wang *et al.*, 2010). *Yersinia* exploite la liaison YadA/intégrines β_1 aux niveaux des adhérences focales, induisant l'activation de FAK et de Pyk2 pour permettre son internalisation (Uliczka *et al.*, 2009). Bien que les intégrines ne semblent pas être nécessaires pour induire l'injection des toxines par *P. aeruginosa*, nous avons cherché à savoir si la fonctionnalité du translocon du SST3 de *P. aeruginosa* était dépendante de l'activation des FAKs (Figure 50).

Le traitement de cellules HL-60 en présence d'un inhibiteur des FAKs bloque de façon dose dépendante l'injection d'ExoS-Bla dans les cellules HL-60 VitD3 (Figure 50A) avec un maximum observé à 10 μ M, pour lequel moins de 10 % des cellules sont injectées. Nous avons pu détecter Pyk2 exclusivement dans les HL-60 VitD3 mais pas dans les HL-60 ND (Figure 50B), par contre nous n'avons jamais détecté FAK que les HL-60 soient différenciées ou non comme cela a été décrit (Miura *et al.*, 2000).

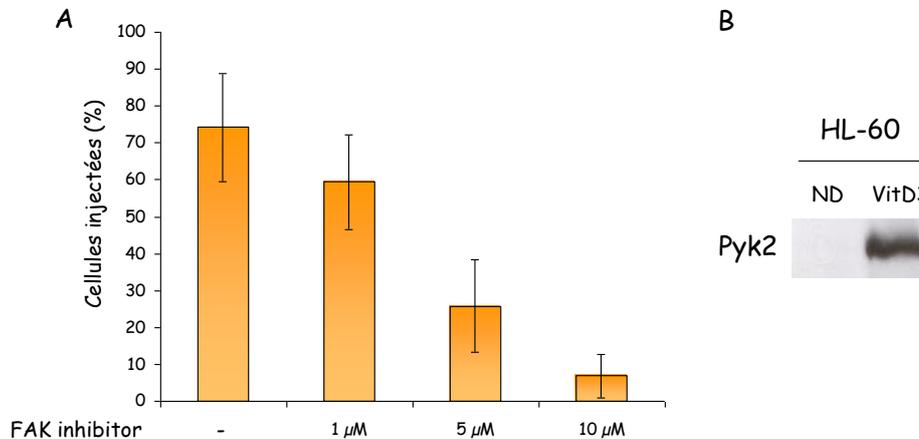


Figure 50 : Inhibition et expression de Pyk2 dans les cellules HL-60 VitD3

A : Les cellules HL-60 VitD3 sont traitées en présence de différentes concentrations de FAK inhibitor pendant 2 h puis infectées par la souche PAO1 Δ 3TOX/S_{R146A}-Bla à une MOI de 10. Après 3 h d'infection, les cellules sont incubées en présence de CCF2 pendant 30 min et analysées par cytométrie en flux.

B : Les lysats de cellules HL-60 ND ou de cellules HL-60 VitD3 sont déposés sur un gel SDS-PAGE, puis transférés et analysés par immunorévélation en présence d'anticorps dirigés contre la protéine Pyk2.

Ces résultats indiquent donc la nécessité d'un signal d'activation impliquant Pyk2 pour rendre la translocation fonctionnelle dans les cellules HL-60 VitD3. L'absence de Pyk2 dans les HL-60 ND pourrait donc expliquer l'absence de fonctionnalité du translocon dans ces cellules. L'activation de Pyk2 lors d'une infection à *P. aeruginosa* sera prochainement étudiée à l'aide d'anticorps spécifiques de la tyrosine activatrice de Pyk2 (Y-402).

IV.3 - Les petites protéines G

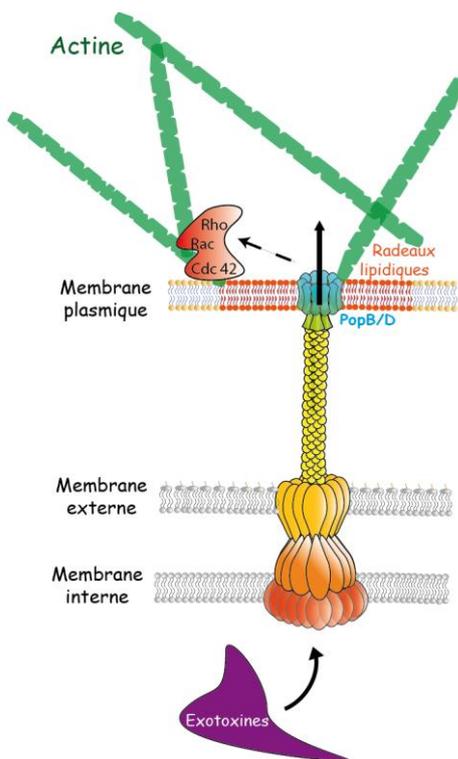


Figure 51 : Rôle des GTPases Rho, Rac et cdc42 dans l'injection des exotoxines par *P. aeruginosa*

L'activation de petites protéines G induit également des changements dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Le blocage des petites protéines G de type Rho permet de diminuer le relargage de LDH induit par l'insertion du pore de translocation et l'injection des exotoxines dans des cellules épithéliales infectées par *Y. pseudotuberculosis* (Mejia *et al.*, 2008). Ces observations ont permis de montrer que *Yersinia* modulait l'activité de Rho pour permettre l'insertion efficace de pores de translocation et permet l'injection des toxines.

Nous avons évalué l'implication des petites protéines G, dans le cas du SST3 de *P. aeruginosa*, sur l'injection d'ExoS-Bla dans les cellules HL-60 VitD3 (Figure 51). Le blocage des petites protéines G Rho A, B et C par la toxine TAT-C3 ou encore de Rho, Rac et

de Cdc42 par la toxine B n'a pas diminué de manière significative l'injection d'ExoS-Bla par la souche PAO1FΔ3TOX/S_{R146A}-Bla dans les cellules HL-60 VitD3 (Figure 52). Contrairement à ce qui est décrit chez *Yersinia*, les petites protéines G de la famille Rho ne semblent pas être impliquées dans l'injection des toxines par le SST3 de *P. aeruginosa*.

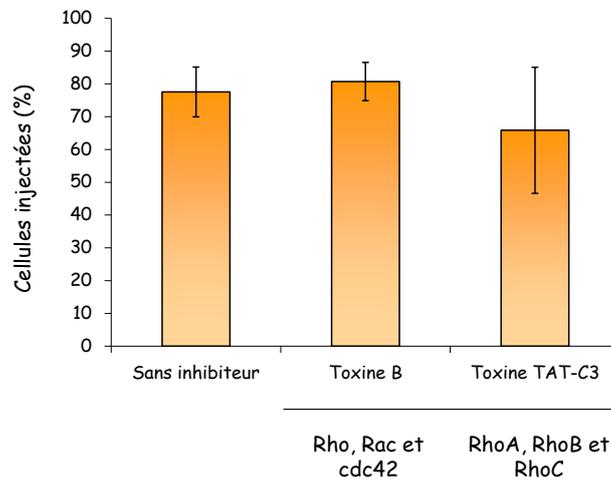


Figure 52 : Rôle des petites protéines G dans l'injection d'ExoS-Bla

Les cellules HL-60 VitD3 sont traitées en présence de 2,5 nM de toxine B, de 2 μM de toxine TAT-C3 pendant 2 h puis infectées par la souche PAO1FΔ3TOX/S_{R146A}-Bla à une MOI de 10 en présence des deux inhibiteurs. Après 3 h d'infection, les cellules sont incubées en présence de CCF2 pendant 30 min et analysées par cytométrie en flux.

Pour confirmer l'absence d'effet de Rho dans l'injection des exotoxines par le SST3 de *P. aeruginosa*, d'autres kinases comme ROCK (Rho-Associated Protein Kinase) ont également été testées. L'activation de ROCK étant dépendante de Rho, nous avons donc évalué l'impact d'un traitement des cellules HL-60 VitD3 par des inhibiteurs de ROCK (Y-27632) sur l'injection d'ExoS-Bla (Figure 53).

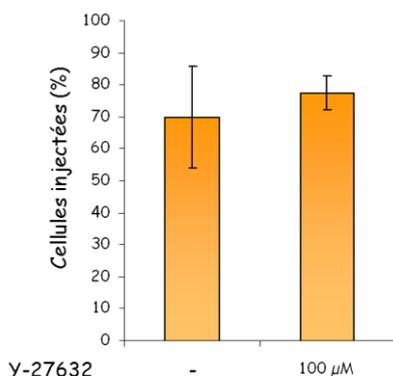


Figure 53 : Le blocage de la kinase ROCK n'a pas d'effet sur l'injection d'ExoS-Bla

Les cellules HL-60 VitD3 sont traitées en présence de 100 μM de ROCK (Y-27632) pendant 2 h puis infectées par la souche PAO1FΔ3TOX/S_{R146A}-Bla à une MOI de 10. Après 3 h d'infection, les cellules sont incubées en présence de CCF2 pendant 30 min et analysées par cytométrie en flux.

L'inhibition de ROCK par le Y-27632 (*Figure 53*) n'a pas permis de bloquer l'injection dans les cellules HL-60 VitD3. Ces résultats sont donc à relier avec ceux montrant l'absence d'effet des inhibiteurs de Rho sur l'injection de toxine.

IV.4 - Les kinases Scr et PI3K

L'activation de FAK ou de Pyk2 permet le recrutement puis l'activation des kinases Scr et PI3K via leurs domaines SH2.

L'insertion du translocon et l'injection des toxines par le SST3 de *Yersinia* passe par l'activation des kinases Scr (Mejia *et al.*, 2008). D'autres études ont montré que les kinases de la famille Scr ou les PI3K jouaient un rôle important dans l'internalisation de *Yersinia*, *Shigella* et de *P. aeruginosa* (Esen *et al.*, 2001; Kannan *et al.*, 2006; Mejia *et al.*, 2008; Nhieu *et al.*, 2005). C'est le cas de la kinase Lyn qui active les PI3K au niveau des RL pour induire l'internalisation de *P. aeruginosa* dans les macrophages (Kannan *et al.*, 2008). L'implication de ces kinases dans l'injection des exotoxines a été étudiée dans les cellules HL-60 VitD3 (

Figure 54). L'impact d'un traitement des cellules HL-60 VitD3 par des inhibiteurs des kinases Scr (PP2), des PI3K (Wortmannine et LY-294002) ainsi que des tyrosines kinases (Génistéine) sur l'injection d'ExoS-Bla par le SST3 de *P. aeruginosa* a été évalué (*Figure 55*).

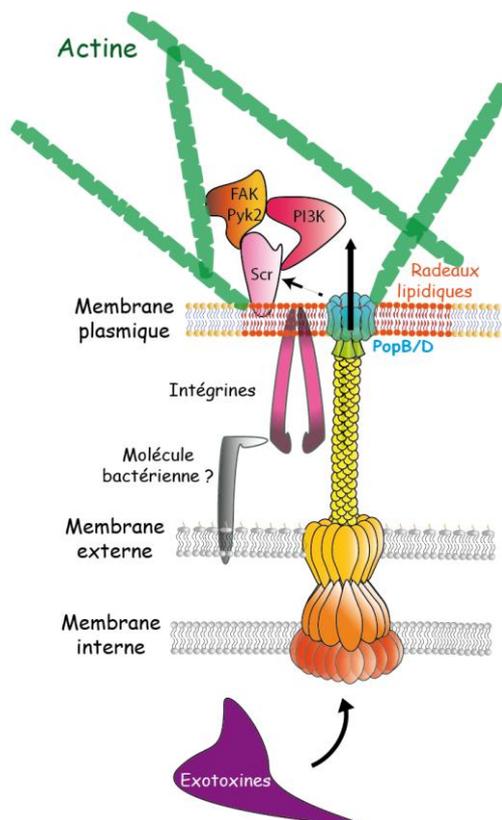


Figure 54 : Implication des kinases Scr, des PI3K et des tyrosines kinases dans l'injection des exotoxines par *P. aeruginosa*.

L'inhibition de l'activité des tyrosines kinases des cellules HL-60 VitD3 par la génistéine bloque de façon dose dépendante l'injection d'ExoS-Bla avec des pourcentages d'inhibition de plus de 80 % en présence 12 μ M de génistéine (Figure 55A). L'inhibition des kinases Scr par le PP2 (Figure 55B) et des PI3K par la wortmannine (Figure 55C) et le LY294002 (Figure 55D) diminue également de façon dose-dépendante l'injection d'ExoS-Bla. En présence de 20 μ M de PP2, moins de 20 % des cellules sont injectées. A 50 nM de wortmannine, moins de 20 % des cellules ont reçu une injection de toxines. En présence de 100 μ M de LY294002, la quasi-totalité des cellules n'a pas reçu d'injection d'ExoS-Bla. Ces résultats indiquent la nécessité de l'activation de protéines de type tyrosines kinases, Src kinases et PI3 kinases dans les cellules HL-60 VitD3 pour permettre l'injection d'ExoS-Bla par le SST3 de *P. aeruginosa*.

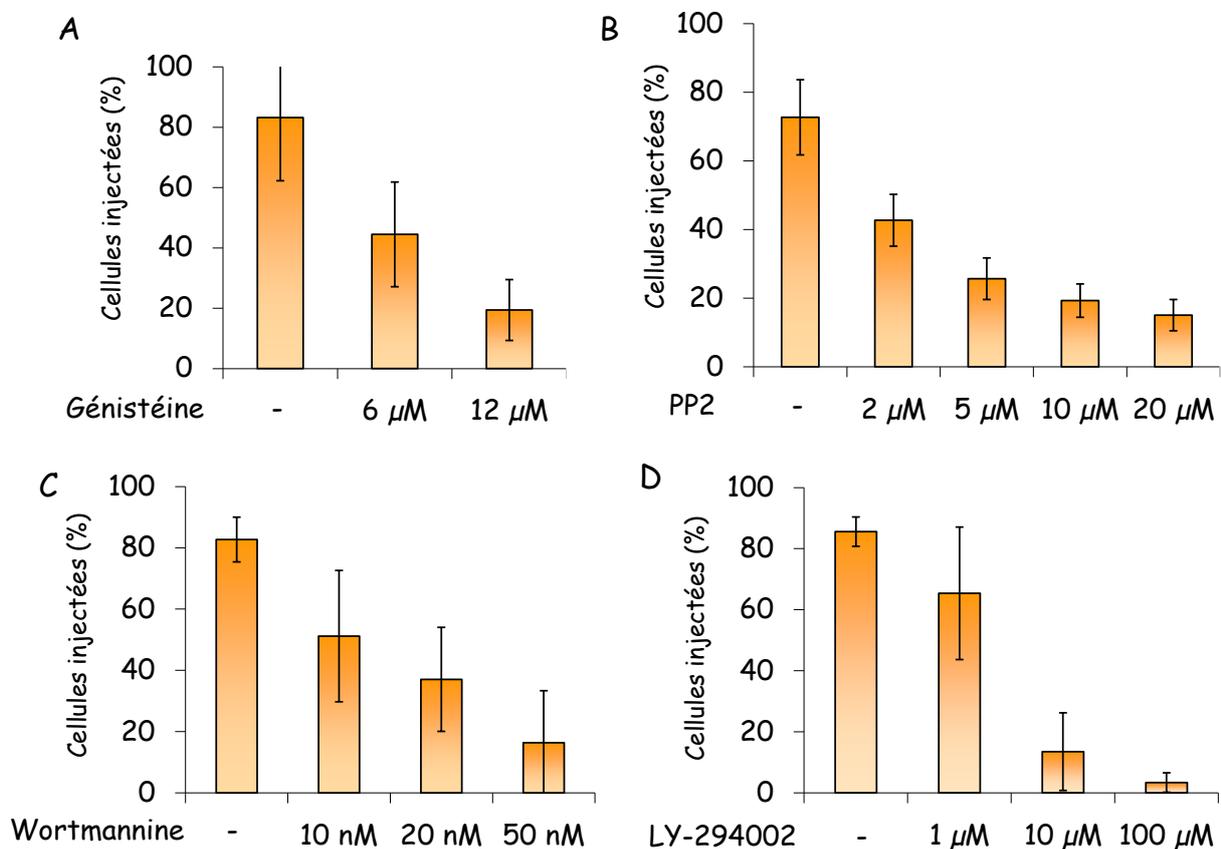


Figure 55 : Le blocage des tyrosines kinases, Src kinases et PI3K inhibe l'injection d'ExoS-Bla

Les cellules HL-60 VitD3 sont traitées en présence de différentes concentrations de génistéine pendant 2 h (A), PP2 pendant 2 h (B), wortmannine pendant 30 min (C) ou de LY294002 (D) pendant 2 h puis infectées par la souche PAO1 Δ 3TOX/S_{R146A}-Bla. Après 3 h d'infection, les cellules sont incubées en présence de CCF2 pendant 30 min et analysées par cytométrie en flux

IV.5 - Effets des inhibiteurs de l'injection de toxines dans la lignée U937

Tout comme les cellules HL-60, la lignée U937 ND est également résistante à l'injection d'ExoS-Bla. La différenciation en présence de VitD3 rend ces cellules sensibles à l'injection. Il est donc possible que les voies de signalisations impliquées soient les mêmes dans ces deux types cellulaires. Les inhibiteurs bloquant l'injection de toxines dans les cellules HL-60 ont été testés sur la lignée U937 différenciées en VitD3 à la concentration la plus élevée utilisée pour les cellules HL-60. Tous les inhibiteurs diminuent au moins d'un facteur deux le nombre de cellules injectées, ce qui indique que les voies de signalisation impliquées dans les cellules HL-60 VitD3 le sont aussi dans les cellules U937 VitD3 pour permettre l'injection d'ExoS-Bla par le SST3 de *P. aeruginosa* (Figure 56A). Néanmoins, le nombre de cellules U937 VitD3 injectées reste plus important que celui des cellules HL-60 VitD3. A ce stade, il est difficile de conclure dans la mesure où les concentrations optimales d'inhibiteurs n'ont pas encore été déterminées.

Les cellules HL-60 ND n'expriment pas Pyk2 (Figure 50). En ce qui concerne les cellules U937, l'expression de Pyk2 est faible mais équivalente dans les cellules U937 ND et U937 VitD3 (Figure 56B). La différence de susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla observée entre les cellules U937 ND et U937 VitD3 n'est donc pas due à l'absence de Pyk2 dans les cellules U937 ND. Une variation de l'état d'activation de Pyk2 est en revanche une hypothèse intéressante qui pourrait expliquer la résistance des cellules U937 ND à l'injection. Des expériences de Western blot utilisant des anticorps dirigés contre la tyrosine phosphorylée de la forme active de Pyk2 (Y-402) sont actuellement envisagées.

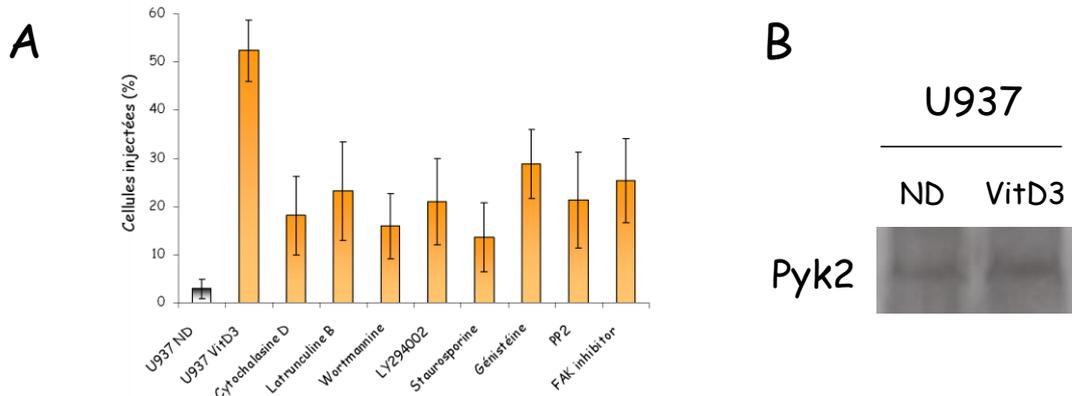


Figure 56 : Inhibition de l'injection d'ExoS-Bla et expression de Pyk2 dans les cellules U937 VitD3

A : Les cellules U937 VitD3 sont traitées ou non en présence de 10 μM de cytochalasine D, 10 μM de latrunculine B, 50 nM de wortmannine, 4 μM de staurosporine pendant 30 min ou en présence de 100 μM de LY294002, 12 μM de génistéine, 20 μM de PP2 ou 10 μM de FAK inhibitor pendant 2 h puis infectées par la souche PAO1F Δ 3TOX/S_{R146A}-Bla à une MOI de 10. Après 3 h d'infection, les cellules sont incubées en présence de CCF2 pendant 30 min et analysées par cytométrie en flux.

B : Les lysats de cellules U937 ND ou de cellules U937 VitD3 sont déposés sur un gel SDS-PAGE, puis transférés et analysés par immunorévélation en présence d'anticorps dirigés contre la protéine Pyk2.

IV.6 - Contrôle de l'effet des inhibiteurs sur le clivage du CCF2, l'induction du SST3 et l'insertion du translocon

Le blocage de l'injection d'ExoS-Bla par les inhibiteurs testés précédemment peut être le reflet d'une perturbation de l'entrée ou du clivage du CCF2 dans les cellules, mais également de l'induction des gènes du SST3 ou de l'insertion du translocon dans les membranes plasmiques des cellules cibles.

Le clivage de CCF2 a été contrôlé dans des cellules HL-60-Bla préalablement incubées en présence des inhibiteurs (Figure 57). En présence de CCF2, la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) bleue des cellules est de 52. En présence des inhibiteurs, la totalité des cellules HL-60-Bla sont bleues avec des MFI équivalentes de 50. Aucun des inhibiteurs n'a donc perturbé l'entrée ou le clivage du CCF2 dans les cellules HL-60-Bla.

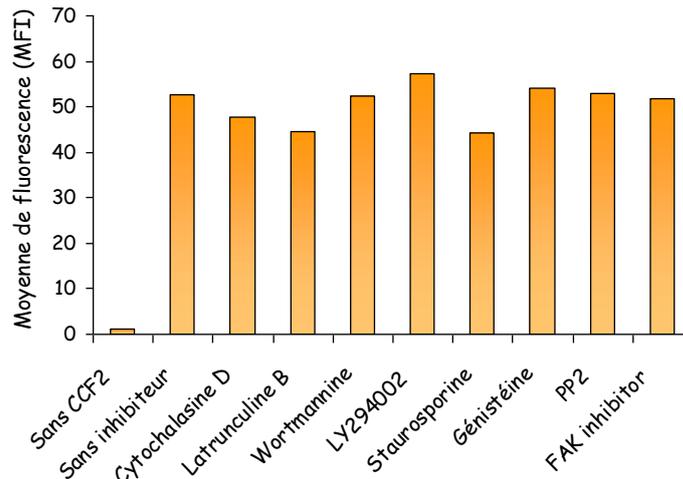


Figure 57: Les inhibiteurs testés ne perturbent ni le chargement ni le clivage du CCF2 dans les cellules HL-60-Bla

Les cellules HL-60-Bla sont traitées ou non en présence de 10 μM de cytochalasine D, 10 μM de latrunculine B, 50 nM de wortmannine, 4 μM de staurosporine pendant 30 min ou en présence de 100 μM de LY294002, 12 μM de Génistéine, 20 μM de PP2 ou 10 μM de FAK inhibitor pendant 2 h, puis incubées en présence de CCF2 pendant 30 min. La fluorescence globale ou moyenne de fluorescence (MFI) est représentée sous forme d'histogramme.

Les inhibiteurs testés précédemment peuvent également bloquer l'expression des gènes du SST3 et empêcher ainsi la capacité des bactéries à injecter leurs effecteurs. Pour tester ces éventuels effets, la toxine chimérique ExoS-Bla a été recherchée dans le milieu de culture de bactéries cultivées en présence d'EGTA, en présence ou non d'inhibiteurs (*Figure 58*). En absence d'EGTA, ExoS-Bla n'est pas détectée. En présence d'EGTA, une importante quantité de toxine chimérique est observée, ce qui signifie que les gènes codant les protéines du SST3 ont été induits et que les effecteurs sont par conséquent sécrétés via l'aiguille dans le milieu de culture. L'intensité des bandes est équivalente lorsque les bactéries induites par l'EGTA sont mises en présence des inhibiteurs. La sécrétion d'ExoS-Bla n'est donc pas perturbée. Les inhibiteurs bloquent bien l'injection des effecteurs dans les cellules HL-60 VitD3, pas leur synthèse.

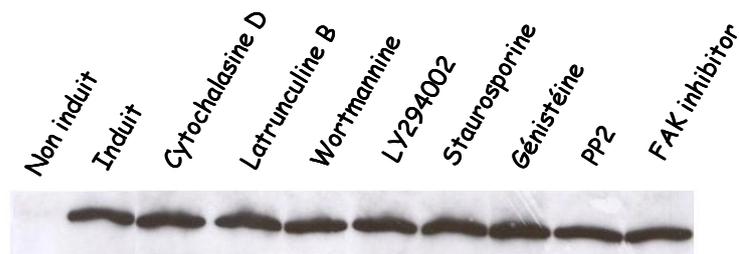


Figure 58 : Les inhibiteurs de l'injection ne bloquent pas la sécrétion d'ExoS-Bla par le SST3 de *P. aeruginosa*.

La souche *PAO1FΔ3TOX/S_{R146A}-Bla* est traitée à une DO_{600nm} de 0,1 en présence de 5 mM d'EGTA et de 20 mM de $MgCl_2$ pour induire l'expression des gènes du SST3, ainsi qu'en présence des inhibiteurs de l'injection des toxines (cytochalasine D, latrunculine B, wortmannine, LY294002, staurosporine, génistéine, PP2 et FAK inhibitor). Quand la DO_{600nm} atteint 1, les bactéries sont centrifugées 10 min à 6 000 g et le surnageant est analysé par Western blot. La toxine chimérique ExoSGAP-R146A/ β -lactamase est détectée à l'aide d'un anticorps dirigé contre la β -lactamase.

Le blocage de l'injection par les inhibiteurs peut empêcher l'insertion des protéines du translocon PopB et PopD dans les membranes des cellules HL-60 différenciées.

Les membranes de cellules HL-60 VitD3 traitées par les inhibiteurs de l'injection puis infectées par la souche *PAO1FΔ3TOX/S_{R146A}-Bla* ont été purifiées sur gradient discontinu de sucrose. Comme il avait été mentionné précédemment, seul PopB est retrouvé dans les membranes totales de cellules HL-60 différenciées en VitD3 infectées par la souche PAO1F (Figure 42). On retrouve une quantité équivalente ou supérieure de PopB quand les cellules sont traitées par les inhibiteurs de l'injection de toxines (Figure 59). Les inhibiteurs ne bloquent donc pas l'insertion du translocon dans les membranes plasmiques mais plutôt sa capacité à permettre le passage des exotoxines dans les cellules cibles. Ces inhibiteurs doivent probablement empêcher l'acquisition d'une conformation fonctionnelle du translocon dans les HL-60 VitD3. L'hypothèse d'une conformation inadéquate dans les cellules HL-60 ND reste donc toujours possible, ce qui expliquerait leur résistance à l'injection d'ExoS-Bla.

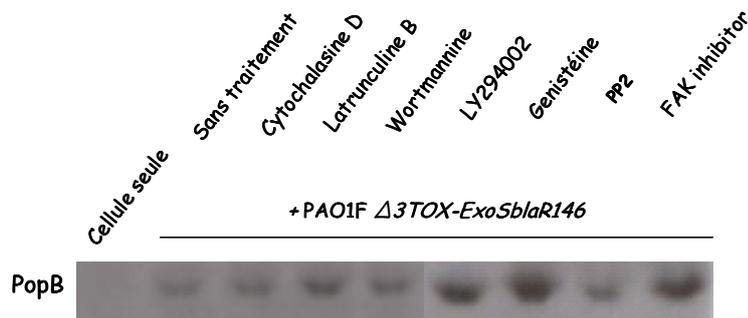


Figure 59 : Les inhibiteurs de l'injection de toxines ne perturbent pas l'insertion de PopB dans les membranes plasmiques

Les cellules HL-60 VitD3 sont traitées en présence d'inhibiteurs de l'injection de toxines (cytochalasine D, latrunculine B, wortmannine, LY294002, staurosporine, génistéine, PP2 et FAK inhibitor). Les concentrations sont identiques à celles utilisées dans la Figure 56. Les cellules sont ensuite infectées par la souche PAO1F Δ 3TOX/S_{R146A}-Bla à une MOI de 10. Après 3 h d'infection, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS, lysées, centrifugées et le surnageant est déposé sur gradient discontinu de sucrose. Les protéines des fractions membranaires supérieures sont collectées puis analysées sur gel SDS-PAGE puis sont transférées. La présence de PopB est révélée avec des anticorps dirigés contre PopB.

IV.7 - Rôle de l'inflammasome dans l'injection de toxines

Indépendamment de la présence des effecteurs, le SST3 de *P. aeruginosa* joue un rôle dans la signalisation au niveau de l'inflammasome de type NLRC4 (Franchi *et al.*, 2007 ; Miao *et al.*, 2008). En revanche, le rôle d'une autre protéine (flagelline, piline, PscJ) qui serait transloquée par le SST3 est controversé et l'hypothèse d'une signalisation directement induite par l'insertion du translocon dans la membrane de la cellule cible a été évoquée (Galle *et al.*, 2008). L'activation de l'inflammasome NLRC4 se traduit par l'activation de la caspase-1, l'induction de la pyroptose et la sécrétion d'IL-1 et d'IL-18. Nous avons cherché à savoir si les différentes voies de signalisation impliquées dans l'activation de l'inflammasome NLRC4 pouvaient jouer un rôle dans l'acquisition de la fonctionnalité du translocon.

L'éventuelle activation de la caspase-1 via NLRC4 a d'abord été recherchée. Les cellules HL-60 VitD3 ont été traitées en présence d'Ac-YVAD-cmk (YVAD) inhibiteur irréversible de la caspase-1 (Figure 60) puis infectées avec la souche PAO1F Δ 3TOX/S_{R146A}-Bla. Pour les trois concentrations de YVAD testées, le nombre de cellules injectées n'a pas

diminué par rapport aux cellules non traitées. La caspase-1 ne semble donc pas être impliquée dans l'injection des exotoxines ce qui suggère que l'activation de l'inflammasome NLRC4 n'est pas nécessaire pour induire l'injection d'ExoS-Bla dans les cellules HL-60 VitD3.

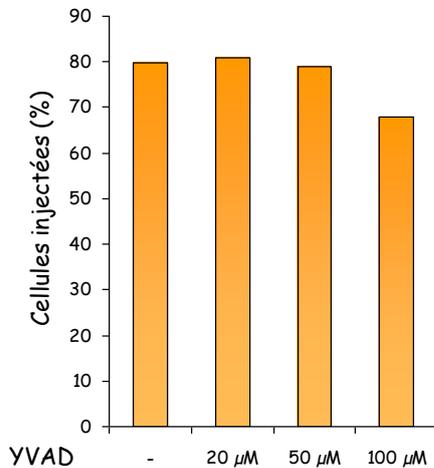


Figure 60 : Le blocage de l'activation de la caspase-1 n'a aucun effet sur la susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla dans les cellules HL-60 VitD3
 Les cellules HL-60 VitD3 sont traitées en présence de 20 µM, 50 µM et 100 µM de Ac-YVAD-cmk pendant 2 h puis infectées par la souche PAO1FΔ3TOX/S_{R146A}-Bla à une MOI de 10. Après 3 h d'infection, les cellules sont incubées en présence de CCF2 pendant 30 min et analysées par cytométrie en flux.

Des résultats récents ont montré que la fuite du potassium intracellulaire est nécessaire à l'activation de NLRC4 induite par le SST3, et lorsqu'on inhibe cette sortie de potassium l'activation de NLRC4 est inhibée (Arlehamn *et al.*, 2010). Nous avons donc incubé les cellules en présence d'une forte concentration extracellulaire en potassium afin d'empêcher la sortie du potassium intracellulaire.

La susceptibilité des cellules HL-60 VitD3 à l'injection d'ExoS-Bla a été testée dans un milieu contenant soit 5 mM, soit 150 mM de KCl (Figure 61). Ce traitement n'a cependant pas permis de bloquer l'injection d'ExoS-Bla dans les cellules HL-60 VitD3 puisque le pourcentage de cellules intoxiquées reste voisin de 50 % en présence d'une faible ou d'une forte concentration en potassium.

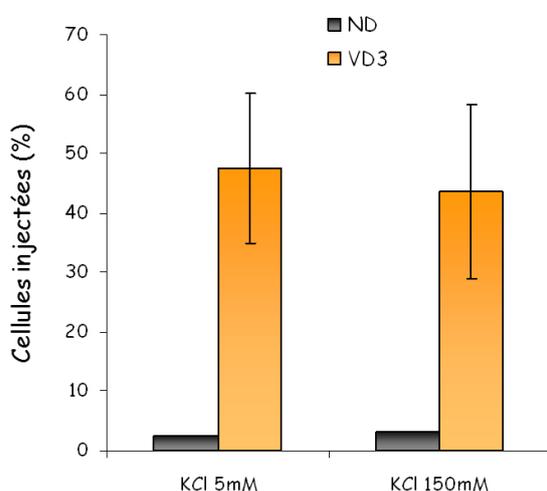


Figure 61 : Une sortie d'ions K⁺ des cellules HL-60 VitD3 n'est pas nécessaire pour induire l'injection d'ExoS-Bla
 Les cellules HL-60 ND ou HL-60 VitD3 sont cultivées dans un milieu de Hanks contenant 5 mM ou 150 mM de KCl. Les cellules sont ensuite infectées en présence de la souche PAO1FΔ3TOX/S_{R146A}-Bla à une MOI de 10. Après 3 h d'infection, les cellules sont incubées en présence de CCF2 pendant 30 min et analysées par cytométrie en flux.

L'ensemble de ces résultats n'a pas permis de mettre en évidence le rôle des inflammasomes de type NLRC4 et de la caspase-1 dans l'induction de l'injection des exotoxines dans les cellules HL-60 VitD3.

IV.8 - Discussion

Les radeaux lipidiques contiennent des protéines transmembranaires qui lient le cytosquelette d'actine sous-cortical. De par sa dynamique de polymérisation, l'actine joue un rôle très important dans le regroupement des RL de la membrane, permettant ainsi l'oligomérisation de récepteurs et l'activation de voies de signalisations (Lingwood and Simons, 2010).

Nous avons montré que le traitement des cellules HL-60 VitD3 ou U937 VitD3 avec des inhibiteurs de la polymérisation de l'actine, la cytochalasine D (CytoD) et la latrunculine B (LtrB), bloque l'injection des effecteurs. Bridge montre une absence d'effet de la CytoD et un très faible effet de la LtrB dans l'injection de toxines dans les cellules épithéliales HT-29 (Bridge *et al.*, 2010). L'effet différent de la CytD et de la LtrB sur ces deux types cellulaires nous a amené à suspecter l'activation de la voie NF- κ B observé spécifiquement dans les cellules myéloïdes traitées avec ces deux inhibiteurs (Kustermans *et al.*, 2005). Malheureusement l'utilisation de l'inhibiteur de la voie NF- κ B : Bay11-7082 s'est révélé, dans nos mains, à l'origine d'une mortalité cellulaire élevée incompatible avec l'étude envisagée. De façon surprenante, l'inhibition de Rho, Rac et cdc42 (GTPases fortement impliquées dans les mécanismes de polymérisation de l'actine) n'a pas empêché l'injection des toxines dans les cellules HL-60 VitD3. Il s'avère donc que le réseau d'actine lui-même plutôt que la dynamique de polymérisation de l'actine est important dans l'insertion du translocon et dans l'injection d'ExoS-Bla. Dans le cas de *Yersinia*, le blocage de la polymérisation de l'actine et de Rho inhibe bien l'injection des toxines dans les cellules épithéliales HeLa (Mejia *et al.*, 2008) suggérant une régulation différente entre *Yersinia* et *P. aeruginosa*. L'inhibition de l'activité des PI3K et des tyrosines kinases telles que les Src bloquent l'injection de toxines de *P. aeruginosa* dans les cellules HL-60 VitD3. Aucun effet n'a été constaté dans les cellules épithéliales HT-29 (Bridge *et al.*, 2010) alors que le blocage des kinases Src diminue la susceptibilité à l'injection des toxines de *Yersinia* dans les cellules HeLa.

Les invasines et YadA de *Yersinia* interagissent avec les intégrines β_1 des cellules cibles et l'activation de FAK et Pyk2 initiée par les intégrines est nécessaire pour induire l'internalisation de *Yersinia* et l'injection des effecteurs dans les cellules cibles (Uliczka *et al.*, 2009). Watarai montre que les protéines du translocon de *Shigella* interagissent avec les intégrines $\alpha_5\beta_1$ et induisent l'activation de FAK et de la paxilline nécessaire à l'invasion de *Shigella* (Watarai *et al.*, 1996). L'insertion du translocon semble donc se situer au niveau des adhérences focales. De façon intéressante, le traitement des cellules HL-60 VitD3 en présence d'un inhibiteur de l'activité de Pyk2 empêche l'injection de toxines de *P. aeruginosa*. Ces résultats sont à relier à l'absence de Pyk2 observée dans les HL-60 ND, ce qui fait de Pyk2 un candidat intéressant pouvant expliquer la différence de susceptibilité à l'intoxication par les effecteurs observée entre les cellules HL-60 ND et les cellules HL-60 VitD3. La transfection des cellules HL-60 ND avec les ADNc de Pyk2 pourrait nous donner une information importante quant au rôle de cette protéine dans la régulation de la fonctionnalité du translocon de *P. aeruginosa*, et le cas échéant rendre les cellules HL-60 ND sensibles à l'injection d'ExoS-Bla. En revanche, le blocage de la signalisation par les intégrines à l'aide d'anticorps spécifiques des chaînes β_1 ou β_2 , ne nous a pas permis d'observer de diminution du nombre de cellules injectées par ExoS-Bla. Cependant, d'autres voies d'activation des FAKs par les syndecan-4 (Wilcox-Adelman *et al.*, 2002) ou les récepteurs de surface couplés à des protéines G (GPCR) pourraient être à l'origine de l'activation de Pyk2. Il serait donc intéressant d'évaluer la sensibilité des cellules HL-60 VitD3 en bloquant l'expression des syndecan-4 ou en inhibant l'activité des GPCR.

Tous les inhibiteurs ayant diminué l'injection d'ExoS-Bla sont sans effet sur l'insertion du translocon dans les membranes des cellules HL-60 VitD3. Cette insertion semble donc être indépendante d'une voie de signalisation dans les cellules cibles. PopB est protéolysée dans les HL-60 ND, cellules dans lesquelles l'injection d'ExoS-Bla n'est pas observée. Il serait donc intéressant de déterminer si PopB est protéolysée ou non dans les RL de cellules HL-60 VitD3 incubées en présence des inhibiteurs de l'injection.

Plusieurs études suggèrent qu'en absence des effecteurs, certaines bactéries induisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β ou l'IL-18 en activant notamment la caspase-1 via l'inflammasome NLRC4, cette activation nécessitant la présence du SST3 (Bauernfeind *et al.*, 2011). L'activation de NLRC4 peut être induite par la flagelline (Franchi *et al.*, 2007; Galle *et al.*, 2008; Miao *et al.*, 2008) ou les protéines de type PrgJ formant le corps basal du SST3 (Miao *et al.*, 2010b) qui sont alors transloquées par le SST3.

Néanmoins certains résultats suggèrent un rôle direct du translocon inséré dans la membrane de la cellule cible indépendamment de l'injection de toute molécule par le SST3 (Sutterwala *et al.*, 2007). De plus, sur la totalité des gènes d'une cellule cible dont l'expression est modulée par le SST3, 86 % ont une expression modulée par les effecteurs et 14 % dépendent strictement de l'insertion du translocon (Ichikawa *et al.*, 2005). Dans notre modèle d'étude, l'hypothèse d'une signalisation induite par l'insertion du translocon passant par une activation de NLRC4 et indépendante de la présence des effecteurs (souche PAO1FΔ3TOX/S_{R146A}-Bla) a été testée. Le blocage de la caspase-1 dans les cellules HL-60 VitD3 n'a cependant pas permis de diminuer le nombre de cellules ayant reçues une injection d'ExoS-Bla. L'activation de NLRC4 indépendante de la flagelline est dépendante d'une sortie d'ions potassium lors d'une infection par *P. aeruginosa* (Arlehamn *et al.*, 2010). Or, la présence d'une forte concentration extracellulaire en potassium (inhibant la sortie du K⁺ intracellulaire) n'a pas permis de bloquer l'injection des toxines de *P. aeruginosa*. Ces résultats ne semblent donc pas impliquer l'inflammasome dans l'induction de l'injection de toxines par *P. aeruginosa* dans les HL-60 VitD3. Ces résultats peuvent être reliés à ceux obtenus avec *Yersinia pseudotuberculosis*, pour lesquels le blocage de la caspase-1 est sans effet sur l'injection des toxines dans les cellules épithéliales (Mejia *et al.*, 2008).

V - Acquisition de la sensibilité à l'injection des cellules HL-60 ND

Durant les expériences présentées précédemment, les cellules HL-60 non différenciées ont été systématiquement testées en parallèle des cellules HL-60 VitD3. Or lors d'une expérience, nous avons constaté que ces cellules HL-60 ND devenaient susceptibles à l'injection d'ExoS-Bla par le SST3 de *P. aeruginosa*. En effet, pour certains inhibiteurs, l'absence de SVF (Sérum de Veau Fœtal) a été testée, et dans ce contexte particulier, les cellules HL-60 ND ont acquis très rapidement une susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla. Nous avons donc cherché à définir les paramètres contrôlant l'acquisition de cette susceptibilité des cellules HL-60 ND.

V.1 - Sensibilité des cellules HL-60 ND à l'injection de toxines en absence de SVF

Nous avons observé que la totalité des cellules HL-60 ND adhéraient au support en moins de cinq minutes d'incubation dans un milieu RPMI dépourvu de SVF ou contenant 1 % de Nutridoma. En effet, après infection avec la souche CHAΔS/S-Bla, les cellules HL-60 ND deviennent sensibles à l'injection de toxines avec plus de 85 % de cellules intoxiquées (*Figure 62A*).

Le simple fait de retirer le SVF du milieu de culture suffit à rendre les cellules HL-60 non différenciées sensibles à l'injection d'ExoS-Bla alors que la susceptibilité des cellules HL-60 VitD3 est légèrement augmentée par ce traitement. L'augmentation progressive de la concentration en SVF dans le milieu de culture induit une baisse progressive de l'intoxication des cellules HL-60 ND avec moins de 20 % de cellules injectées pour 1 % de SVF et moins de 10 % pour 5 % et 10 % de SVF (*Figure 62B*). La différence de susceptibilité des cellules HL-60 VitD3 est également perceptible dès 1 % de SVF mais cette diminution ne semble pas évoluer au-delà de 5 % de SVF et on observe toujours 60 % de cellules injectées (*Figure 62B*). La présence de SVF *in vitro* est donc un élément déterminant de la susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla.

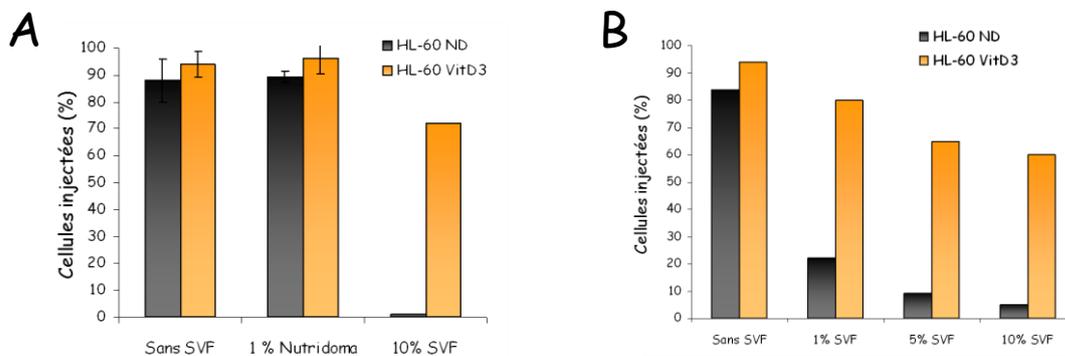


Figure 62 : L'absence de SVF dans le milieu de culture rend les cellules HL-60 ND sensibles à l'injection d'ExoS-Bla

Les cellules HL-60 ND ou HL-60 VitD3 sont incubées 1 h dans un milieu RPMI contenant 1 % de Nutridoma ou 10 % de SVF (A) ou 1 h dans un milieu RPMI contenant différentes concentrations de SVF (1 %, 5 % et 10 %) (B).

Les cellules sont ensuite mises en présence de la souche CHAΔS/S-Bla à une MOI de 50. Après 3 h d'infection, les cellules sont incubées en présence de CCF2 pendant 30 min et analysées par cytométrie en flux.

Nous avons également observé la réversibilité de ce phénomène. Alors qu'une incubation de 1 h en absence de SVF conduit à une acquisition de la susceptibilité à l'injection, les cellules HL-60 ND incubées 12 h en absence de SVF sont elles, résistantes à l'injection (*Figure 63A*). Les cellules incubées 1 h en absence de SVF adhèrent au support de culture, alors qu'après 12 h en absence de SVF, elles ont perdu toute propriété d'adhérence. Ce phénomène de réversibilité de l'adhérence plusieurs heures après le début de l'incubation en absence de SVF a été décrit (Yoshihara *et al.*, 1994).

Les cellules incubées 12 h en absence de SVF ont ensuite été lavées puis remises en suspension dans du milieu RPMI contenant ou non 10 % de SVF. En présence de SVF, les cellules sont de nouveau résistantes à l'injection d'ExoS-Bla alors qu'en absence de SVF les cellules réadhèrent au support et redeviennent sensibles à l'injection de toxines (*Figure 63A*). Nous observons donc une corrélation étroite entre la capacité des cellules à adhérer au support et leur susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla.

L'étape suivante a consisté à étudier si l'injection d'ExoS-Bla observé dans les cellules HL-60 ND en absence de SVF était sensible aux inhibiteurs affectant l'injection dans les cellules HL-60 VitD3. L'incubation en présence de cytochalasine D ou de latrunculine B est sans conséquence sur l'injection d'ExoS-Bla dans les cellules HL-60 ND incubées en absence de SVF (*Figure 63B*). Il semble que contrairement à l'injection d'ExoS-Bla dans les cellules HL-60 VitD3 qui requière l'intégrité du cytosquelette d'actine, l'injection de toxine permise par la privation de SVF soit totalement indépendante de l'intégrité du cytosquelette d'actine. Les mécanismes cellulaires responsables de la susceptibilité des cellules HL-60 ND à l'injection en absence de SVF sont donc différents de ceux observés avec les cellules HL-60 VitD3 en présence de SVF.

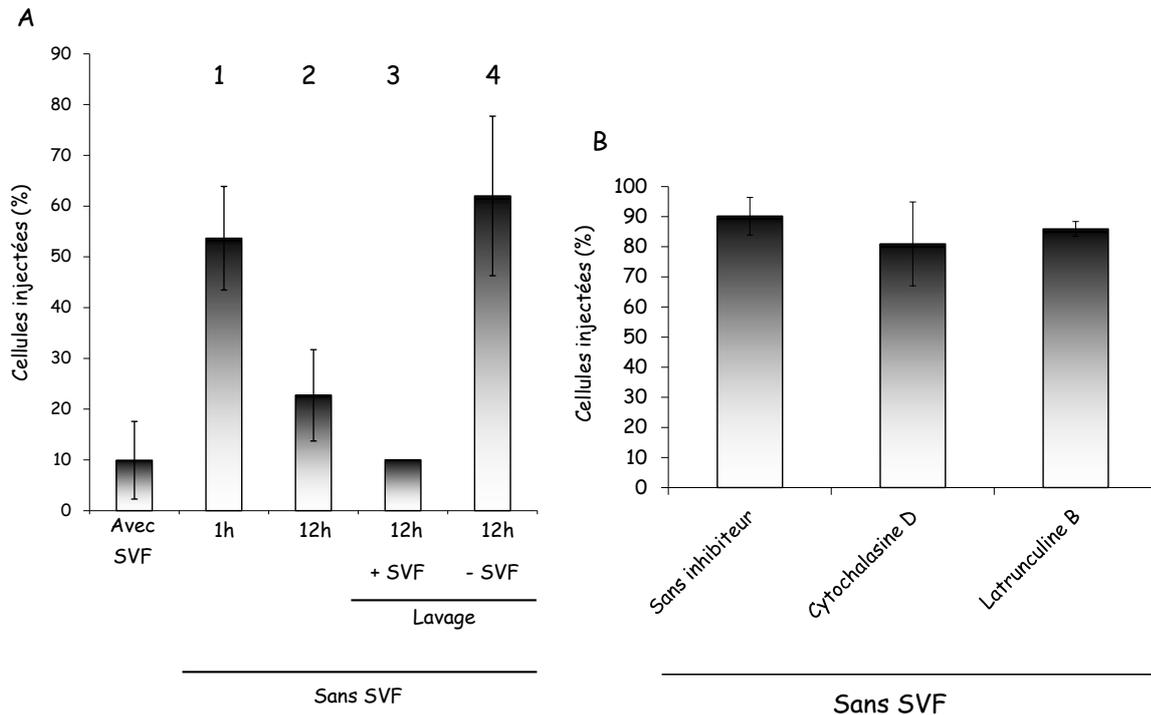


Figure 63 : Réversibilité de la susceptibilité des cellules HL-60 ND à l'injection d'ExoS-Bla en absence de SVF

A : Les cellules sont incubées 1 h (1) ou 12 h (2) en absence de 10 % de SVF. Les cellules incubées pendant 12 h sans SVF sont lavées et remises en culture dans du RPMI avec (3) ou sans (4) de SVF.

B : Les cellules HL-60 ND incubées en absence de SVF pendant 1 h sont soit non traitées, soit traitées avec 10 μ M de cytochalasine D ou 10 μ M de latrunculine B pendant 30 min. Les cellules sont ensuite infectées par la souche CHA Δ S/S-Bla à MOI de 50. Après 3 h d'infection, les cellules sont incubées en présence de CCF2 pendant 30 min et analysées par cytométrie en flux.

Le SVF est un liquide complexe en termes de contenu : glucides, lipides, minéraux, protéines parmi lesquelles de nombreux facteurs de croissance nécessaires à la croissance et à la survie des cellules eucaryotes. La privation en SVF des cellules HL-60 pouvait donc avoir un impact très complexe sur les cellules HL-60 ND. Nous avons donc dans un premier temps testé l'incidence du contenu en protéines du SVF. L'incidence de la présence d'albumine sérique bovine (BSA) ou d'ovalbumine (OVA) sur l'adhérence des cellules et sur la susceptibilité à l'injection de toxines a été testée (Figure 64).

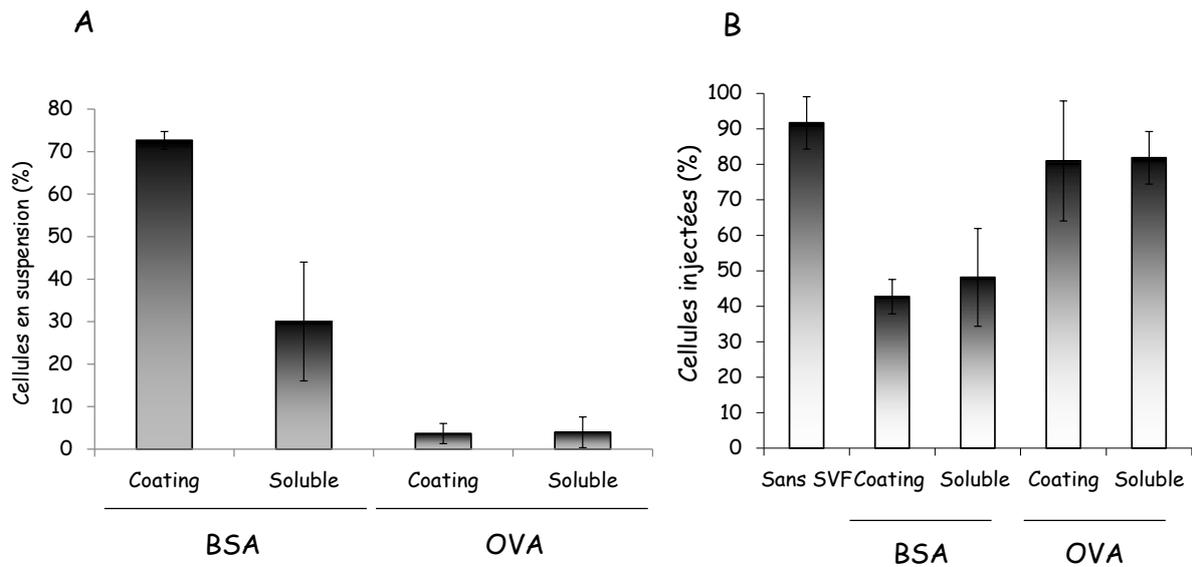


Figure 64 : Effet de la BSA et de l'OVA sur la susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla des cellules HL-60

Les cellules HL-60 ND sont incubées en présence de RPMI sans SVF dans des puits coatés préalablement par 15 μM de SAB ou d'OVA pendant une nuit à 4 °C (Coating) ou dans des puits non coatés mais en présence de 35 μM de BSA ou 55 μM d'OVA dans le milieu de culture (Soluble) durant 1 h.

(A) : Les cellules en suspension sont prélevées et énumérées sur lame de Neubauer.

(B) : Les cellules sont infectées par la souche CHA Δ S/S-Bla à une MOI de 50. Après 3 h d'infection, les cellules sont incubées en présence de CCF2 pendant 30 min et analysées par cytométrie en flux.

Que la BSA soit déposée au fond des puits (coating) ou contenue dans le milieu de culture RPMI (soluble), une diminution très nette de l'adhérence des cellules est observée. Après infection par la souche CHA Δ S/S-Bla, le nombre de cellules injectées est diminué d'un facteur deux (Figure 64B). En revanche, l'OVA n'a quasiment aucun effet, la totalité des cellules adhèrent au support et sont sensibles à l'injection de toxines (Figure 64A et B). L'ovalbumine n'a manifestement qu'une très faible capacité à inhiber l'adhérence des cellules HL-60.

Ces résultats indiquent donc que le blocage de l'adhérence empêche l'injection de toxines dans les cellules HL-60 différenciées. L'adhérence des cellules HL-60 différenciées semble donc jouer un rôle clé pour induire la susceptibilité à l'injection des toxines. Il est donc possible que l'adhérence et l'injection de toxines dans les cellules HL-60 ND incubées

en absence de SVF fasse appel à des mécanismes et voies de signalisations différentes de ceux observés dans les cellules HL-60 VitD3.

V.2 - Le « panning » des cellules HL-60 ND induit la susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla

L'adhérence des cellules au support de culture semblait déterminante pour conférer la susceptibilité des cellules HL-60 ND à l'intoxication en absence de SVF, aussi nous avons voulu confirmer ces résultats avec une autre approche. L'adhérence des cellules HL-60 ND a été obtenue, en présence de SVF, à l'aide d'un anticorps.

La fixation de cellules non adhérentes est possible en les incubant dans des plaques de culture préalablement traités avec des anticorps dirigés contre des protéines de surface. Cette méthode appelée « panning » permet la fixation des cellules grâce à l'interaction des protéines de surface avec les anticorps fixés au fond de la plaque (Wysocki and Sato, 1978).

Le « panning » des cellules HL-60 ND a été effectué avec des anticorps spécifiques de CD43, glycoprotéine transmembranaire exprimée à la surface de tous les leucocytes. Les cellules HL-60 ND ont été déposées dans des puits préalablement incubés (coatés) avec des anticorps anti-CD43 durant 1 h, les cellules adhèrent au support en moins de 5 min. L'infection de ces cellules par la souche CHAΔS/S_{R146A}-Bla induit une importante susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla avec plus de 80 % de cellules injectées quel que soit l'anticorps monoclonal anti-CD43 utilisé (*Figure 65A*).

Les cellules HL-60 ND fixées par les anticorps anti-CD43 sont ensuite transférées dans un puits qui n'a pas été préalablement coaté. Les cellules n'adhèrent plus au fond du puits et redeviennent résistantes à l'injection d'ExoS-Bla quelques minutes après le changement de puits (*Figure 65B*). La présence de cytochalasine D n'entraîne pas de modification significative de la susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla (*Figure 65C*).

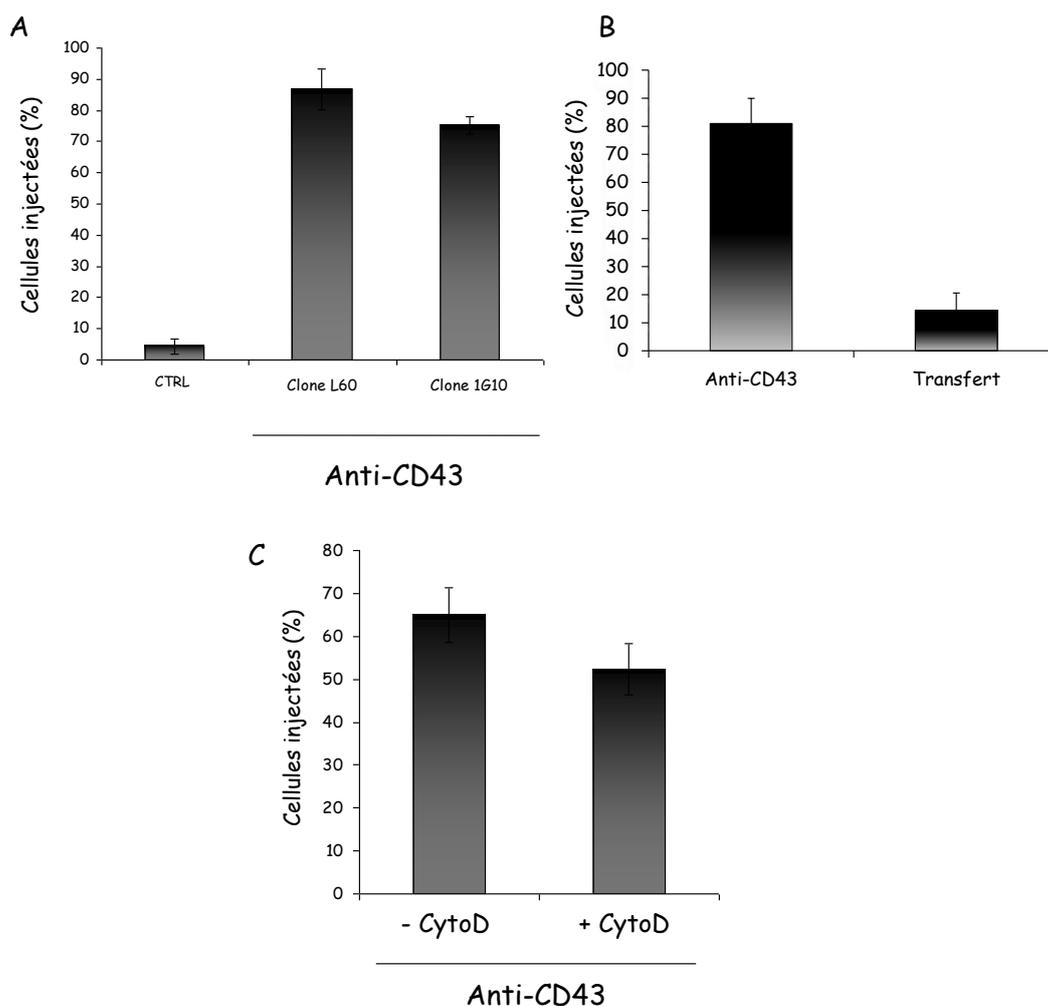


Figure 65 : Le « panning » des cellules HL-60 ND induit la susceptibilité à l'injection d'ExoS-Bla

A : Les cellules HL-60 ND sont déposées dans des puits ayant été coatés au préalable avec un anticorps anti-CD43 : clone L60 à 0,5 $\mu\text{g/ml}$ ou clone 1G10 à 1 $\mu\text{g/ml}$. Après 1 h, les cellules HL-60 ND sont infectées par la souche CHA Δ S/S_{R146A}-Bla à une MOI de 10. Après 3 h d'infection, les cellules sont incubées en présence de CCF2 pendant 30 min et analysées par cytométrie en flux.

B : Des cellules HL-60 ND sont soit traitées comme dans la partie A avec le clone L60 (anti-CD43), soit traitées comme dans la partie A puis transférées dans un puits non coaté (transfert). Après 1 h, les cellules sont infectées par la souche CHA Δ S/S_{R146A}-Bla à une MOI de 10. Après 3 h d'infection, les cellules sont incubées en présence de CCF2 pendant 30 min et analysées par cytométrie en flux.

C : Les cellules HL-60 ND fixées préalablement par des anticorps anti-CD43 (clone 1G10) sont traitées avec 10 μM de cytochalasine D pendant 30 min. Les cellules sont ensuite infectées par la souche CHA Δ S/S_{R146A}-Bla à une MOI de 10. Après 3 h d'infection, les cellules sont incubées en présence de CCF2 pendant 30 min et analysées par cytométrie en flux.

Ces résultats permettent une nouvelle fois de montrer que quelle que soit la façon dont les cellules HL-60 ND adhèrent à leur support (absence de SVF, « panning » en présence d'anticorps), les cellules deviennent susceptibles à l'injection de toxines. En revanche, le fait que la cytochalasine D soit sans effet indique que les mécanismes impliqués sont probablement différents de ceux observés pour les cellules HL-60 VitD3.

V.3 - Discussion

Les cellules HL-60 ND deviennent totalement sensibles à une injection d'ExoS-Bla lorsque l'infection est réalisée dans un milieu dépourvu de SVF. En ajoutant de la BSA au milieu dépourvu de SVF, les cellules restent en suspension et sont assez résistantes à l'injection ; par contre l'ajout d'ovalbumine, sans effet sur l'adhérence des cellules, n'affecte absolument pas la susceptibilité des cellules HL-60 ND à l'injection d'ExoS-Bla. Nous avons donc la possibilité de relier l'adhérence des cellules au support de culture à une susceptibilité à l'intoxication par ExoS-Bla. Ceci nous permettait d'écarter le rôle du SVF en tant que source de facteurs de croissance et d'envisager un rôle de l'adhérence des cellules.

Afin de vérifier l'importance de ce phénomène d'adhérence, les cellules HL-60 ND ont été « pannées » avec des anticorps spécifiques de la protéine CD43, et dans ces conditions les cellules deviennent sensibles à l'injection d'ExoS-Bla alors que le SVF est présent dans le milieu de culture. Ces cellules transférées dans un puits non traité avec des anticorps sont à nouveau résistantes à l'injection et sont de nouveau en suspension. Comme cela avait été montré, en absence de SVF, l'adhérence des cellules est une étape déterminante pour rendre les cellules HL-60 susceptibles à l'injection des exotoxines. Ce phénomène est extrêmement rapide puisqu'il se produit en 3 h30 au maximum, temps beaucoup trop court pour induire des changements phénotypiques tels que ceux observés lors de la différenciation des cellules HL-60 par la VitD3. De plus ce phénomène est également totalement réversible en un temps très court. Il est donc probable que ce changement de susceptibilité à l'injection ne reflète pas la situation observée pour les HL-60 VitD3. Ceci est d'ailleurs confirmé par l'absence de sensibilité à la cytochalasine D de l'injection d'ExoS-Bla dans les cellules « pannées » avec l'anti-CD43, contrairement à ce qui était observé pour les HL-60 VitD3. Ces résultats suggèrent une insertion adéquate du translocon dans la membrane des cellules HL-60 ND. PopB ne doit donc pas être protéolysé dans les RL des cellules HL-60 « pannées » sur anti-CD43, contrairement aux cellules HL-60 ND.

L'incubation des neutrophiles avec un anticorps anti-CD43 provoque le regroupement de CD43 à l'uropode, ce qui induit une polarisation des cellules (Seveau *et al.*, 2000). Il est donc possible que dans nos conditions un tel phénomène de polarisation des cellules HL-60 soit observé. Ces résultats confirment ceux de Bridge qui montre une étroite corrélation entre l'adhérence, la polarisation des cellules et la susceptibilité à l'injection des toxines (Bridge *et al.*, 2010). En revanche, les lymphocytes Bjab et Jurkat sont des cellules qui n'adhèrent pas et sont pourtant sensibles à l'injection d'ExoS-Bla. L'adhérence n'est peut-être alors pas l'élément clef mais la seule polarisation de la cellule avec toutes les modifications qu'elle engendre permettrait la susceptibilité à l'injection. La différence entre la susceptibilité des HL-60 ND et HL-60 VitD3 à l'injection d'ExoS-Bla pourrait alors être due à une incapacité des cellules HL-60 ND à répondre à un signal de polarisation induit par *P. aeruginosa*. Ce signal de polarisation pourrait être dû à l'activation de Pyk2 exprimé seulement dans les cellules HL-60 VitD3. Cette polarisation induite artificiellement lors de l'adhérence des cellules en absence de SVF ou par « panning » avec les anticorps anti-CD43 courtcircuiterait cette dépendance de la voie Pyk2 et lèverait alors cette inhibition.

CONCLUSION et PERSPECTIVES

L'induction de l'expression de gènes du SST3 de *P. aeruginosa* est dépendante d'un contact entre la bactérie et la cellule cible. Une signalisation contact-dépendante est donc indispensable *in vivo* pour permettre la sécrétion et l'injection des exotoxines dans les cellules cibles. Actuellement, les signaux et voies de signalisations cellulaires qui permettent d'induire l'injection de toxines dans les cellules cibles par le SST3 de *P. aeruginosa* n'ont pas été clairement identifiés.

Les lignées HL-60 et U937, seuls types cellulaires résistants à l'injection des toxines sont des modèles pertinents pour étudier les mécanismes cellulaires permettant l'injection des effecteurs dans les cellules. L'utilisation du système rapporteur β -lactamase/CCF2 couplée à des expériences d'extraction de membranes des cellules HL-60 a révélé l'existence d'un découplage entre l'insertion du translocon et l'injection des effecteurs dans les cellules cibles. Le mécanisme d'injection de toxines se réaliserait donc en deux étapes bien distinctes (*Figure 66*) :

- Une première étape d'insertion du translocon dans les radeaux lipidiques des membranes ne nécessitant pas l'activation de voie de signalisation dans les cellules cibles.
- Une deuxième étape d'acquisition de la fonctionnalité du translocon nécessitant l'implication de voies de signalisation intracellulaires. Cette étape permet très probablement d'induire des changements de la conformation du pore de translocation.

Dans le cas des cellules HL-60 et U937 différenciées en VitD3, l'initiation de l'activation de voies de signalisation se situe probablement au niveau des complexes focaux dans les radeaux lipidiques. La polarisation des cellules est probablement un événement nécessaire pour induire l'injection des toxines. L'actine très représentée au niveau des adhésions focales et du leading-edge des cellules polarisées joue un rôle clé. Les kinases Pyk2, Scr et PI3K sont également nécessaires pour permettre l'injection. Aucun récepteur n'a été identifiée pour induire l'activation de ces voies de signalisation. Nous ne savons pas si la signalisation est induite par le translocon ou par un contact médié entre un récepteur cellulaire et des molécules de surface de la bactérie. Les intégrines ne semblent pas être impliqués dans l'induction de l'injection des toxines par le SST3 de *P. aeruginosa*.

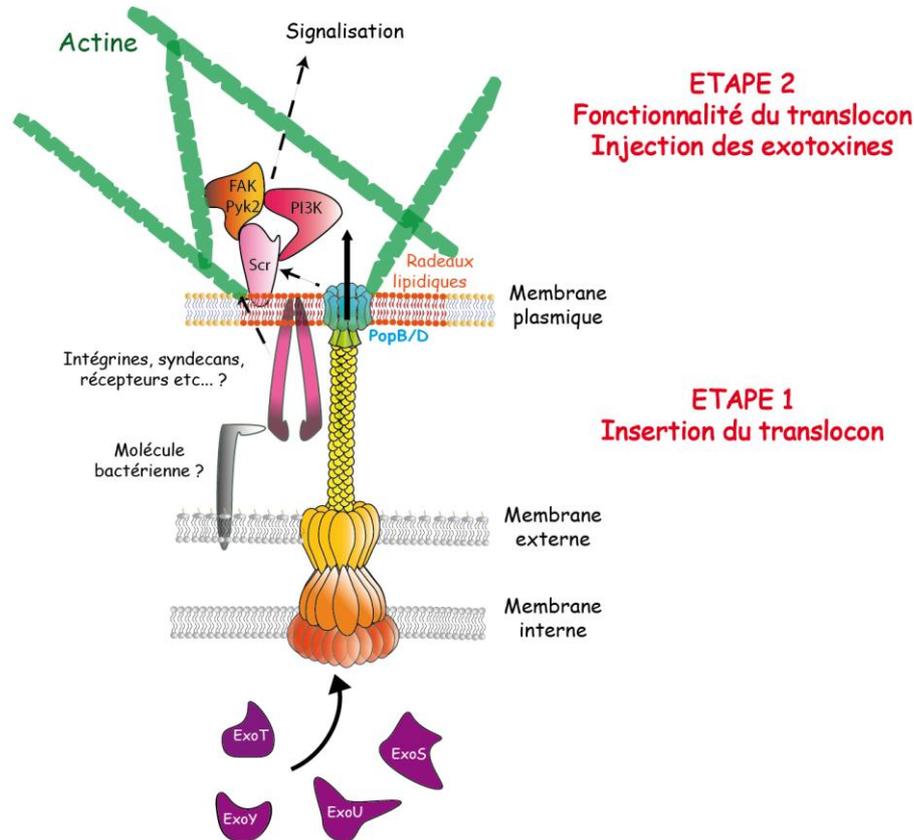


Figure 66 : Mécanisme d'injection des exotoxines par le SST3 de *P. aeruginosa* dans les cellules myéloïdes HL-60 et U937 différenciées

Les cellules HL-60 et U937 sont les seuls types cellulaires décrits pour être résistants à l'injection. Contrairement aux cellules A549, Bjab et Jurkat qui sont des lignées correspondant à des cellules différenciées, les cellules HL-60 et U937 sont des lignées provenant de progéniteurs ou précurseurs présents dans la moelle osseuse. Il est donc peu probable *in vivo* que ces cellules interagissent avec *P. aeruginosa*. Il serait intéressant d'évaluer la susceptibilité à l'injection de progéniteurs ou précurseurs humains ou murins, afin de déterminer si la résistance des cellules HL-60 ND et U937 ND est un mécanisme commun aux cellules non différenciées ou spécifique aux cellules promyéloïdes HL-60 et U937.

Des travaux récents développés chez *Y. pseudotuberculosis* montrent que les effecteurs et translocateurs seraient tout d'abord localisés à la surface des bactéries, et que, lors d'un contact avec les cellules cibles, ces effecteurs seraient alors injectés dans les cellules par le SST3 (Akopyan *et al.*, 2011). Ce mécanisme en deux étapes est donc bien différent du modèle

actuel indiquant que les toxines passeraient directement de la bactérie jusqu'au cytoplasme via l'injectisome suite au contact des bactéries avec les cellules cibles (soit un mécanisme d'injection en une seule étape). Nous ne savons pas si ce mécanisme est retrouvé chez *P. aeruginosa*.

Dans le cas de *Salmonella*, l'assemblage du translocon du SST3 de l'îlot de pathogénicité 2 (SPI-2) s'effectue dans les membranes des Vacuoles Contenant *Salmonella* (VCS) à un pH acide d'environ 5. Une fois inséré dans les membranes des VCS, le translocon est capable de détecter le pH cytosolique avoisinant les 7,2 dans les cellules cibles. Cette différence de pH est primordiale pour induire l'injection des effecteurs dans le cytoplasme des cellules cibles. Tout comme *Y. pseudotuberculosis* et *P. aeruginosa*, le mécanisme d'injection de toxines par le SST3 de *Salmonella* s'effectuerait en deux étapes. Ces expériences indiquent que le translocon subirait également des changements de conformation suite à la détection d'un pH plus élevé dans le cytoplasme des cellules cibles. L'ensemble de ces données confirme l'existence d'un mécanisme d'injection en deux étapes, mais semble différent d'une espèce à l'autre. Nos résultats n'ont donc pas expliqué l'origine de la résistance des cellules HL-60 ND à l'injection de toxines, mais ont permis d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes d'injection des effecteurs par le SST3 de *P. aeruginosa*.

La compréhension du mécanisme d'injection de toxines par le SST3 de *P. aeruginosa* passe également par l'étude de l'insertion du translocon dans les membranes. A ce stade de nos études, nous ne connaissons pas la structure globale du pore de translocation inséré dans les radeaux lipidiques (RL) des cellules HL-60 ND et HL-60 VitD3. Or, la susceptibilité à la protéolyse de PopB dans les RL des cellules HL-60 ND suggère que le translocon du SST3 de *P. aeruginosa*, tout comme celui de *Shigella*, subit très probablement des changements de conformation suite au contact avec les cellules cibles pour permettre le passage des effecteurs. L'observation du translocon par microscopie électronique permettrait de savoir si les protéines PopB et PopD forment des structures différentes (anneau ? structure fermée/ouverte ? etc...) dans les membranes des cellules HL-60 ND et HL-60 VitD3. Mais la détection du translocon dans les membranes cellulaires reste difficilement détectable du fait de la faible quantité de pores insérés et également du bruit de fond important observé sur des clichés de microscopie électronique effectués sur des membranes de cellules eucaryotes.

L'utilisation d'inhibiteurs de voies de signalisation nous a permis de montrer que l'activation des kinases Scr, PI3K et Pyk2 jouaient un rôle très important dans l'acquisition d'un pore fonctionnel pour permettre l'injection des toxines. L'utilisation d'anticorps dirigés contre ces kinases ou contre les tyrosines phosphorylés permettra de vérifier leur niveau d'expression et d'activation dans les cellules HL-60 ND et HL-60 Vit3 suite au contact avec *P. aeruginosa*. L'utilisation de l'outil ARNi serait un moyen supplémentaire intéressant pour bloquer l'expression des molécules de surfaces ou des voies de signalisations dans les cellules HL-60 VitD3. La complémentation des cellules HL-60 ND par différentes molécules exprimées uniquement dans les cellules HL-60 VitD3 telle que Pyk2 serait également intéressant pour rendre les cellules sensibles à l'injection.

La susceptibilité des cellules HL-60 VitD3 à l'injection peut être due à la présence de récepteurs qui ne seraient pas exprimés dans les cellules HL-60 ND. Cependant, la déplétion en SVF et le « panning » rendent les cellules HL-60 ND sensibles à l'injection et les inhibiteurs de la polymérisation de l'actine n'ont pas d'effet. Ces observations suggèrent que la résistance à l'injection des cellules HL-60 ND n'est pas due à l'absence d'un récepteur de surface. Il est donc possible que les mécanismes cellulaires soient complètement différents de ceux observés dans les cellules HL-60 VitD3. Le blocage des kinases Scr, PI3K et Pyk2 dans les cellules HL-60 ND incubées en absence de SVF ou traitées par « panning » permettra de savoir si les voies de signalisation intracellulaires impliquées sont les mêmes que celles identifiées dans les cellules HL-60 VitD3.

Le traitement des cellules HL-60 en absence de SVF ou le « panning » nous ont permis toutefois de montrer l'étroite corrélation entre l'adhésion des cellules et la susceptibilité à l'injection. D'après Bridge et son équipe, les bactéries injecteraient les effecteurs au niveau du leading-edge, pôle de la cellule très riche en actine. Il est donc possible que *P. aeruginosa* secrète des molécules capables d'induire la polarisation des cellules HL-60 VitD3 pour injecter ses effecteurs. L'utilisation d'inhibiteurs de la polarisation cellulaire nous permettrait dans un premier temps de répondre à cette interrogation.

Les techniques de microscopie à fluorescence peuvent être utilisées pour observer la colocalisation de souches de *P. aeruginosa* fluorescentes avec des molécules situées dans les radeaux lipidiques des cellules cibles. Cette technique permettra également de vérifier si le contact avec *P. aeruginosa* induit le recrutement des molécules impliquées dans les voies de signalisation intracellulaires telles que Pyk2, PI3K et les Scr identifiées précédemment dans les cellules HL-60 VitD3 et U937 VitD3. Dans le cas des cellules HL-60 ND polarisées

artificiellement en absence de SVF ou par « panning », il serait intéressant de vérifier sur quel pôle de la cellule *P. aeruginosa* se fixe.

La compréhension précise du mécanisme d'injection et l'identification des molécules des cellules cibles qui induisent l'injection des toxines permettra de développer de nouvelles thérapies pour combattre les infections induites par le SST3 de *P. aeruginosa*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Adam, E.C., Mitchell, B.S., Schumacher, D.U., Grant, G., and Schumacher, U. (1997). *Pseudomonas aeruginosa* II lectin stops human ciliary beating: therapeutic implications of fucose. *Am J Respir Crit Care Med* 155, 2102-2104.
- Adamo, R., Sokol, S., Soong, G., Gomez, M.I., and Prince, A. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30, 627-634.
- Aebi, C., Bracher, R., Liechti-Gallati, S., Tschappeler, H., Rudeberg, A., and Kraemer, R. (1995). The age at onset of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis--prognostic significance. *Eur J Pediatr* 154, S69-73.
- Aiello, D., Williams, J.D., Majgier-Baranowska, H., Patel, I., Peet, N.P., Huang, J., Lory, S., Bowlin, T.L., and Moir, D.T. (2010). Discovery and characterization of inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 1988-1999.
- Aili, M., Isaksson, E.L., Carlsson, S.E., Wolf-Watz, H., Rosqvist, R., and Francis, M.S. (2008). Regulation of *Yersinia* Yop-effector delivery by translocated YopE. *Int J Med Microbiol* 298, 183-192.
- Akeda, Y., and Galan, J.E. (2005). Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* 437, 911-915.
- Akopyan, K., Edgren, T., Wang-Edgren, H., Rosqvist, R., Fahlgren, A., Wolf-Watz, H., and Fallman, M. (2011). Translocation of surface-localized effectors in type III secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 1639-1644.
- Alrutz, M.A., and Isberg, R.R. (1998). Involvement of focal adhesion kinase in invasion-mediated uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13658-13663.
- Alrutz, M.A., Srivastava, A., Wong, K.W., D'Souza-Schorey, C., Tang, M., Ch'Ng, L.E., Snapper, S.B., and Isberg, R.R. (2001). Efficient uptake of *Yersinia pseudotuberculosis* via integrin receptors involves a Rac1-Arp 2/3 pathway that bypasses N-WASP function. *Mol Microbiol* 42, 689-703.
- Angus, A.A., Evans, D.J., Barbieri, J.T., and Fleiszig, S.M. (2010). The ADP-ribosylation domain of *Pseudomonas aeruginosa* ExoS is required for membrane bleb niche formation and bacterial survival within epithelial cells. *Infect Immun* 78, 4500-4510.
- Apidianakis, Y., and Rahme, L.G. (2009). *Drosophila melanogaster* as a model host for studying *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Nat Protoc* 4, 1285-1294.
- Apodaca, G., Bomsel, M., Lindstedt, R., Engel, J., Frank, D., Mostov, K.E., and Wiener-Kronish, J. (1995). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa*-induced MDCK cell injury: glycosylation-defective host cells are resistant to bacterial killing. *Infect Immun* 63, 1541-1551.

Arlehamn, C.S., Petrilli, V., Gross, O., Tschopp, J., and Evans, T.J. (2010). The role of potassium in inflammasome activation by bacteria. *J Biol Chem* 285, 10508-10518.

B

Bajmoczy, M., Gadjeva, M., Alper, S.L., Pier, G.B., and Golan, D.E. (2009). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and caveolin-1 regulate epithelial cell internalization of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol Cell Physiol* 297, C263-277.

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

Balachandran, P., Dragone, L., Garrity-Ryan, L., Lemus, A., Weiss, A., and Engel, J. (2007). The ubiquitin ligase Cbl-b limits *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin T-mediated virulence. *J Clin Invest* 117, 419-427.

Barbieri, A.M., Sha, Q., Bette-Bobillo, P., Stahl, P.D., and Vidal, M. (2001). ADP-ribosylation of Rab5 by ExoS of *Pseudomonas aeruginosa* affects endocytosis. *Infect Immun* 69, 5329-5334.

Barbieri, J.T., and Sun, J. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 152, 79-92.

Barker, A.P., Vasil, A.I., Filloux, A., Ball, G., Wilderman, P.J., and Vasil, M.L. (2004). A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Mol Microbiol* 53, 1089-1098.

Bauernfeind, F., Ablasser, A., Bartok, E., Kim, S., Schmid-Burgk, J., Cavlar, T., and Hornung, V. (2011). Inflammasomes: current understanding and open questions. *Cell Mol Life Sci* 68, 765-783.

Becker, K.A., Grassme, H., Zhang, Y., and Gulbins, E. (2010a). Ceramide in *Pseudomonas aeruginosa* infections and cystic fibrosis. *Cell Physiol Biochem* 26, 57-66.

Becker, K.A., Riethmuller, J., Luth, A., Doring, G., Kleuser, B., and Gulbins, E. (2010b). Acid sphingomyelinase inhibitors normalize pulmonary ceramide and inflammation in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42, 716-724.

Becker, K.A., Riethmuller, J., Zhang, Y., and Gulbins, E. (2010c). The role of sphingolipids and ceramide in pulmonary inflammation in cystic fibrosis. *Open Respir Med J* 4, 39-47.

Blaylock, B., Riordan, K.E., Missiakas, D.M., and Schneewind, O. (2006). Characterization of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion ATPase YscN and its regulator, YscL. *J Bacteriol* 188, 3525-3534.

Bleves, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G.P., Filloux, A., and Voulhoux, R. (2010). Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *Int J Med Microbiol* 300, 534-543.

Bliska, J.B. (2000). Yop effectors of *Yersinia spp.* and actin rearrangements. *Trends Microbiol* 8, 205-208.

Blocker, A., Komoriya, K., and 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.

Blocker, A.J., Deane, J.E., Veenendaal, A.K., Roversi, P., Hodgkinson, J.L., Johnson, S., and Lea, S.M. (2008). What's the point of the type III secretion system needle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6507-6513.

Bridge, D.R., Novotny, M.J., Moore, E.R., and Olson, J.C. (2010). Role of host cell polarity and leading edge properties in *Pseudomonas* type III secretion. *Microbiology* 156, 356-373.

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

Brodsky, I.E., Palm, N.W., Sadanand, S., Ryndak, M.B., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Bliska, J.B., and Medzhitov, R. (2010). A *Yersinia* effector protein promotes virulence by preventing inflammasome recognition of the type III secretion system. *Cell Host Microbe* 7, 376-387.

Bruce-Staskal, P.J., Weidow, C.L., Gibson, J.J., and Bouton, A.H. (2002). Cas, Fak and Pyk2 function in diverse signaling cascades to promote *Yersinia* uptake. *J Cell Sci* 115, 2689-2700.

Bruscia, E.M., Zhang, P.X., Ferreira, E., Caputo, C., Emerson, J.W., Tuck, D., Krause, D.S., and Egan, M.E. (2009). Macrophages directly contribute to the exaggerated inflammatory response in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator^{-/-} mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40, 295-304.

Brutinel, E.D., Vakulskas, C.A., Brady, K.M., and Yahr, T.L. (2008). Characterization of ExsA and of ExsA-dependent promoters required for expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol* 68, 657-671.

Bucior, I., Mostov, K., and Engel, J.N. (2010). *Pseudomonas aeruginosa*-mediated damage requires distinct receptors at the apical and basolateral surfaces of the polarized epithelium. *Infect Immun* 78, 939-953.

C

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

- Campodonico, V.L., Gadjeva, M., Paradis-Bleau, C., Uluer, A., and Pier, G.B. (2008). Airway epithelial control of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Trends Mol Med* 14, 120-133.
- Case, C.L., Shin, S., and Roy, C.R. (2009). Asc and Ipaf Inflammasomes direct distinct pathways for caspase-1 activation in response to *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 77, 1981-1991.
- Chang, J., Chen, J., and Zhou, D. (2005). Delineation and characterization of the actin nucleation and effector translocation activities of *Salmonella* SipC. *Mol Microbiol* 55, 1379-1389.
- Charpentier, X., and Oswald, E. (2004). Identification of the secretion and translocation domain of the enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector Cif, using TEM-1 beta-lactamase as a new fluorescence-based reporter. *J Bacteriol* 186, 5486-5495.
- Chemani, C., Imberty, A., de Bentzmann, S., Pierre, M., Wimmerova, M., Guery, B.P., and Faure, K. (2009). Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands. *Infect Immun* 77, 2065-2075.
- Cheung, D.O., Halsey, K., and Speert, D.P. (2000). Role of pulmonary alveolar macrophages in defense of the lung against *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 68, 4585-4592.
- Cigana, C., Curcuru, L., Leone, M.R., Ierano, T., Lore, N.I., Bianconi, I., Silipo, A., Cozzolino, F., Lanzetta, R., Molinaro, A., *et al.* (2009). *Pseudomonas aeruginosa* exploits lipid A and muropeptides modification as a strategy to lower innate immunity during cystic fibrosis lung infection. *PLoS One* 4, e8439.
- Cisz, M., Lee, P.C., and Rietsch, A. (2008). ExoS controls the cell contact-mediated switch to effector secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 190, 2726-2738.
- Coburn, J., Kane, A.V., Feig, L., and Gill, D.M. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S requires a eukaryotic protein for ADP-ribosyltransferase activity. *J Biol Chem* 266, 6438-6446.
- Collins, S.J., Gallo, R.C., and Gallagher, R.E. (1977). Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* 270, 347-349.
- Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R.E., and Gallo, R.C. (1978). Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 2458-2462.
- Comolli, J.C., Waite, L.L., Mostov, K.E., and 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. (2006). The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* 4, 811-825.

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.

Cowell, B.A., Evans, D.J., and Fleiszig, S.M. (2005). Actin cytoskeleton disruption by ExoY and its effects on *Pseudomonas aeruginosa* invasion. *FEMS Microbiol Lett* 250, 71-76.

D

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

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., Attree, I., and 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., Goure, J., Chabert, J., Usson, Y., and 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., 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.

Dasgupta, N., Ashare, A., Hunninghake, G.W., and Yahr, T.L. (2006). Transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system by low Ca²⁺ and host cell contact proceeds through two distinct signaling pathways. *Infect Immun* 74, 3334-3341.

Davis, A.J., and Meccas, J. (2007). Mutations in the *Yersinia pseudotuberculosis* type III secretion system needle protein, YscF, that specifically abrogate effector translocation into host cells. *J Bacteriol* 189, 83-97.

de Bentzmann, S., Roger, P., Dupuit, F., Bajolet-Laudinat, O., Fuchey, C., Plotkowski, M.C., and Puchelle, E. (1996). Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells. *Infect Immun* 64, 1582-1588.

Deane, J.E., Roversi, P., Cordes, F.S., Johnson, S., Kenjale, R., Daniell, S., Booy, F., Picking, W.D., Picking, W.L., Blocker, A.J., and Lea, S.M. (2006). Molecular model of a type III secretion system needle: Implications for host-cell sensing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12529-12533.

Del Porto, P., Cifani, N., Guarnieri, S., Di Domenico, E.G., Mariggio, M.A., Spadaro, F., Guglietta, S., Anile, M., Venuta, F., Quattrucci, S., and Ascenzioni, F. (2011). Dysfunctional CFTR alters the bactericidal activity of human macrophages against *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 6, e19970.

Deng, Q., Zhang, Y., and Barbieri, J.T. (2007). Intracellular trafficking of *Pseudomonas* ExoS, a type III cytotoxin. *Traffic* 8, 1331-1345.

Denning, G.M., Wollenweber, L.A., Railsback, M.A., Cox, C.D., Stoll, L.L., and Britigan, B.E. (1998). *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infect Immun* 66, 5777-5784.

Deriy, L.V., Gomez, E.A., Zhang, G., Beacham, D.W., Hopson, J.A., Gallan, A.J., Shevchenko, P.D., Bindokas, V.P., and Nelson, D.J. (2009). Disease-causing mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determine the functional responses of alveolar macrophages. *J Biol Chem* 284, 35926-35938.

Dewoody, R., Merritt, P.M., Houppert, A.S., and Marketon, M.M. (2011). YopK regulates the *Yersinia pestis* type III secretion system from within host cells. *Mol Microbiol* 79, 1445-1461.

Di, A., Brown, M.E., Deriy, L.V., Li, C., Szeto, F.L., Chen, Y., Huang, P., Tong, J., Naren, A.P., Bindokas, V., *et al.* (2006). CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat Cell Biol* 8, 933-944.

Diaz, M.H., and Hauser, A.R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU is injected into phagocytic cells during acute pneumonia. *Infect Immun* 78, 1447-1456.

Diaz, M.R., King, J.M., and Yahr, T.L. (2011). Intrinsic and Extrinsic Regulation of Type III Secretion Gene Expression in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Front Microbiol* 2, 89.

Döring, G., Pier, GB. (2008). Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine* 26, 1011-1024.

E

Eitel, J., Heise, T., Thiesen, U., and Dersch, P. (2005). Cell invasion and IL-8 production pathways initiated by YadA of *Yersinia pseudotuberculosis* require common signalling molecules (FAK, c-Src, Ras) and distinct cell factors. *Cell Microbiol* 7, 63-77.

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

Engel, J., and Eran, Y. (2011). Subversion of mucosal barrier polarity by *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 2, 114.

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

Erhardt, M., Namba, K., and Hughes, K.T. (2010). Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000299.

Ernst, R.K., Moskowitz, S.M., Emerson, J.C., Kraig, G.M., Adams, K.N., Harvey, M.D., Ramsey, B., Speert, D.P., Burns, J.L., and Miller, S.I. (2007). Unique lipid modifications in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the airways of patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 196, 1088-1092.

Esen, M., Grassme, H., Riethmuller, J., Riehle, A., Fassbender, K., and Gulbins, E. (2001). Invasion of human epithelial cells by *Pseudomonas aeruginosa* involves src-like tyrosine kinases p60Src and p59Fyn. *Infect Immun* 69, 281-287.

Espina, M., Olive, A.J., Kenjale, R., Moore, D.S., Ausar, S.F., Kaminski, R.W., Oaks, E.V., Middaugh, C.R., Picking, W.D., and Picking, W.L. (2006). IpaD localizes to the tip of the type III secretion system needle of *Shigella flexneri*. *Infect Immun* 74, 4391-4400.

Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.

Evans, D.J., Frank, D.W., Finck-Barbancon, V., Wu, C., and Fleiszig, S.M. (1998). *Pseudomonas aeruginosa* invasion and cytotoxicity are independent events, both of which involve protein tyrosine kinase activity. *Infect Immun* 66, 1453-1459.

F

Faudry, E., Vernier, G., Neumann, E., Forge, V., and Attree, I. (2006). Synergistic pore formation by type III toxin translocators of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 45, 8117-8123.

Faure, K., Sawa, T., Ajayi, T., Fujimoto, J., Moriyama, K., Shime, N., and Wiener-Kronish, J.P. (2004). TLR4 signaling is essential for survival in acute lung injury induced by virulent *Pseudomonas aeruginosa* secreting type III secretory toxins. *Respir Res* 5, 1.

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

Filloux, A. (2011). Protein Secretion Systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An Essay on Diversity, Evolution, and Function. *Front Microbiol* 2, 155.

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

Finck-Barbancon, V., Yahr, T.L., and Frank, D.W. (1998). Identification and characterization of SpcU, a chaperone required for efficient secretion of the ExoU cytotoxin. *J Bacteriol* 180, 6224-6231.

Fleck, R.A., Romero-Steiner, S., and Nahm, M.H. (2005). Use of HL-60 cell line to measure opsonic capacity of pneumococcal antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 12, 19-27.

Fleiszig, S.M., Evans, D.J., Do, N., Vallas, V., Shin, S., and Mostov, K.E. (1997). Epithelial cell polarity affects susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* invasion and cytotoxicity. *Infect Immun* 65, 2861-2867.

Fleiszig, S.M., Zaidi, T.S., and Pier, G.B. (1995). *Pseudomonas aeruginosa* invasion of and multiplication within corneal epithelial cells in vitro. *Infect Immun* 63, 4072-4077.

Franchi, L., Stoolman, J., Kanneganti, T.D., Verma, A., Ramphal, R., and Nunez, G. (2007). Critical role for Ipaf in *Pseudomonas aeruginosa*-induced caspase-1 activation. *Eur J Immunol* 37, 3030-3039.

Frank, D.W., Vallis, A., Wiener-Kronish, J.P., Roy-Burman, A., Spack, E.G., Mullaney, B.P., Meghdoud, M., Marks, J.D., Fritz, R., and Sawa, T. (2002). Generation and characterization of a protective monoclonal antibody to *Pseudomonas aeruginosa* PcrV. *J Infect Dis* 186, 64-73.

Fraylick, J.E., Rucks, E.A., Greene, D.M., Vincent, T.S., and Olson, J.C. (2002). Eukaryotic cell determination of ExoS ADP-ribosyltransferase substrate specificity. *Biochem Biophys Res Commun* 291, 91-100.

Frithz-Lindsten, E., Du, Y., Rosqvist, R., and 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.

Fu, H., Coburn, J., and 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

Gagniere, H., and Di Martino, P. (2004). $\alpha 5 \beta 1$ integrins and fibronectin are involved in adherence of the *Pseudomonas aeruginosa* ER97314 clinical strain to A549 cells. *Folia Microbiol (Praha)* 49, 757-762.

Galan, J.E., and Collmer, A. (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284, 1322-1328.

Galan, J.E., and Wolf-Watz, H. (2006). Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* 444, 567-573.

Galle, M., Schotte, P., Haegman, M., Wullaert, A., Yang, H.J., Jin, S., and Beyaert, R. (2008). The *Pseudomonas aeruginosa* Type III secretion system plays a dual role in the regulation of caspase-1 mediated IL-1 β maturation. *J Cell Mol Med* 12, 1767-1776.

- Ganesan, A.K., Vincent, T.S., Olson, J.C., and Barbieri, J.T. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S disrupts Ras-mediated signal transduction by inhibiting guanine nucleotide exchange factor-catalyzed nucleotide exchange. *J Biol Chem* 274, 21823-21829.
- Garcia, J.T., Ferracci, F., Jackson, M.W., Joseph, S.S., Pattis, I., Plano, L.R., Fischer, W., and Plano, G.V. (2006). Measurement of effector protein injection by type III and type IV secretion systems by using a 13-residue phosphorylatable glycogen synthase kinase tag. *Infect Immun* 74, 5645-5657.
- Garrity-Ryan, L., Shafikhani, S., Balachandran, P., Nguyen, L., Oza, J., Jakobsen, T., Sargent, J., Fang, X., Cordwell, S., Matthay, M.A., and Engel, J.N. (2004). The ADP ribosyltransferase domain of *Pseudomonas aeruginosa* ExoT contributes to its biological activities. *Infect Immun* 72, 546-558.
- Geiser, T.K., Kazmierczak, B.I., Garrity-Ryan, L.K., Matthay, M.A., and Engel, J.N. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* ExoT inhibits in vitro lung epithelial wound repair. *Cell Microbiol* 3, 223-236.
- Gilboa-Garber, N. (1982). *Pseudomonas aeruginosa* lectins. *Methods Enzymol* 83, 378-385.
- 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.
- Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953-964.
- Goure, J., Pastor, A., Faudry, E., Chabert, J., Dessen, A., and 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.
- Grassme, H., Jendrossek, V., Riehle, A., von Kurthy, G., Berger, J., Schwarz, H., Weller, M., Kolesnick, R., and Gulbins, E. (2003). Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nat Med* 9, 322-330.
- Grassme, H., Kirschnek, S., Riethmueller, J., Riehle, A., von Kurthy, G., Lang, F., Weller, M., and Gulbins, E. (2000). CD95/CD95 ligand interactions on epithelial cells in host defense to *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 290, 527-530.
- Grassme, H., Riehle, A., Wilker, B., and Gulbins, E. (2005). Rhinoviruses infect human epithelial cells via ceramide-enriched membrane platforms. *J Biol Chem* 280, 26256-26262.
- Green, S.K., Schroth, M.N., Cho, J.J., Kominos, S.K., and Vitanza-jack, V.B. (1974). Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol* 28, 987-991.
- Gulbins, E., Dreschers, S., Wilker, B., and Grassme, H. (2004). Ceramide, membrane rafts and infections. *J Mol Med (Berl)* 82, 357-363.
- Gupta, S.K., Berk, R.S., Masinick, S., and Hazlett, L.D. (1994). Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1. *Infect Immun* 62, 4572-4579.

Gurcel, L., Abrami, L., Girardin, S., Tschopp, J., and van der Goot, F.G. (2006). Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell* 126, 1135-1145.

H

Hajjar, A.M., Ernst, R.K., Tsai, J.H., Wilson, C.B., and Miller, S.I. (2002). Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat Immunol* 3, 354-359.

Hancock, R.E., Mutharia, L.M., Chan, L., Darveau, R.P., Speert, D.P., and 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.

Hashimoto, S., Pittet, J.F., Hong, K., Folkesson, H., Bagby, G., Kobzik, L., Frevert, C., Watanabe, K., Tsurufuji, S., and Wiener-Kronish, J. (1996). Depletion of alveolar macrophages decreases neutrophil chemotaxis to *Pseudomonas* airspace infections. *Am J Physiol* 270, L819-828.

Hauser, A.R. (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* 7, 654-665.

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

Hauser, A.R., Jain, M., Bar-Meir, M., and McColley, S.A. (2011). Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 24, 29-70.

Hayward, R.D., Cain, R.J., McGhie, E.J., Phillips, N., Garner, M.J., and Koronakis, V. (2005). Cholesterol binding by the bacterial type III translocon is essential for virulence effector delivery into mammalian cells. *Mol Microbiol* 56, 590-603.

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

Hazlett, L.D., Masinick, S., Barrett, R., and Rosol, K. (1993). Evidence for asialo GM1 as a corneal glycolipid receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adhesion. *Infect Immun* 61, 5164-5173.

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

Heck, L.W., Morihara, K., and Abrahamson, D.R. (1986a). Degradation of soluble laminin and depletion of tissue-associated basement membrane laminin by *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease. *Infect Immun* 54, 149-153.

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

Hentzer, M., Teitzel, G.M., Balzer, G.J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M., and Parsek, M.R. (2001). Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol* 183, 5395-5401.

Hilbi, H., Moss, J.E., Hersh, D., Chen, Y., Arondel, J., Banerjee, S., Flavell, R.A., Yuan, J., Sansonetti, P.J., and Zychlinsky, A. (1998). *Shigella*-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. *J Biol Chem* 273, 32895-32900.

Hirche, T.O., Benabid, R., Deslee, G., Gangloff, S., Achilefu, S., Guenounou, M., Lebargy, F., Hancock, R.E., and Belaaouaj, A. (2008). Neutrophil elastase mediates innate host protection against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Immunol* 181, 4945-4954.

Holmstrom, A., Petterson, J., Rosqvist, R., Hakansson, S., Tafazoli, F., Fallman, M., Magnusson, K.E., Wolf-Watz, H., and Forsberg, A. (1997). YopK of *Yersinia pseudotuberculosis* controls translocation of Yop effectors across the eukaryotic cell membrane. *Mol Microbiol* 24, 73-91.

Hood, R.D., Singh, P., Hsu, F., Guvener, T., Carl, M.A., Trinidad, R.R., Silverman, J.M., Ohlson, B.B., Hicks, K.G., Plemel, R.L., *et al.* (2010). A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host Microbe* 7, 25-37.

Hopken, U.E., Lu, B., Gerard, N.P., and Gerard, C. (1996). The C5a chemoattractant receptor mediates mucosal defence to infection. *Nature* 383, 86-89.

Hritonenko, V., Mun, J.J., Tam, C., Simon, N.C., Barbieri, J.T., Evans, D.J., and Fleiszig, S.M. (2011). Adenylate cyclase activity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoY can mediate bleb-niche formation in epithelial cells and contributes to virulence. *Microb Pathog* 51, 305-312.

I

Ichikawa, J.K., English, S.B., Wolfgang, M.C., Jackson, R., Butte, A.J., and Lory, S. (2005). Genome-wide analysis of host responses to the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system yields synergistic effects. *Cell Microbiol* 7, 1635-1646.

Iglewski, B.H., and Kabat, D. (1975). NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 2284-2288.

Iglewski, B.H., Sadoff, J., Bjorn, M.J., and 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.

Imundo, L., Barasch, J., Prince, A., and 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.

Isberg, R.R., and Leong, J.M. (1990). Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* 60, 861-871.

J

Jain, M., Ramirez, D., Seshadri, R., Cullina, J.F., Powers, C.A., Schulert, G.S., Bar-Meir, M., Sullivan, C.L., McColley, S.A., and Hauser, A.R. (2004). Type III secretion phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strains change during infection of individuals with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 42, 5229-5237.

Jansson, A.L., Yasmin, L., Warne, P., Downward, J., Palmer, R.H., and Hallberg, B. (2006). Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is not able to induce apoptosis when cells express activated proteins, such as Ras or protein kinase B/Akt. *Cell Microbiol* 8, 815-822.

Johnson, S., Roversi, P., Espina, M., Olive, A., Deane, J.E., Birket, S., Field, T., Picking, W.D., Blocker, A.J., Galyov, E.E., *et al.* (2007). Self-chaperoning of the type III secretion system needle tip proteins IpaD and BipD. *J Biol Chem* 282, 4035-4044.

K

Kannan, S., Audet, A., Huang, H., Chen, L.J., and Wu, M. (2008). Cholesterol-rich membrane rafts and Lyn are involved in phagocytosis during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Immunol* 180, 2396-2408.

Kannan, S., Audet, A., Knittel, J., Mullegama, S., Gao, G.F., and Wu, M. (2006). Src kinase Lyn is crucial for *Pseudomonas aeruginosa* internalization into lung cells. *Eur J Immunol* 36, 1739-1752.

Kannan, S., Huang, H., Seeger, D., Audet, A., Chen, Y., Huang, C., Gao, H., Li, S., and Wu, M. (2009). Alveolar epithelial type II cells activate alveolar macrophages and mitigate *P. aeruginosa* infection. *PLoS One* 4, e4891.

Kaufman, M.R., Jia, J., Zeng, L., Ha, U., Chow, M., and Jin, S. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* mediated apoptosis requires the ADP-ribosylating activity of exoS. *Microbiology* 146 (Pt 10), 2531-2541.

Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11, 373-384.

Kazmierczak, B.I., and Engel, J.N. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* ExoT acts in vivo as a GTPase-activating protein for RhoA, Rac1, and Cdc42. *Infect Immun* 70, 2198-2205.

Kenjale, R., Wilson, J., Zenk, S.F., Saurya, S., Picking, W.L., Picking, W.D., and Blocker, A. (2005). The needle component of the type III secretion apparatus of *Shigella* regulates the activity of the secretion apparatus. *J Biol Chem* 280, 42929-42937.

Kerem, B., Rommens, J.M., Buchanan, J.A., Markiewicz, D., Cox, T.K., Chakravarti, A., Buchwald, M., and Tsui, L.C. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245, 1073-1080.

- Kessler, E., Safrin, M., Abrams, W.R., Rosenbloom, J., and Ohman, D.E. (1997). Inhibitors and specificity of *Pseudomonas aeruginosa* LasA. *J Biol Chem* 272, 9884-9889.
- Kierbel, A., Gassama-Diagne, A., Mostov, K., and Engel, J.N. (2005). The phosphoinositol-3-kinase-protein kinase B/Akt pathway is critical for *Pseudomonas aeruginosa* strain PAK internalization. *Mol Biol Cell* 16, 2577-2585.
- Kierbel, A., Gassama-Diagne, A., Rocha, C., Radoshevich, L., Olson, J., Mostov, K., and Engel, J. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* exploits a PIP3-dependent pathway to transform apical into basolateral membrane. *J Cell Biol* 177, 21-27.
- Kim, J., Ahn, K., Min, S., Jia, J., Ha, U., Wu, D., and Jin, S. (2005). Factors triggering type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 151, 3575-3587.
- Kipnis, E., Sawa, T., and Wiener-Kronish, J. (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect* 36, 78-91.
- Knapp, T., Hare, E., Feng, L., Zlokarnik, G., and Negulescu, P. (2003). Detection of beta-lactamase reporter gene expression by flow cytometry. *Cytometry A* 51, 68-78.
- Koh, A.Y., Priebe, G.P., Ray, C., Van Rooijen, N., and Pier, G.B. (2009). Inescapable need for neutrophils as mediators of cellular innate immunity to acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infect Immun* 77, 5300-5310.
- Kon, Y., Tsukada, H., Hasegawa, T., Igarashi, K., Wada, K., Suzuki, E., Arakawa, M., and Gejyo, F. (1999). The role of *Pseudomonas aeruginosa* elastase as a potent inflammatory factor in a rat air pouch inflammation model. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25, 313-321.
- Konig, B., Vasil, M.L., and Konig, W. (1997a). Role of haemolytic and non-haemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* in interleukin-8 release from human monocytes. *J Med Microbiol* 46, 471-478.
- Konig, B., Vasil, M.L., and Konig, W. (1997b). Role of hemolytic and nonhemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* for inflammatory mediator release from human granulocytes. *Int Arch Allergy Immunol* 112, 115-124.
- Kooguchi, K., Hashimoto, S., Kobayashi, A., Kitamura, Y., Kudoh, I., Wiener-Kronish, J., and Sawa, T. (1998). Role of alveolar macrophages in initiation and regulation of inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infect Immun* 66, 3164-3169.
- Kounnas, M.Z., Morris, R.E., Thompson, M.R., FitzGerald, D.J., Strickland, D.K., and Saelinger, C.B. (1992). The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes *Pseudomonas* exotoxin A. *J Biol Chem* 267, 12420-12423.
- Krieg, D.P., Helmke, R.J., German, V.F., and Mangos, J.A. (1988). Resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to nonopsonic phagocytosis by alveolar macrophages in vitro. *Infect Immun* 56, 3173-3179.

Kulasekara, B.R., Kulasekara, H.D., Wolfgang, M.C., Stevens, L., Frank, D.W., and Lory, S. (2006). Acquisition and evolution of the *exoU* locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188, 4037-4050.

Kustermans, G., El Benna, J., Piette, J., and Legrand-Poels, S. (2005). Perturbation of actin dynamics induces NF-kappaB activation in myelomonocytic cells through an NADPH oxidase-dependent pathway. *Biochem J* 387, 531-540.

L

Lafont, F., Tran Van Nhieu, G., Hanada, K., Sansonetti, P., and 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.

Lambeth, J.D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4, 181-189.

Lau, G.W., Hassett, D.J., Ran, H., and Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med* 10, 599-606.

Laughlin, R.S., Musch, M.W., Hollbrook, C.J., Rocha, F.M., Chang, E.B., and Alverdy, J.C. (2000). The key role of *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin on experimental gut-derived sepsis. *Ann Surg* 232, 133-142.

Lavoie, E.G., Wangdi, T., and Kazmierczak, B.I. (2011). Innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Microbes Infect*.

Le Berre, R., Nguyen, S., Nowak, E., Kipnis, E., Pierre, M., Quenee, L., Ader, F., Lancel, S., Courcol, R., Guery, B.P., and Faure, K. (2011). Relative contribution of three main virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Crit Care Med* 39, 2113-2120.

Lee, K.K., Sheth, H.B., Wong, W.Y., Sherburne, R., Paranchych, W., Hodges, R.S., Lingwood, C.A., Krivan, H., and Irvin, R.T. (1994). The binding of *Pseudomonas aeruginosa* pili to glycosphingolipids is a tip-associated event involving the C-terminal region of the structural pilin subunit. *Mol Microbiol* 11, 705-713.

Lee, M.S., and Kim, Y.J. (2007). Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu Rev Biochem* 76, 447-480.

Lee, V.T., Smith, R.S., Tummeler, B., and Lory, S. (2005). Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection. *Infect Immun* 73, 1695-1705.

Leroy-Dudal, J., Gagniere, H., Cossard, E., Carreiras, F., and Di Martino, P. (2004). Role of alphavbeta5 integrins and vitronectin in *Pseudomonas aeruginosa* PAK interaction with A549 respiratory cells. *Microbes Infect* 6, 875-881.

Li, C., Wang, Y., Gao, L., Zhang, J., Shao, J., Wang, S., Feng, W., Wang, X., Li, M., and Chang, Z. (2002). Expression of toll-like receptors 2 and 4 and CD14 during differentiation of HL-60 cells induced by phorbol 12-myristate 13-acetate and 1 alpha, 25-dihydroxy-vitamin D(3). *Cell Growth Differ* 13, 27-38.

Lingwood, D., and Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327, 46-50.

Liu, J., Feng, Y., Yang, K., Li, Q., Ye, L., Han, L., and Wan, H. (2011). Early production of IL-17 protects against acute pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 61, 179-188.

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.

Lopez-Boado, Y.S., Espinola, M., Bahr, S., and Belaaouaj, A. (2004). Neutrophil serine proteinases cleave bacterial flagellin, abrogating its host response-inducing activity. *J Immunol* 172, 509-515.

Lyczak, J.B., Cannon, C.L., and Pier, G.B. (2002). Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 15, 194-222.

M

Maresso, A.W., Deng, Q., Pereckas, M.S., Wakim, B.T., and Barbieri, J.T. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* ExoS ADP-ribosyltransferase inhibits ERM phosphorylation. *Cell Microbiol* 9, 97-105.

Marra, A., and Isberg, R.R. (1997). Invasin-dependent and invasin-independent pathways for translocation of *Yersinia pseudotuberculosis* across the Peyer's patch intestinal epithelium. *Infect Immun* 65, 3412-3421.4

Martin-Belmonte, F., and Mostov, K. (2008). Regulation of cell polarity during epithelial morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 20, 227-234.

Mattei, JP., Faudry, E., Job, V., Izoré, T., Attree, I., and Dessen, A. (2010). Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon. *FEBS* 278, 414-426.

Mattick, J.S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* 56, 289-314.

McGuffie, E.M., Fraylick, J.E., Hazen-Martin, D.J., Vincent, T.S., and Olson, J.C. (1999). Differential sensitivity of human epithelial cells to *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *Infect Immun* 67, 3494-3503.

Mejia, E., Bliska, J.B., and Viboud, G.I. (2008). *Yersinia* controls type III effector delivery into host cells by modulating Rho activity. *PLoS Pathog* 4, e3.

- Menard, R., Sansonetti, P., and Parsot, C. (1994). The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD. *EMBO J* 13, 5293-5302.
- Meyer, J.M., Neely, A., Stintzi, A., Georges, C., and Holder, I.A. (1996). Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 64, 518-523.
- Miao, E.A., Andersen-Nissen, E., Warren, S.E., and Aderem, A. (2007). TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Semin Immunopathol* 29, 275-288.
- Miao, E.A., Ernst, R.K., Dors, M., Mao, D.P., and Aderem, A. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* activates caspase 1 through Ipaf. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2562-2567.
- Miao, E.A., Leaf, I.A., Treuting, P.M., Mao, D.P., Dors, M., Sarkar, A., Warren, S.E., Wewers, M.D., and Aderem, A. (2010a). Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol* 11, 1136-1142.
- Miao, E.A., Mao, D.P., Yudkovsky, N., Bonneau, R., Lorang, C.G., Warren, S.E., Leaf, I.A., and Aderem, A. (2010b). Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3076-3080.
- Miao, E.A., and Rajan, J.V. (2011). *Salmonella* and Caspase-1: A complex Interplay of Detection and Evasion. *Front Microbiol* 2, 85.
- Miao, E.A., Rajan, J.V., and Aderem, A. (2011). Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol Rev* 243, 206-214.
- Miao, E.A., and Warren, S.E. (2010). Innate immune detection of bacterial virulence factors via the NLRC4 inflammasome. *J Clin Immunol* 30, 502-506.
- Michiels, T., Wattiau, P., Bresseur, R., Ruyschaert, J.M., and Cornelis, G. (1990). Secretion of Yop proteins by *Yersinia*. *Infect Immun* 58, 2840-2849.
- Miura, Y., Tohyama, Y., Hishita, T., Lala, A., De Nardin, E., Yoshida, Y., Yamamura, H., Uchiyama, T., and Tohyama, K. (2000). Pyk2 and Syk participate in functional activation of granulocytic HL-60 cells in a different manner. *Blood* 96, 1733-1739.
- Morris, A.E., Liggitt, H.D., Hawn, T.R., and Skerrett, S.J. (2009). Role of Toll-like receptor 5 in the innate immune response to acute *P. aeruginosa* pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297, L1112-1119.
- Moss, J., Ehrmantraut, M.E., Banwart, B.D., Frank, D.W., and Barbieri, J.T. (2001). Sera from adult patients with cystic fibrosis contain antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* type III apparatus. *Infect Immun* 69, 1185-1188.
- Mota, L.J. (2006). Type III secretion gets an LcrV tip. *Trends Microbiol* 14, 197-200.
- Motin, V.L., Nakajima, R., Smirnov, G.B., and Brubaker, R.R. (1994). Passive immunity to *Yersinia* mediated by anti-recombinant V antigen and protein A-V antigen fusion peptide. *Infect Immun* 62, 4192-4201.

Mougous, J.D., Cuff, M.E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C.A., Goodman, A.L., Joachimiak, G., Ordonez, C.L., Lory, S., *et al.* (2006). A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* 312, 1526-1530.

Mounier, J., Popoff, M.R., Enninga, J., Frame, M.C., Sansonetti, P.J., and Van Nhieu, G.T. (2009). The IpaC carboxyterminal effector domain mediates Src-dependent actin polymerization during *Shigella* invasion of epithelial cells. *PLoS Pathog* 5, e1000271.

Mueller, C.A., Broz, P., Muller, S.A., Ringler, P., Erne-Brand, F., Sorg, I., Kuhn, M., Engel, A., and Cornelis, G.R. (2005). The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science* 310, 674-676.

Muller, W.A. (2011). Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. *Annu Rev Pathol* 6, 323-344.

N

Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6, 173-182.

Nedialkov, Y.A., Motin, V.L., and 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.

Nhieu, G.T., Enninga, J., Sansonetti, P., and Grompone, G. (2005). Tyrosine kinase signaling and type III effectors orchestrating *Shigella* invasion. *Curr Opin Microbiol* 8, 16-20.

O

O'Toole, G.A., and Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30, 295-304.

Ostroff, R.M., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (1990). Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 172, 5915-5923.

Ottmann, C., Yasmin, L., Weyand, M., Veessenmeyer, J.L., Diaz, M.H., Palmer, R.H., Francis, M.S., Hauser, A.R., Wittinghofer, A., and Hallberg, B. (2007). Phosphorylation-independent interaction between 14-3-3 and exoenzyme S: from structure to pathogenesis. *EMBO J* 26, 902-913.

P

Painter, R.G., Valentine, V.G., Lanson, N.A., Jr., Leidal, K., Zhang, Q., Lombard, G., Thompson, C., Viswanathan, A., Nauseef, W.M., and Wang, G. (2006). CFTR Expression in human neutrophils and the phagolysosomal chlorination defect in cystic fibrosis. *Biochemistry* 45, 10260-10269.

- Park, P.W., Pier, G.B., Hinkes, M.T., and Bernfield, M. (2001). Exploitation of syndecan-1 shedding by *Pseudomonas aeruginosa* enhances virulence. *Nature* 411, 98-102.
- Pastor, A., Chabert, J., Louwagie, M., Garin, J., and Attree, I. (2005). PscF is a major component of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion needle. *FEMS Microbiol Lett* 253, 95-101.
- Pedersen, S.S., Hoiby, N., Espersen, F., and Koch, C. (1992). Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax* 47, 6-13.
- Pedersen, S.S., Kharazmi, A., Espersen, F., and Hoiby, N. (1990). *Pseudomonas aeruginosa* alginate in cystic fibrosis sputum and the inflammatory response. *Infect Immun* 58, 3363-3368.
- Pederson, K.J., and Barbieri, J.T. (1998). Intracellular expression of the ADP-ribosyltransferase domain of *Pseudomonas* exoenzyme S is cytotoxic to eukaryotic cells. *Mol Microbiol* 30, 751-759.
- Pederson, K.J., Krall, R., Riese, M.J., and Barbieri, J.T. (2002). Intracellular localization modulates targeting of ExoS, a type III cytotoxin, to eukaryotic signalling proteins. *Mol Microbiol* 46, 1381-1390.
- 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.
- Petrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F., and Tschopp, J. (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* 14, 1583-1589.
- Pielage, J.F., Powell, K.R., Kalman, D., and Engel, J.N. (2008). RNAi screen reveals an Abl kinase-dependent host cell pathway involved in *Pseudomonas aeruginosa* internalization. *PLoS Pathog* 4, e1000031.
- Pier, G.B. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *Int J Med Microbiol* 297, 277-295.
- Pier, G.B., Grout, M., and Zaidi, T.S. (1997). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12088-12093.
- Pier, G.B., Grout, M., Zaidi, T.S., and Goldberg, J.B. (1996). How mutant CFTR may contribute to *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 154, S175-182.
- Pierre, M., Le Berre, R., Tiesset, H., Faure, K., Guery, B., Desseyn, J.L., Galabert, C., Beghin, L., Beermann, C., Gottrand, F., and Husson, M.O. (2008). Kinetics of *Pseudomonas*

aeruginosa virulence gene expression during chronic lung infection in the murine model. *Med Mal Infect* 38, 318-323.

Ple, S., Job, V., Dessen, A., and Attree, I. (2010). Cochaperone interactions in export of the type III needle component PscF of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 192, 3801-3808.

Prasain, N., Alexeyev, M., Balczon, R., and Stevens, T. (2009). Soluble adenylyl cyclase-dependent microtubule disassembly reveals a novel mechanism of endothelial cell retraction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297, L73-83.

Prince, L.R., Bianchi, S.M., Vaughan, K.M., Bewley, M.A., Marriott, H.M., Walmsley, S.R., Taylor, G.W., Buttle, D.J., Sabroe, I., Dockrell, D.H., and Whyte, M.K. (2008). Subversion of a lysosomal pathway regulating neutrophil apoptosis by a major bacterial toxin, pyocyanin. *J Immunol* 180, 3502-3511.

Q

Quinaud, M., Chabert, J., Faudry, E., Neumann, E., Lemaire, D., Pastor, A., Elsen, S., Dessen, A., and Attree, I. (2005). The PscE-PscF-PscG complex controls type III secretion needle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 280, 36293-36300.

Quinton, P.M. (1983). Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* 301, 421-422.

R

Rabin, S.D., Veessenmeyer, J.L., Bieging, K.T., and Hauser, A.R. (2006). A C-terminal domain targets the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU to the plasma membrane of host cells. *Infect Immun* 74, 2552-2561.

Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G., and Ausubel, F.M. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268, 1899-1902.

Raoust, E., Balloy, V., Garcia-Verdugo, I., Touqui, L., Ramphal, R., and Chignard, M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* LPS or flagellin are sufficient to activate TLR-dependent signaling in murine alveolar macrophages and airway epithelial cells. *PLoS One* 4, e7259.

Rebiere-Huet, J., Di Martino, P., and Hulen, C. (2004). Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to fibronectin by PA-IL and monosaccharides: involvement of a lectin-like process. *Can J Microbiol* 50, 303-312.

Reiniger, N., Lee, M.M., Coleman, F.T., Ray, C., Golan, D.E., and Pier, G.B. (2007). Resistance to *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection requires cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-modulated interleukin-1 (IL-1) release and signaling through the IL-1 receptor. *Infect Immun* 75, 1598-1608.

Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704-1709.

Rietsch, A., Vallet-Gely, I., Dove, S.L., and Mekalanos, J.J. (2005). ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8006-8011.

Rocha, C.L., Coburn, J., Rucks, E.A., and Olson, J.C. (2003). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S as a bifunctional enzyme in J774A.1 macrophages. *Infect Immun* 71, 5296-5305.

Roehrich, A.D., Martinez-Argudo, I., Johnson, S., Blocker, A.J., and Veenendaal, A.K. (2010). The extreme C terminus of *Shigella flexneri* IpaB is required for regulation of type III secretion, needle tip composition, and binding. *Infect Immun* 78, 1682-1691.

Roger, P., Puchelle, E., Bajolet-Laudinat, O., Tournier, J.M., Debordeaux, C., Plotkowski, M.C., Cohen, J.H., Sheppard, D., and de Bentzmann, S. (1999). Fibronectin and alpha5beta1 integrin mediate binding of *Pseudomonas aeruginosa* to repairing airway epithelium. *Eur Respir J* 13, 1301-1309.

Rolston, K.V., and Bodey, G.P. (1992). *Pseudomonas aeruginosa* infection in cancer patients. *Cancer Invest* 10, 43-59.

Romano, F.B., Rossi, K.C., Savva, C.G., Holzenburg, A., Clerico, E.M., and Heuck, A.P. (2011). Efficient isolation of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion translocators and assembly of heteromeric transmembrane pores in model membranes. *Biochemistry* 50, 7117-7131.

Rovera, G., Santoli, D., and Damsky, C. (1979). Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 2779-2783.

Roy-Burman, A., Savel, R.H., Racine, S., Swanson, B.L., Revadigar, N.S., Fujimoto, J., Sawa, T., Frank, D.W., and 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.

Rucks, E.A., and Olson, J.C. (2005). Characterization of an ExoS Type III translocation-resistant cell line. *Infect Immun* 73, 638-643.

Russell, A.B., Hood, R.D., Bui, N.K., LeRoux, M., Vollmer, W., and Mougous, J.D. (2011). Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature* 475, 343-347.

S

Sadikot, R.T., Blackwell, T.S., Christman, J.W., and Prince, A.S. (2005). Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 171, 1209-1223.

- Sato, H., Feix, J.B., and Frank, D.W. (2006). Identification of superoxide dismutase as a cofactor for the *Pseudomonas* type III toxin, ExoU. *Biochemistry* 45, 10368-10375.
- Sato, H., and Frank, D.W. (2004). ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Mol Microbiol* 53, 1279-1290.
- 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. *Nat Med* 5, 392-398.
- Sayner, S.L., Frank, D.W., King, J., Chen, H., VandeWaa, J., and Stevens, T. (2004). Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. *Circ Res* 95, 196-203.
- Schoehn, G., Di Guilmi, A.M., Lemaire, D., Attree, I., Weissenhorn, W., and Dessen, A. (2003). Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*. *EMBO J* 22, 4957-4967.
- Schroeder, G.N., and Hilbi, H. (2007). Cholesterol is required to trigger caspase-1 activation and macrophage apoptosis after phagosomal escape of *Shigella*. *Cell Microbiol* 9, 265-278.
- Schroeder, T.H., Reiniger, N., Meluleni, G., Grout, M., Coleman, F.T., and Pier, G.B. (2001). Transgenic cystic fibrosis mice exhibit reduced early clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the respiratory tract. *J Immunol* 166, 7410-7418.
- Seveau, S., Keller, H., Maxfield, F.R., Piller, F., and Halbwachs-Mecarelli, L. (2000). Neutrophil polarity and locomotion are associated with surface redistribution of leukosialin (CD43), an antiadhesive membrane molecule. *Blood* 95, 2462-2470.
- Shafikhani, S.H., and Engel, J. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* type III-secreted toxin ExoT inhibits host-cell division by targeting cytokinesis at multiple steps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15605-15610.
- Shafikhani, S.H., Morales, C., and Engel, J. (2008). The *Pseudomonas aeruginosa* type III secreted toxin ExoT is necessary and sufficient to induce apoptosis in epithelial cells. *Cell Microbiol* 10, 994-1007.
- Shaver, C.M., and Hauser, A.R. (2004). Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun* 72, 6969-6977.
- Shen, D.K., Saurya, S., Wagner, C., Nishioka, H., and Blocker, A.J. (2010). Domains of the *Shigella flexneri* type III secretion system IpaB protein involved in secretion regulation. *Infect Immun* 78, 4999-5010.
- Sheth, H.B., Lee, K.K., Wong, W.Y., Srivastava, G., Hindsgaul, O., Hodges, R.S., Paranchych, W., and Irvin, R.T. (1994). The pili of *Pseudomonas aeruginosa* strains PAK and PAO bind specifically to the carbohydrate sequence beta GalNAc(1-4)beta Gal found in glycosphingolipids asialo-GM1 and asialo-GM2. *Mol Microbiol* 11, 715-723.

- Shin, H., and Cornelis, G.R. (2007). Type III secretion translocation pores of *Yersinia enterocolitica* trigger maturation and release of pro-inflammatory IL-1beta. *Cell Microbiol* 9, 2893-2902.
- Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-39.
- Sing, A., Rost, D., Tvardovskaia, N., Roggenkamp, A., Wiedemann, A., Kirschning, C.J., Aepfelbacher, M., and Heesemann, J. (2002). *Yersinia* V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *J Exp Med* 196, 1017-1024.
- Skeldon, A., and Saleh, M. (2011). The inflammasomes: molecular effectors of host resistance against bacterial, viral, parasitic, and fungal infections. *Front Microbiol* 2, 15.
- Skerrett, S.J., Wilson, C.B., Liggitt, H.D., and Hajjar, A.M. (2007). Redundant Toll-like receptor signaling in the pulmonary host response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292, L312-322.
- Skoudy, A., Mounier, J., Aruffo, A., Ohayon, H., Gounon, P., Sansonetti, P., and 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.
- Sonawane, A., Jyot, J., Dusing, R., and Ramphal, R. (2006). Neutrophil elastase, an innate immunity effector molecule, represses flagellin transcription in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 74, 6682-6689.
- Stensrud, K.F., Adam, P.R., La Mar, C.D., Olive, A.J., Lushington, G.H., Sudharsan, R., Shelton, N.L., Givens, R.S., Picking, W.L., and Picking, W.D. (2008). Deoxycholate interacts with IpaD of *Shigella flexneri* in inducing the recruitment of IpaB to the type III secretion apparatus needle tip. *J Biol Chem* 283, 18646-18654.
- Stirling, F.R., Cuzick, A., Kelly, S.M., Oxley, D., and Evans, T.J. (2006). Eukaryotic localization, activation and ubiquitinylation of a bacterial type III secreted toxin. *Cell Microbiol* 8, 1294-1309.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., *et al.* (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959-964.
- Sugita, M., Yue, Y., and Foskett, J.K. (1998). CFTR Cl⁻ channel and CFTR-associated ATP channel: distinct pores regulated by common gates. *EMBO J* 17, 898-908.
- Sun, J., and Barbieri, J.T. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* ExoT ADP-ribosylates CT10 regulator of kinase (Crk) proteins. *J Biol Chem* 278, 32794-32800.
- Sun, Y.H., Rolan, H.G., and Tsolis, R.M. (2007). Injection of flagellin into the host cell cytosol by *Salmonella enterica* serotype *typhimurium*. *J Biol Chem* 282, 33897-33901.

Sundin, C., Wolfgang, M.C., Lory, S., Forsberg, A., and 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.

Sundstrom, C., and Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 17, 565-577.

Sutterwala, F.S., and Flavell, R.A. (2009). NLRC4/IPAF: a CARD carrying member of the NLR family. *Clin Immunol* 130, 2-6.

Sutterwala, F.S., Mijares, L.A., Li, L., Ogura, Y., Kazmierczak, B.I., and Flavell, R.A. (2007). Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *J Exp Med* 204, 3235-3245.

Suzuki, T., Franchi, L., Toma, C., Ashida, H., Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Mimuro, H., Inohara, N., Sasakawa, C., and Nunez, G. (2007). Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in *Shigella*-infected macrophages. *PLoS Pathog* 3, e111.

T

Takase, H., Nitani, H., Hoshino, K., and Otani, T. (2000). Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. *Infect Immun* 68, 1834-1839.

Tanaka, H., Abe, E., Miyaura, C., Shiina, Y., and Suda, T. (1983). 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ induces differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) into monocyte-macrophages, but not into granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 117, 86-92.

Tardif, M., Rabiet, M.J., Christophe, T., Milcent, M.D., and Boulay, F. (1998). Isolation and characterization of a variant HL60 cell line defective in the activation of the NADPH oxidase by phorbol myristate acetate. *J Immunol* 161, 6885-6895.

Teichgraber, V., Ulrich, M., Endlich, N., Riethmuller, J., Wilker, B., De Oliveira-Munding, C.C., van Heeckeren, A.M., Barr, M.L., von Kurthy, G., Schmid, K.W., *et al.* (2008). Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. *Nat Med* 14, 382-391.

Terada, L.S., Johansen, K.A., Nowbar, S., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect Immun* 67, 2371-2376.

Thibault, J., Faudry, E., Ebel, C., Attree, I., and Elsen, S. (2009). Anti-activator ExsD forms a 1:1 complex with ExsA to inhibit transcription of type III secretion operons. *J Biol Chem* 284, 15762-15770.

Thirumalai, K., Kim, K.S., and Zychlinsky, A. (1997). IpaB, a *Shigella flexneri* invasin, colocalizes with interleukin-1 beta-converting enzyme in the cytoplasm of macrophages. *Infect Immun* 65, 787-793.

Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., Rosenau, F., and Jaeger, K.E. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology* 151, 1313-1323.

Torruellas, J., Jackson, M.W., Pennock, J.W., and Plano, G.V. (2005). The *Yersinia pestis* type III secretion needle plays a role in the regulation of Yop secretion. *Mol Microbiol* 57, 1719-1733.

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.

Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., and Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26, 171-176.

U

Uliczka, F., Kornprobst, T., Eitel, J., Schneider, D., and Dersch, P. (2009). Cell invasion of *Yersinia pseudotuberculosis* by invasin and YadA requires protein kinase C, phospholipase C-gamma1 and Akt kinase. *Cell Microbiol* 11, 1782-1801.

Urbanowski, M.L., Brutinel, E.D., and Yahr, T.L. (2007). Translocation of ExsE into Chinese hamster ovary cells is required for transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Infect Immun* 75, 4432-4439.

Ushio-Fukai, M. (2006). Localizing NADPH oxidase-derived ROS. *Sci STKE* 2006, re8.
Vallis, A.J., Yahr, T.L., Barbieri, J.T., and Frank, D.W. (1999). Regulation of ExoS production and secretion by *Pseudomonas aeruginosa* in response to tissue culture conditions. *Infect Immun* 67, 914-920.

V

van der Goot, F.G., Tran van Nhieu, G., Allaoui, A., Sansonetti, P., and Lafont, F. (2004). Rafts can trigger contact-mediated secretion of bacterial effectors via a lipid-based mechanism. *J Biol Chem* 279, 47792-47798.

Vance, R.E., Rietsch, A., and Mekalanos, J.J. (2005). Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in vivo. *Infect Immun* 73, 1706-1713.

Veenendaal, A.K., Hodgkinson, J.L., Schwarzer, L., Stabat, D., Zenk, S.F., and Blocker, A.J. (2007). The type III secretion system needle tip complex mediates host cell sensing and translocon insertion. *Mol Microbiol* 63, 1719-1730.

Veesenmeyer, J.L., Howell, H., Halavaty, A.S., Ahrens, S., Anderson, W.F., and Hauser, A.R. (2010). Role of the membrane localization domain of the *Pseudomonas aeruginosa* effector protein ExoU in cytotoxicity. *Infect Immun* 78, 3346-3357.

Viboud, G.I., and Bliska, J.B. (2001). A bacterial type III secretion system inhibits actin polymerization to prevent pore formation in host cell membranes. *EMBO J* 20, 5373-5382.

Viboud, G.I., and Bliska, J.B. (2002). Measurement of pore formation by contact-dependent type III protein secretion systems. *Methods Enzymol* 358, 345-350.

Viboud, G.I., So, S.S., Ryndak, M.B., and 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.

W

Wang, L., Learoyd, J., Duan, Y., Leff, A.R., and Zhu, X. (2010). Hematopoietic Pyk2 regulates migration of differentiated HL-60 cells. *J Inflamm (Lond)* 7, 26.

Wangdi, T., Mijares, L.A., and Kazmierczak, B.I. (2010). In vivo discrimination of type 3 secretion system-positive and -negative *Pseudomonas aeruginosa* via a caspase-1-dependent pathway. *Infect Immun* 78, 4744-4753.

Watarai, M., Funato, S., and Sasakawa, C. (1996). Interaction of Ipa proteins of *Shigella flexneri* with alpha5beta1 integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells. *J Exp Med* 183, 991-999.

Weidow, C.L., Black, D.S., Bliska, J.B., and Bouton, A.H. (2000). CAS/Crk signalling mediates uptake of *Yersinia* into human epithelial cells. *Cell Microbiol* 2, 549-560.

White, S.L., Belov, L., Barber, N., Hodgkin, P.D., and Christopherson, R.I. (2005). Immunophenotypic changes induced on human HL60 leukaemia cells by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Leuk Res* 29, 1141-1151.

Wick, M.J., Frank, D.W., Storey, D.G., and Iglewski, B.H. (1990). Structure, function, and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Annu Rev Microbiol* 44, 335-363.

Wilcox-Adelman, S.A., Denhez, F., and Goetinck, P.F. (2002). Syndecan-4 modulates focal adhesion kinase phosphorylation. *J Biol Chem* 277, 32970-32977.

Williams, B.J., Dehnbostel, J., and Blackwell, T.S. (2010). *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. *Respirology* 15, 1037-1056.

Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., and Halbwachs-Mecarelli, L. (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80, 617-653.

Wolfgang, M.C., Jyot, J., Goodman, A.L., Ramphal, R., and Lory, S. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid from cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6664-6668.

Wurtele, M., Wolf, E., Pederson, K.J., Buchwald, G., Ahmadian, M.R., Barbieri, J.T., and Wittinghofer, A. (2001). How the *Pseudomonas aeruginosa* ExoS toxin downregulates Rac. *Nat Struct Biol* 8, 23-26.

Wysocki, L.J., and Sato, V.L. (1978). "Panning" for lymphocytes: a method for cell selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 2844-2848.

Y

Yahr, T.L., Goranson, J., and Frank, D.W. (1996). Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway. *Mol Microbiol* 22, 991-1003.

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 U S A* 95, 13899-13904.

Yoshihara, K., Tsuyuki, M., Itaya, A., Tanaka, Y., and Kamiya, T. (1994). 3-aminobenzamide, a potent inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase, causes a rapid death of HL-60 cells cultured in serum-free medium. *Mol Cell Biochem* 135, 143-151.

Z

Zaidi, T., Bajmoczy, M., Golan, D.E., and Pier, G.B. (2008). Disruption of CFTR-dependent lipid rafts reduces bacterial levels and corneal disease in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 1000-1009.

Zhang, Y., and Barbieri, J.T. (2005). A leucine-rich motif targets *Pseudomonas aeruginosa* ExoS within mammalian cells. *Infect Immun* 73, 7938-7945.

Zhang, Y., Deng, Q., and Barbieri, J.T. (2007a). Intracellular localization of type III-delivered *Pseudomonas* ExoS with endosome vesicles. *J Biol Chem* 282, 13022-13032.

Zhang, Y., Deng, Q., Porath, J.A., Williams, C.L., Pederson-Gulrud, K.J., and Barbieri, J.T. (2007b). Plasma membrane localization affects the RhoGAP specificity of *Pseudomonas* ExoS. *Cell Microbiol* 9, 2192-2201.

Zhang, Y., Li, X., Carpinteiro, A., and Gulbins, E. (2008). Acid sphingomyelinase amplifies redox signaling in *Pseudomonas aeruginosa*-induced macrophage apoptosis. *J Immunol* 181, 4247-4254.

Zhang, Y., Li, X., Grassme, H., Doring, G., and Gulbins, E. (2010). Alterations in ceramide concentration and pH determine the release of reactive oxygen species by Cftr-deficient macrophages on infection. *J Immunol* 184, 5104-5111.

Zlokarnik, G. (2000). Fusions to beta-lactamase as a reporter for gene expression in live mammalian cells. *Methods Enzymol* 326, 221-244.

Zlokarnik, G., Negulescu, P.A., Knapp, T.E., Mere, L., Burres, N., Feng, L., Whitney, M., Roemer, K., and Tsien, R.Y. (1998). Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with beta-lactamase as reporter. *Science* 279, 84-88.

ARTICLE ACCEPTE

Injection of *Pseudomonas aeruginosa* Exo toxins into host cells can be modulated by host factors at the level of translocon assembly and/or activity

Julien Verove†^{1,2,3,4}, Cédric Bernarde ‡^{1,2,3,4}, Yu-Sing Tammy Bohn^{1,2,3,4}, François Boulay,^{1,2,3,4} Marie-Josèphe Rabiet ^{1,2,3,4}, Ina Attree^{1,2,3,4} and François Cretin^{1,2,3,4**}

¹INSERM, U1036, Biology of Cancer and Infection, F-38054, Grenoble, France. ²CNRS, ERL 5261, Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses, F-38054, Grenoble, France. ³Université Joseph Fourier-Grenoble I, F-38041, Grenoble, France. ⁴CEA, DSV/iRTSV, F-38054, Grenoble, France.

‡ contributed equally to this work

** Corresponding author : BCI, "Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses", iRTSV, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 09. E-mail: francois.cretin@cea.fr

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa type III secretion apparatus exports and translocates four exotoxins into the cytoplasm of the host cell. The translocation requires two hydrophobic bacterial proteins, PopB and PopD, that are found associated with host cell membranes following infection. In this work we examined the influence of host cell elements on exotoxin translocation efficiency. We developed a quantitative flow cytometry based assay of translocation that used protein fusions between either ExoS or ExoY and the β -lactamase reporter enzyme. In parallel, association of translocon proteins with host plasma membranes was evaluated by immunodetection of PopB/D following sucrose gradient fractionation of membranes. A pro-myelocytic cell line (HL-60) and a pro-monocytic cell line (U937) were found resistant to toxin injection even though PopB/D associated with host cell plasma membranes. Differentiation of these cells to either macrophage- or neutrophil-like cell lines resulted in injection-sensitive phenotype without significantly changing the level of membrane-inserted translocon proteins. As previous *in vitro* studies have indicated that the lysis of liposomes by PopB and PopD requires both cholesterol and phosphatidyl-serine, we first examined the role of cholesterol in translocation efficiency. Treatment of sensitive HL-60 cells with methyl- β -cyclodextrine, a cholesterol-depleting agent, resulted in a diminished injection of ExoS-Bla. Moreover, the PopB translocator was found in the membrane fraction, obtained from sucrose-gradient purifications, containing the lipid-raft marker flotillin. Examination of components of signalling pathways influencing the toxin injection was further assayed through a pharmacological approach. A systematic detection of translocon proteins within host membranes showed that, in addition to membrane composition, some general signalling pathways involved in actin polymerization may be critical for the formation of a functional pore. In conclusion, we provide new insights in regulation of translocation process and suggest possible cross-talks between eukaryotic cell and the pathogen at the level of exotoxin translocation.

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is a major Gram negative, opportunistic human pathogen associated with a variety of acute and chronic diseases. The bacterium can invade different tissues including respiratory and urinary tracts, damaged and burned skin, or injured cornea [1]. Patients with genetic disorder leading to cystic fibrosis are especially susceptible to chronic *P. aeruginosa* infection, which in turn contributes to morbidity and increased mortality. In the last decades, *P. aeruginosa* infections became a serious health problem as these bacteria are becoming multi-resistant to most existing antimicrobial treatments [2].

Pseudomonas aeruginosa is especially well equipped with numerous pathogenic mechanisms contributing to its virulence. Among six secretion systems found in Gram negative bacteria, *P. aeruginosa* possesses five of them, and some in several copies [3]. Type III secretion (T3S) machinery, conserved in a variety of Gram negative pathogens, is dedicated to export and translocation directly into eukaryotic cell cytoplasm of four exotoxins (ExoS, ExoT, ExoY and ExoU) [4]. These macromolecules have dramatic effects on signal transduction pathways and actin cytoskeleton, leading to cell dysfunction and, in some cases, cell mortality [5]. The passage of the exotoxins across the three membranes is performed by a complex nanostructure composed of at least twenty distinct proteins that associate in three sub-assemblies. The basal body, called the secreton, is spanning the two bacterial membranes by several superposed ring-like homo-oligomers [6]. Protruding outwards and in continuum with the basal body, the so-called T3S needle is composed of one protein, PscF in *P. aeruginosa*, that polymerizes on the bacterial surface to form a uniform 8-nm-wide channel supposed to be a conduit for exported substrates [7]. The first proteins proposed to be exported through the needle are PcrV, PopB and PopD, playing an essential role in toxin translocation across the plasma membrane of target cell [8,9]. As a majority of T3S substrates, the three translocators are kept in bacterial cytoplasm in complexes with their cognate chaperons, PcrG for PcrV, and PcrH shared by PopB and PopD [10,11,12,13]. PcrV

belongs to a family of surface-exposed, soluble antigens, some of them shown to oligomerize on the secretion needle extremity [14,15,16,17]. The essential role of PcrV in T3S function is clearly linked to insertion into the host membrane of two hydrophobic translocators, PopB and PopD [15,18]. In all T3SS studied to date, the largest translocator (in *P. aeruginosa*, PopB) harbours two putative transmembrane domains, while the smallest protein (PopD) belongs to a subfamily of translocators possessing only one transmembrane domain [9,11,19]. After infection of erythrocytes, PopB and PopD remain associated with the plasma membrane, while the PcrV translocator stays bacteria-associated [15,18]. Both translocators purified *in vitro*, bind to phosphatidylserine-charged liposomes and are capable of inducing the release of small-molecular weight substances [20]. Moreover, liposomes charged with cholesterol are particularly vulnerable and are disrupted in the presence of the translocator PopB [19] indicating the translocon preference for specific lipid environments. The translocator SipB of *Salmonella* has been shown to directly interact with cholesterol [21] and *Shigella* homologue IpaD binds to a lipid raft-associated eukaryotic protein CD44 [22]; in both cases cholesterol was shown to be required for efficient bacterial invasion of host cell [22,23]. A regulation of the translocation process itself has been suggested for *P. aeruginosa* and *Yersinia* systems, where a translocated effector provides a feedback control by modulating an activity of yet-unknown host cell factor [8,24]. Hence, the GTPase Activating Protein (GAP) domain of the effector YopE is essential for controlling *Yersinia* translocation efficiency probably by acting on actin cytoskeleton [25]. Recently, a unique *Yersinia* protein, YopK/YopQ, has been identified as playing an independent role in controlling YopB/D translocon function once being itself translocated into cells [26]. Furthermore, *P. aeruginosa* and *Yersinia* spp. T3SS show some host specificities both *in vivo* and *in vitro* [27,28,29], which might result from the differential expression of host components required for full T3S function. In this context HL-60 cells was the first cell line identified as non-permissive to ExoS intoxication [27]. In order to study the translocon function in *P. aeruginosa*-cellular infection model, we set up a

quantitative effector translocation assay that relies on a β -lactamase activity fused downstream of inactive ExoS or ExoY N-terminal domains. After infection, the activity of the reporter injected in cells was measured by flow-cytometry. The presence of Pop translocator proteins within host membranes was correlated with data on the translocation of reporter protein. This approach allowed us to demonstrate that insertion of translocators into membranes can occur without efficient effector translocation, as exemplified in T3S-resistant cells, HL-60 and U937. We showed that cholesterol-depleting agent methyl- β -cyclodextrine, as well as several inhibitors of eukaryotic signal transduction pathways, inhibits the translocation of the reporters without affecting expression, export and association of Pop proteins with host cell membranes. These results further corroborate the idea that host-pathogen cross-talk is particularly important in T3S function and may influence the efficiency of effector injection.

RESULTS

We showed previously that the activity of T3S translocon of *P. aeruginosa* can be modulated *in vitro* by lipid content and pH [19,20]. To analyse the translocon activity *in vivo*, we adapted a reporter system based on Bla/CCF2 enzyme/substrate combination [29] to *P. aeruginosa* T3SS. This system enables single-cell reproducible quantification of exotoxin translocation into host cells using a flow-cytometry based analysis.

ExoS-Bla is an adequate reporter for measuring the T3S translocation efficiency.

The ExoS-Bla fusion was constructed so that its expression is directed by a cognate *exoS* promoter and the secretion and translocation of the fusion is achieved by the N-terminal ExoS sequences, in which the GTPase activating protein (GAP) activity was inactivated by the R146A mutation (see Materials and Methods). In-frame fusion with β -lactamase was introduced in the different *P. aeruginosa* strains. The secretion of the fusion was evaluated by probing culture supernatants. As shown by

immunoblotting using anti-ExoS antibodies (**Figure 1A**), the ExoS-Bla fusion was efficiently secreted from the wild-type *P. aeruginosa* strain CHA upon the induction of the system *in vitro* by Ca^{2+} depletion of the medium. The secretion of ExoS-Bla in the medium was strictly dependent on the functional T3SS needle composed by polymerized PscF. Translocon mutants, CHA Δ PopB/D and CHA Δ PcrV secreted ExoS-Bla but they were unable to inject the chimeric toxin in host cell cytoplasm (**Figure 1B**). To obtain maximal ExoS-Bla secretion, the endogenous *exoS* gene was deleted, so that no competition for the cognate chaperon and/or for other secretion components would influence full ExoS-Bla export. The translocation of ExoS-Bla was first tested on the epithelial cell line A549. After incubation of cells with different strains harbouring the fusion, the cells were incubated with β -lactamase fluorescent substrate CCF2-AM and analysed by fluorescence microscopy. In parallel, the quantification was done by flow-cytometry based assay (**Figure 1B**). The CCF2 cleavage accomplished by a translocated fusion induces the disruption of FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) and provokes a shift from green to blue fluorescence. While uninfected cells or cells infected with CHA Δ PopB/D showed only a low mean fluorescence intensity (MFI) of about 3, the MFI reached a value of 16 when cells were co-incubated with the CHA Δ S/ExoS-Bla strain (**Figure 1B**). Consistent with a competition between ExoS-Bla and endogenous ExoS observed *in vitro* (**Figure 1A**), the MFI observed with the strain CHA-SBla was 2.3 fold lower than that observed with CHA Δ S-SBla (MFI 6.8 versus 16, respectively). The translocation efficiency was in the same range when using the CHA Δ S-SBla strain (MFI 16) or the widely used PAO1 strain (MFI 14.5) deleted of all three exotoxins (PAO1 Δ STY, [31]) (**Figure 1B**). Consequently, all the following experiments were performed either with CHA Δ S or PAO1 Δ STY strains. As observed in **Figure 1B**, the second reporter, ExoY-Bla, behaved as ExoS-Bla. Both reporters were translocated with the same efficiency in A549 cells infected with PAO1 Δ STY-YBla and PAO1 Δ STY-SBla (MFI 13.5 vs 14.5).

Undifferentiated pro-myelocytic HL-60 and pro-monocytic U937 cell lines are resistant to T3S translocation.

We then examined the translocation of ExoS-Bla in several eukaryotic cell types, including epithelial cell line A549, two lymphoid cell lines Jurkat and BJAB, as well as the pro-myelocytic HL-60 and the pro-monocytic U937 cell lines. As quantified by flow cytometry, epithelial and lymphoid cell lines were found sensitive to ExoS-Bla injection with about 80% of cells being injected at 3 h post-infection using a multiplicity of infection (MOI) of 10 (**Figure 2A**). In contrast, undifferentiated HL-60 and U937 cell lines were found refractory to ExoS-Bla and ExoY-Bla injection (**Figure 2B**). The inability to detect ExoS- or ExoY-Bla into resistant cells was not due to an artefact of inhibition or degradation of β -lactamase or to an inefficient loading of the CCF2 β -lactamase substrate, since a HL-60 cell line that stably expressed β -lactamase efficiently cleaved CCF2 (Data not shown). We then differentiated HL-60 cells into either neutrophil-like cells with dimethyl-sulfoxide (DMSO), macrophage-like cells with Phorbol Myristate Acetate (PMA) or monocyte-like cells with 1,25 dihydroxy-Vitamin D3 (VD3), as described in Materials and Methods. The differentiation state was assayed by following the expression of the macrophage/monocyte antigen, CD11b on cell surface by flow cytometry (**Figure 2C**). Interestingly, all three ways of differentiation provoked reversal from resistant to susceptible phenotype, albeit the injection of ExoS-Bla was significantly lower with macrophage-like cells (**Figure 2A**). These results corroborate previous observation showing that undifferentiated HL-60 cells are resistant to intoxication by ExoS [27] and identify a novel cell line (U937) showing a similar phenotype. The two undifferentiated cell lines were found to be resistant to injection of ExoY-Bla fusion, whereas differentiated cells were readily injected following infection (**Figure 2B**). Therefore, the resistance of pro-myelocytic and pro-monocytic cells is not limited to ExoS sequences, but could be linked to the general translocation process itself.

Translocon insertion into HL-60 membranes is independent of cell differentiation.

The absence of injection of ExoS-Bla and ExoY-Bla fusions within undifferentiated pro-myelocytic or pro-monocytic cell lines after infection was not due to a lack of secretion of the reporters (**Figure 5C, lane "IPa"**), but could be due to the absence of translocon insertion. In *P. aeruginosa*, as well as in *Yersinia*, two hydrophobic translocators, PopB/YopB and PopD/YopD, insert into erythrocytes plasma membranes and could be detected by specific antibodies following cell fractionation by centrifugation on sucrose gradients [15,18]. In these experiments, the hydrophilic translocators, PcrV/LcrV, are not associated with membranes and are used as a negative control for membrane purifications [15,18]. To get further insights into the function of the translocon, we first examined the presence of Pop proteins in membranes derived from either injection resistant or injection permissive cells (i.e. undifferentiated HL-60 versus differentiated HL-60 cells, referred to as VD3-dHL-60 cells). To do so, infected host cell membranes were submitted to fractionation by centrifugation on sucrose gradients [30]. As expected, immunoblotting analysis of the different fractions revealed that PopB and PopD were readily inserted in the plasma membrane of permissive cells (**Figure 3A**). Both proteins were also found associated with membranes of non-permissive, undifferentiated HL-60 cells, suggesting that the defect of ExoS and ExoY translocation was not due to the absence of translocator proteins within the host cell membranes (**Figure 3A**). Similarly, PopB was recovered in the membranes from infected U937 cells independently of the differentiation status (data not shown). To ascertain that the detection of PopB/D was not resulting from a contamination of the membranes by bacteria, we first analysed samples of purified membranes for the presence of PcrV. As shown in **Figure 3A**, no PcrV protein could be detected by immunoblotting in the membrane prepared from infected HL-60 cells. This lack of detection is not due to the anti-PcrV antibody as evidenced by the detection of PcrV either in the supernatant of *P. aeruginosa* (**Figure 3C lane "Pa sup."**) or as a His-tagged recombinant protein (**Figure 3C lane "PcrV"**). To further confirm that the presence of PopB/D in the membrane preparation was not due to residual bacteria, we used an antibody specific for bacterial RNA polymerase

subunit A (RpoA). This antibody allowed the detection of as few as $2 \cdot 10^5$ bacteria, i.e. 0.04 % of the bacterial input used to infect cells. As illustrated in **Figure 3B**, only trace amounts of RpoA and PopB were detected in bacteria lysates corresponding to an input of $2 \cdot 10^5$ bacteria (**lanes 4 and 6**). After infection of HL-60 cells, RpoA was hardly detectable in plasma membranes purified on sucrose gradient (**lanes 1 and 2**), whereas huge amounts of PopB were associated with membrane from undifferentiated HL-60 (**lane 1**) and VD3-dHL-60 cells (**lane 2**). This strongly suggests that the recovery of PopB/D results from the specific insertion of translocon in cell membranes and not from contaminating bacteria attached to infected cells. Altogether our results show that even though the injection of effectors occurs only in differentiated cells, the association of PopB/D translocators to membranes occurs equally well in both non-permissive and permissive cells. This suggests the implication of host components in translocon assembly and/or functionality.

ExoS-Bla translocation occurs at the level of lipid rafts.

In vitro, *P. aeruginosa* translocators PopB and PopD efficiently disrupt artificial membranes (liposomes) only in presence of cholesterol [19], which is one of the host cell lipid components required for *Shigella* IpaB and *Salmonella* SipB translocator function [21,23]. Moreover, cholesterol-rich membrane microdomains have been implicated in invasion of *P. aeruginosa* [31]. To investigate the role of cholesterol in exotoxin translocation, we treated permissive HL-60 cells with methyl- β -cyclodextrine (Me β CD) and measured the level of ExoS-Bla injection. As shown in **Figure 4A**, the injection of ExoS-Bla was inhibited by Me β CD in a dose-dependent manner, reaching 50% of inhibition at 3 mM concentration. Higher concentrations of Me β CD induced cell mortality and were not taken into account. Of note, Me α CD, an inactive isomer of Me β DC, used at concentrations up to 20 mM, had no influence on ExoS-Bla injection. As cholesterol is the major building block of specialized glycolipoprotein micro-domains known as lipid rafts or detergent-resistant

membranes (DRM), we specifically purified DRM from infected cells by ultracentrifugation on sucrose gradients following treatment with Triton X-100 at 4°C (see Materials and Methods), and the collected fractions were analysed for the presence of translocators. As shown on **Figure 4B**, in the case of infected VD3-dHL-60 cells, a portion of PopB was found preferentially associated with lipid rafts as it co-fractionated with flotillin, an eukaryotic lipid raft marker. Using the same protocol to purify lipid rafts from the injection resistant non-differentiated HL-60 cells, we systematically detected a truncated PopB protein (PopB*) that co-fractionated with flotillin. PopB was shortened by approximately 6 kDa, in spite of the addition of several cocktails of protease inhibitors. Thus, although PopB was recovered in both cases in the cholesterol rich membranes, it is differentially susceptible to proteolytic cleavage.

Alteration of translocation efficiency by inhibitors of eukaryotic signalling pathways.

In order to decipher more in detail the eukaryotic elements and signalling pathways that influence the PopB/D translocon activity, a series of inhibitors were tested for their ability to impair the injection of ExoS-Bla within permissive VD3-dHL-60 cells by flow cytometry. None of the inhibitors had an effect on β -lactamase activity itself, as verified by using a HL-60 cell line stably expressing β -lactamase (not shown) or on T3SS dependent Exo-SBla secretion as shown in **Figure 5C**.

It is known that the level of cholesterol alters the viscoelastic properties of the plasma membrane and, thereby, regulates the actin-mediated deformation of the plasma membrane at the leading edge of moving cells [32]. We therefore examined whether the injection of ExoS-Bla required a functional actin network by treating cells during infection with two compounds affecting actin dynamics, cytochalasin D and latrunculin B [33]. At concentrations that did not alter cell viability, bacterial growth and T3SS dependent secretion *in vitro*, both molecules totally inhibited ExoS-Bla translocation (**Figure 5A**). As F-actin polymerization is under the control of the Rho

family GTPases, we examined the translocation efficiency after treatment with inhibitors that directly target these GTPases or their effectors. In our hands, the translocation of ExoS-Bla was not impaired either by the cell permeable TAT-C3 toxin that targets RhoA, B and C or by the pharmacological compound Y-27632, an inhibitor of ROCK (Rho-controlled protein kinase). These two inhibitors had an inhibitory or a stimulatory action, respectively, on the ability of differentiated HL-60 cells to migrate through a 3 μm pore membrane to a source of chemoattractants (**Figure S1**). Thus, although they were unable to perturb ExoS-Bla injection, these two inhibitors of the Rho-dependent pathway were readily active.

Because the conversion of phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate into PtdIns(3,4,5)P₃ by PI3-kinase promotes the actin-dependent uptake of *Yersinia pseudotuberculosis* [34,35], *Listeria monocytogenes* [36], and *P. aeruginosa* [37], we tested two specific PI3-kinase inhibitors, wortmannin and LY-294002. As illustrated in **Figure 5A**, both compounds inhibited the translocation of ExoS-Bla. To investigate whether tyrosine kinases play any role in the functionality of the *P. aeruginosa* T3SS, several inhibitors were tested. ExoS-Bla injection into VD3-dHL-60 was abolished by genistein, a large spectrum tyrosine kinase inhibitor, by PP2, an inhibitor of the Src-kinase(s), and by PF-5732208, an inhibitor of focal adhesion tyrosine kinases, FAK and Pyk2 (**Figure 5A**). Most of the compounds showed a dose-dependent inhibition (**Figure S2**).

All the inhibitors that led to alteration in ExoS-Bla translocation were tested for their absence of effect on the association of PopB translocator with host cell membranes by applying sucrose-gradient fractionation. As shown in the **Figure 5B**, the association of PopB translocator with membranes of VD3-dHL-60 cells was not impeded when cells were treated with the different inhibitors. Thus, the insertion of the translocon proteins can be uncoupled from the translocation process *per se*.

A recent study by Bridge *et al.* suggests that the insertion of translocators into host cell plasma membrane requires cell adhesion and formation of leading edge [38]. Using two different approaches, we investigated whether adhesion of

undifferentiated HL-60 cells could promote the translocation of ExoS-Bla. Cell adhesion was induced by transferring cells for a short period of time in culture medium devoid of foetal calf serum (FCS). Alternatively, cells were anchored in the presence of FCS on tissue culture plates previously coated with a monoclonal antibody specific for CD43, a cell-surface sialoglycoprotein highly expressed on HL-60 cells. As illustrated in **Figure 6**, both approaches yielded HL-60 cells that had rapidly switched from a translocation-resistant to a translocation-sensitive phenotype. In the presence of FCS, HL-60 cells originally resistant to ExoS-Bla translocation became sensitive when seeded in tissue culture plates pre-treated with anti CD43. Judging from the markedly reduced level of injected cells following the transfer of anti CD43-anchored cells in a well devoid of antibody (**Figure 6, part b**), it is clear that this acquired sensitivity was totally reversible and strictly dependent on cell immobilization on the tissue culture plate. To determine whether this acquired sensitivity to ExoS-Bla injection involved the same molecular mechanism as that used in VD3-dHL-60 cells, we tested the effects produced by cytochalasin D (**Figure 6, part c**). Surprisingly, cytochalasin D that did alter the injection of ExoS-Bla in VD3-dHL-60 cells, was unable to inhibit the injection of ExoS-Bla in cells immobilized through binding to anti CD43. Thus, the regulation of the functionality of T3S translocon appears to be divergent in VD3-dHL-60 cells and non-differentiated HL-60 cells that are turned on to be permissive to injection.

Altogether, our results show that the injection of exotoxins into the cytoplasm of VD3-dHL-60 cells is dependent on the integrity of the actin network and regulated by the level of cholesterol and the activation of host cell signalling pathways.

DISCUSSION

Within the sophisticated and complex T3S secretion machinery, the exact function and structure of translocator proteins is still a great mystery. It is believed that the T3S nano-machinery results from the complex assembly of proteins that form a continuum between the bacterium and the host cell membrane. Bacterial toxins are

believed to reach the host cell cytoplasm after translocator proteins have formed a functional pore [39,40,41]. However, this microinjection model has recently been challenged as secreted effector proteins (extracellular) of *Yersinia pseudotuberculosis* were shown to be translocated in a T3SS-dependent mechanism [42]. In order to dissect translocon function *in vivo*, we adapted to the *P. aeruginosa* T3SS a simple translocation reporter system, which was first developed for *E. coli*, *L. pneumophila*, *Y. pestis* and *P. aeruginosa* T3SS [26,29,43,44,45] and is based on the activity of β -lactamase that cleaves a fluorescent substrate. In brief, the β -lactamase was fused downstream of the N-terminal region of *P. aeruginosa* ExoS or ExoY toxins, which were both deprived of their enzymatic activities. The resulting chimeric proteins ExoS-Bla and ExoY-Bla were efficiently translocated into several cell lines such as the epithelial cell line A549, the B cell line BJAB, the T cell line Jurkat, and the differentiated promyelocytic HL-60 and promonocytic U937 cells as assessed by fluorescent microscopy and quantitative measurements using flow cytometry. When infection was performed with undifferentiated HL-60 or U937 cells, no injection of the reporter fusion could be observed.

The use of *P. aeruginosa* strains deprived of either ExoS (CHA Δ S) or of the three ExoS, T and Y exoenzymes (PAO1 Δ STY) allowed a better intoxication of cells with ExoS-Bla or ExoY-Bla due to the absence of competition between the native exotoxins and the reporter fusion proteins for the access to the translocation machinery. Furthermore, the reporters ExoS-Bla or ExoY-Bla were engineered to remove the GAP and the adenylate cyclase activity, respectively, which excludes the possible implication of the reporter in the regulation of translocon activity and diversion of host cell signalling pathways.

To investigate whether host cell components play a role in the regulation of the general translocation process, we examined in parallel both the translocation efficiency and the presence of translocators PopB/D within plasma membranes of infected cells. PopB and PopD of *P. aeruginosa* are absolutely required for exotoxin injection into host cell cytoplasm without having any effects on effector secretion

[18]. Both proteins possess predicted hydrophobic transmembrane helices and are prone to associate with lipids, both *in vitro* [19,20] and *in vivo* [18]. Interestingly, in the present study, the observation that PopB and PopD are found associated with the membranes of injection-resistant and injection-sensitive cell lines suggests that the pore assembly and/or functionality may be regulated by host cell factors. The resistance of HL-60 cells to intoxication by exotoxins was recently correlated with the incapacity of bacterial cells to stably insert translocon proteins in the plasma membrane of non differentiated cells [38]. In our hands, immunoblotting analysis of plasma membrane purified on sucrose gradient did not reveal any degradation of either PopB or PopD whether cells were differentiated or not. However, PopB was found to be sensitive to proteolysis exclusively during the purification of specific membrane lipid rafts from the plasma membrane of non differentiated cells. The proteolysis of PopB may be due to an improper insertion in the plasma membrane of non differentiated HL-60 cells and, thereby, to an increased accessibility to proteases. There is still little structural information on PopB/D proteins [9], probably due to their hydrophobic characteristics, molten globule conformation and/or oligomerization capacity [12,19]. PopB shares secondary fold with its *Salmonella* orthologue SipB, for which exhaustive proteolysis experiments showed that it is deeply inserted into lipid bilayer, with the N-terminal region being exposed and cleaved off [46]. Indeed, *in vitro* studies have shown that PopB possesses a high pore forming activity whereas PopD activity is barely detectable and they do not associate with liposomes with the same efficiency [20].

Several parameters are likely to play a role in translocon assembly and/or functionality. It is known that an increase in cholesterol-to-phospholipid ratio enhances plasma membrane microviscosity in a large variety of cells [47]. Conversely, the chelation of cholesterol decreases the plasma membrane microviscosity and, thereby, redistributes proteins sequestered in specialized rafts to different regions of the plasma membrane. In the present study, we show that depletion of cholesterol from lipid rafts by methyl- β -cyclodextrin abolished the

translocation of the reporter ExoS-Bla in a dose-dependent manner. Co-localisation of PopB with the lipid raft marker flotillin in fractions of sucrose gradient is further supporting the role of lipid rafts in the translocation process. This is consistent with a previous study indicating that cholesterol is required for lysis of liposomes in presence of PopB [19]. Furthermore, specific membrane microdomains have been already involved in *Salmonella*- and *Shigella*-host cell interactions [21,23]. Cholesterol accumulation results in increased membrane stiffness which could permit the formation of an actin network at the leading edge, an area recently proposed as the site of interaction between *P. aeruginosa* and differentiated HL-60 cells [38].

The actin network appears to play a major role in the translocation process in the VD3-HL-60 model as evidenced by the action of cytochalasin D and latrunculin B, two actin-depolymerizing agents which were found to markedly inhibit the injection of ExoS-Bla. It is worth noting that the effect of latrunculin B is much more pronounced in differentiated myeloid cells than in epithelial cells such as HT29 [38]. Unexpectedly, we were unable to observe any effect of either TAT-C3, or Y-27632, an inhibitor of ROCK, even though these inhibitors did enter into the cells and had a physiological effect as evidenced by their capacity to perturb the migration of VD3-HL-60 cells to a source of chemoattractants. Thus, the Rho-dependent pathway is unlikely to play a role in the formation of a functional pore. We could not conclude whether it is the integrity of the actin network rather than its dynamics that is the key parameter for translocon insertion and/or functionality.

In the VD3-dHL-60 model, the injection of ExoS-Bla is dramatically impaired when tyrosine kinases and PI3-kinase are pharmacologically inhibited. This observation is contrasting with the lack of effect reported by Bridge and coworkers with the epithelial HT29 model [38] or with lung-derived A549 epithelial cells (our unpublished data). In the context of VD3-dHL-60 cells, it is not known whether the functionality of the PopB/D pore depends on the basal activity of specific host cell signalling pathways or relies on the triggering of an “outside-in” signal underneath the site of bacterial attachment. In the case of *Yersinia enterocolitica*, Pyk2 and FAK, two

tyrosine kinases localized in focal adhesion complexes, are required for invasin-mediated signalling through β 1-integrin [48]. The mechanism involved in the interaction between *P. aeruginosa* and VD3-dHL-60 is still unknown. Although a recent study suggests that β -integrins are unlikely candidates since blocking antibodies directed to β 1 or β 2 integrins does not affect T3SS-mediated toxin injection [38], it is clear in our hands that the inhibition of FAK or Pyk2 markedly reduce the injection of the reporter.

Several recent reports on other pathogens harbouring T3SS suggest that the translocon proteins *per se* may be involved in host-pathogen cross-talk and signalling. The insertion of the translocation YopB/D pore into plasma membrane by *Y. enterocolitica* triggers maturation and release of pro-inflammatory cytokine IL-1 β , through the specific activation of caspase-1 [49]. A pathogenic strain of *Y. pseudotuberculosis*, depleted on all known T3SS-dependent effectors but possessing a functional translocon, activates cytosolic innate immune signalling through the activation of NF- κ B and type I IFN-induced pathways [50]. *P. aeruginosa* devoid of effectors was shown to activate the NLRC4 inflammasome [51,52,53]. A direct role in translocation regulation was recently attributed to *Yersinia pestis* YopK/YopQ [26]. However, although a majority of components participating in assembly of T3S apparatus are highly conserved between *Yersinia* and *P. aeruginosa*, no homologue of YopK could be identified in *P. aeruginosa* genome, suggesting that there are alternative mechanisms to regulate translocation efficiency. In the case of SPI-2 T3SS of *Salmonella*, a pH modification was recently reported to play a key role in effector translocation and pore formation [54]. In a recent study, Cisz and coworkers [8] have shown that the functionality of T3SS required an unknown ExoS-inhibited host cell factor that may trigger either translocon insertion or stabilisation. We showed here that this may also occur without the participation of any (known) effector protein.

An important finding is that undifferentiated HL-60 cells that exhibit a resistant phenotype to T3SS-mediated toxin injection become rapidly susceptible to intoxication upon foetal calf serum depletion and adhesion to the culture plate or

after panning in wells coated with anti-CD43. It is worth noting that the permissive HL-60 cells lose this acquired phenotype in the course of the infection step when they are transferred in naive wells devoid of anti-CD43. In this case the lack of toxin injection in undifferentiated HL-60 cells is not due to a defect in the expression of a specific gene. The mechanism underlying the T3SS-dependent toxin injection in anti-CD43 anchored cells may be different from that involved in VD3-dHL-60 cells. Indeed, while the injection process is fully inhibited in VD3-dHL-60 by agents that depolymerize the actin network, i.e. cytochalasin D and latrunculin B, the injection of ExoS-Bla in anti-CD43 treated cells was hardly inhibited by the same agents. A recent study by Bridge and coworkers establish a relationship between *P. aeruginosa* T3SS translocon function and the formation of a leading edge. Based on this model, we hypothesize that, as soon as anti-CD43 binds to CD43, non differentiated HL-60 cells reorganize their actin cytoskeleton, redistribute plasma membrane proteins into discrete domains and, subsequently, acquire a polarity. This notion is consistent with the fact that CD43 is a transmembrane glycoprotein known to concentrate at the uropod raft in activated polarized neutrophils [55] and T-cells [56]. The plasma membrane organization may orient the site of bacterial attachment and subsequently downstream signalling events that control pore formation.

Altogether, our results show that host cell components, such as cholesterol, actin cytoskeleton network and signal transduction pathways can modulate the injection of exotoxins into eukaryotic cytoplasm. The resistance to injection does not result from the absence of translocon insertion into host membranes. Therefore, the translocon activity and/or its proper assembly require multiple components of eukaryotic cell for efficient toxin translocation.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmid construction and analysis of proteins secretion. *P. aeruginosa* strains used in this study was cystic fibrosis clinical isolate CHA and its

isogenic mutants CHA Δ PscF [7] CHA Δ PopBD [18]. For Δ *exoS* construction, the *exoS* gene and the flanking sequences were amplified by oligonucleotides ExoSss1 5'ggcccaggatcggcttgcaa and ExoSas2 5'gatccgctgccgagccaaga using DNA from the CHA strain as template. The PCR fragment of 1.8 kb was blunt-ligated into pEX100T [57]. The Gm cassette was extracted from pUCPGm [58] and inserted into pEX-ExoS. Inactivated copy of the *exoS* gene was introduced into CHA chromosome by allelic exchange as described [57]. CHA Δ ExoS mutant was checked by PCR and Western blotting. PAO1 depleted for the three exotoxins ExoS, ExoT and ExoY was kindly provided by Arne Rietsch [8,59]. The *popBD* deletion was introduced into PAO1 Δ STY strain by double recombination procedure using the pJG5 plasmid as described [18]. The promoter region of *exoS* and the GAP-encoding part of the gene was PCR-amplified with primers pExoS1 5'ggatccactgcaggctgagtac and exoSXba 5'tctagacatcacttcggcgtcactgtg. The PCR product was cloned into pBluescript SK(+) and checked by sequencing. The fragment was excised by *Bam*HI-*Xba*I digestion and cloned into pUCP20 [58], giving pExoS_{GAP}. The *bla* gene was amplified from pBR322 with primers β lacXba 5'tctagacaccagaaacgctggtgaaag and β lacHind 5'aagctttttaccaatgcttaatcagtgaggcaccta, cloned as *Xba*I-*Hind*III into pExoS_{GAP} to give pExoS_{GAP}Bla. The R146 mutation was introduced into pExoS_{GAP}Bla by site-directed mutagenesis (Stratagene). The *exoY-bla* construction was created by PCR using pYEcos 5' gaattccgccgctcgccgagggtg and YXbaas 5'tctagaggcgggtcatcgccagcccg which amplify 300 nucleotides upstream and 633 nt downstream of the ATG start codon of *exoY*, thus ending up just in front of the Asp₂₁₂ codon known to be required for adenylate cyclase activity. The *exoY* PCR product was cloned in pBlunt-TOPO (Invitrogen) and sequenced, before cloning into pExoS-Bla in replacement of *exoS* sequence. The final plasmids were introduced into different *P. aeruginosa* strains by transformation [60]. For analysis of extracellular proteins, *P. aeruginosa* strains were grown to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 1 in LB medium supplemented with 5 mM EGTA and 20 mM MgCl₂.

Cell culture and incubation with *P. aeruginosa*. Promyelocytic cells HL-60, U937, Jurkat T cells, Bjab B cells and A549 epithelial cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA) were cultured in RPMI 1640 with 2.0 mM L-Glutamine (Gibco) containing 10% FCS (Gibco), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Gibco). Cells were maintained in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. For infection, cells were washed once with complete RPMI medium without antibiotic and seeded in 24-well tissue culture plates (Falcon) at 10⁶ cells/ml in complete RPMI medium without antibiotic. *P. aeruginosa* strains were grown overnight at 37°C in LB containing 300 µg/ml of carbenicillin when needed, diluted the next day to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.1 in the same medium and grown to OD₆₀₀ of 1. The multiplicity of infection ranged from 10 to 50 and, infection was performed for 3h in 5% CO₂ at 37°C.

Differentiation of myeloid cells. Cell differentiation into monocytes, macrophages and neutrophils was done by re-suspending the cells at 2.10⁵ cells/ml in complete RPMI culture medium containing 100 nM of 1,23 dihydroxy-Vitamin D3 (Sigma Chemical Co.) for 4 days, 5 ng/ml Phorbol Myristate Acetate (Sigma Chemical Co.) for 2 days and 1.25% DMSO (from Sigma Chemical Co.) for 5 days, respectively. Cell differentiation was assessed before each experiment by CD11b expression analysis using FITC conjugated antibody (IOTest®; Beckman Coulter) and flow cytometric analysis (FACScalibur).

Panning conditions. 24-well plate was incubated overnight in the presence of CD43 monoclonal antibody (clone L60, BD Pharmingen) at 1 µg/ml in PBS. After removing of the antibody solution and after three washes with PBS, the HL-60 cells were added in wells. The infection conditions were as described above.

CCF2/AM loading and β-lactamase detection. After 3h of infection, cells were incubated with freshly prepared 6xCCF2/AM solution (1 µM final concentration; Invitrogen). HL-60, Jurkat and Bjab cells were incubated for 30 min in the dark at room temperature. A549 cells were incubated 90 min in a 2 µM CCF2-AM in PBS.

The percentage of cells that received reporter fusions was quantified by flow cytometry (FACS Moflo; Dako Cytomation). The results are expressed as percentage of cells that exhibit a blue fluorescence; uninfected cells incubated with CCF2 were used as negative control. Fluorescence micrographs were performed with a Cell-R inverted Olympus microscope using 20 × objective.

CD11b expression by FACS analysis. $5 \cdot 10^5$ non-differentiated or differentiated HL-60 cells were labelled with saturating amount of FITC conjugated monoclonal antibody specific for CD11b (clone Bear1). Labelled cells were acquired on FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson).

Treatment of cells by inhibitors. Prior to and during infection, cells were exposed to either 10 μ M of cytochalasin D, 10 μ M of latrunculin B or 50 nM of Wortmannin (Sigma Chemical Co.) for 30 min, at 37°C. Cells were also exposed to either 100 μ M of ROCK inhibitor Y-27632, 2.5 nM of Toxin B from *Clostridium difficile* (Sigma Chemical Co), 2 μ M of TAT-C3 toxin from *Clostridium botulinum* (Cytoskeleton), 10 μ M of PP2, 10 μ M of PF-573-228 (Calbiochem), 100 μ M of LY-294002 (Sigma Chemical Co) or 12 μ M of Genistein (Sigma Chemical Co) for 120 min prior to and during infection in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. For methyl- β -cyclodextrine (Me β CD) treatment, HL-60 cells were grown in RPMI supplemented with 1% Nutridoma-SP (Roche) to diminish cholesterol concentration of the medium. Then, cells were treated with 1, 2 or 3 mM Me β CD (Sigma) for 2 h before infection at 37°C in RPMI supplemented with 1% Nutridoma-SP and for 3h during infection. The cell viability was controlled by Trypan Blue exclusion.

Preparation of plasma membranes by sucrose discontinuous gradient centrifugations. Eukaryotic plasma membranes were purified after infection using a previously described procedure [30]. Briefly, $60 \cdot 10^6$ HL60 cells at a density of 10^6 cells/ml were infected during 3 h at MOI 50 in RPMI supplemented with 10% FCS. Cells were then washed 3 times in cold PBS, and finally resuspended in 900 μ l of cold buffer A containing 3 mM imidazole, 250 mM sucrose, 0.5 mM EDTA and proteases

inhibitors cocktail (PIC, final concentration of 1/100 v/v, P8340 SIGMA), pH 7.4. All steps were performed at 4°C. Cells were lysed by 40 passages through a 25-gauge needle. Lysates were centrifuged 15 min at 850 g, and 750 µl of supernatant were homogenized with 1.5 ml of buffer containing 3 mM imidazole, 63% sucrose and PIC, and placed into ultra-clear centrifuge tubes (Beckman Coulter). One ml of buffer containing 3 mM imidazole, 40% sucrose and PIC was gently added and subsequently recovered with 1 ml buffer A. Samples were centrifuged 16 h at 15000 g in a SW50.1 rotor from Beckman Coulter. Then, the top 1.75 ml were gently harvested, homogenized with 875 µl cold PBS containing PIC, and centrifuged 30 min at 166000 g (rotor TLA110, Beckman Coulter). Pellet was harvested in 100 µl cold PBS containing PIC, and protein concentration determined with Bradford Reagent (Sigma-Aldrich). Thus, the same quantities of proteins for each sample were processed for immunoblotting.

Detergent resistant membrane (DRM) extraction. After infection, all steps were conducted at 4°C. After infection of $1.8 \cdot 10^8$ HL-60 cells (MOI 50 for 3 h and a density of 10^6 cells/ml), infected cells were washed once with cold RPMI and lysed in 1.5 ml MBS (25 mM MES, 150 mM NaCl, pH 6.5) containing 1% Triton X-100, 1/100 PIC, and 1 mM benzamidine (B6506, Sigma-Aldrich). Detergent treated membranes were centrifuged for 10 min at 3220 g and supernatant was homogenized with 2 ml of MBS containing 85% sucrose into an ultracentrifuge tube, and further covered with 6.3 ml of MBS containing 35% sucrose and 2 ml of MBS containing 5% sucrose. Each sucrose solution contained PIC and 1 mM benzamidine. Samples were centrifuged at 260000 g for 18 h at 4°C in a Beckman Coulter SW41 rotor. DRM-containing fractions were harvested at 35% sucrose / 5% sucrose interface, diluted with 1.4 ml MBS containing 1/100 PIC and 1 mM benzamidine, and centrifuged at 376000 g for 30 min. Pellet was recovered with 100 µl MBS containing PIC and 1 mM benzamidine, and protein content was determined with Bradford Reagent.

Immunoblotting analysis. Following sucrose gradients, equal quantities of protein (determined by Bradford method), were subjected to 12% SDS-PAGE, and further

transferred to nitrocellulose membrane. For antibody calibrations, purified proteins 6His-PcrV, PopB and PopD [16,19] were diluted in PBS buffer and 0.3 ng of each was loaded on the same gel. The antibodies were previously described [18]. They were affinity-purified and used at the following dilutions: anti-PopB (1:5000), anti-PopD (1:3000) anti-PcrV (1:3000). Mouse monoclonal anti-RpoA was purchased from Neoclone Biotechnology and used at 1:1000 dilution. Rabbit polyclonal anti-flotillin-2 (Santa Cruz Biotechnology) and mouse monoclonal anti-NTAL (Santa Cruz Biotechnology) were used at 1:200 dilution. ECL™ anti-Rabbit or anti-mouse IgG HRP conjugated secondary antibodies (GE Healthcare) were used at 1:5000 dilutions. The membrane was developed by ECL kit (GE Healthcare).

Chemotaxis assay. The chemotaxis assay has been previously described [61]. In brief, VD3-differentiated HL-60 cells were centrifuged, resuspended in fresh complete RPMI 1640 medium at the density of 10^6 cells/ml and incubated overnight with 5 nM of 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindolcarbocyanine perchlorate (Molecular probes, Eugene, OR). Cells were then centrifuged and washed once with complete medium and twice with the chemotaxis buffer (RPMI 1640 supplemented with 5% heat inactivated foetal calf serum). Cells at a density of 10^6 cells/ml were preincubated, for 2h at 37°C, in the chemotaxis buffer in the presence of either the vehicle (50% glycerol in phosphate buffered saline) or the inhibitors, including TAT-C3 (0,33µM), a cell permeable toxin targeting RhoA, B, and C, or 100 µM of the pharmacological compound Y27632, an inhibitor of ROCK. One hundred µl of cells (10^5 cells) treated or not with inhibitors were loaded into the upper chamber of FluoroBlok inserts of 3 µm pore size (Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France). Five hundred µl of a 10-fold dilution of *P. aeruginosa* culture supernatant were placed in the lower chambers and the FluoroBlok inserts were incubated at 37°C, for 4 h. Migrating cells dropped from the filters to the bottom of the lower chamber were counted in five fields (magnification X100) using an inverted fluorescence LEICA DMIER2 microscope Three independent set of experiments were performed and

results are presented as the percentage of cells migrating through the filter in control chambers , i.e. without inhibitors.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Arne Rietsch for providing *P. aeruginosa* PAO1 strains. The authors thank V. Collin for help with flow cytometry experiments, S. Bouillot for assistance with fluorescence microscopy, L. Macari for cloning of *exoY* and *exoS* and M. Ragno for providing purified PopB, PopD and PcrV. The authors thank all members of the PB&RC team for helpful discussions.

REFERENCES

1. Engel J, Balachandran P (2009) Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol* 12: 61-66.
2. Peterson LR (2009) Bad bugs, no drugs: no ESCAPE revisited. *Clin Infect Dis* 49: 992-993.
3. Bleves S, Viarre V, Salacha R, Michel GP, Filloux A, et al. (2010) Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *Int J Med Microbiol* 300: 534-543.
4. Hauser AR (2009) The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* 7: 654-665.
5. Aktories K, Barbieri JT (2005) Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nat Rev Microbiol* 3: 397-410.
6. Cornelis GR (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* 4: 811-825.
7. Pastor A, Chabert J, Louwagie M, Garin J, Attree I (2005) PscF is a major component of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion needle. *FEMS Microbiol Lett* 253: 95-101.
8. Cisz M, Lee PC, Rietsch A (2008) ExoS controls the cell contact-mediated switch to effector secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 190: 2726-2738.
9. Mattei PJ, Faudry E, Job V, Izore T, Attree I, et al. (2011) Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon. *FEBS J* 278: 414-426.
10. Nanao M, Ricard-Blum S, Di Guilmi AM, Lemaire D, Lascoux D, et al. (2003) Type III secretion proteins PcrV and PcrG from *Pseudomonas aeruginosa* form a 1:1 complex through high affinity interactions. *BMC Microbiol* 3: 21.
11. Job V, Mattei PJ, Lemaire D, Attree I, Dessen A (2010) Structural basis of chaperone recognition of type III secretion system minor translocator proteins. *J Biol Chem* 285: 23224-23232.
12. Faudry E, Job V, Dessen A, Attree I, Forge V (2007) Type III secretion system translocator has a molten globule conformation both in its free and chaperone-bound forms. *FEBS J* 274: 3601-3610.
13. Allmond LR, Karaca TJ, Nguyen VN, Nguyen T, Wiener-Kronish JP, et al. (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.
14. Mueller CA, Broz P, Cornelis GR (2008) The type III secretion system tip complex and translocon. *Mol Microbiol* 68: 1085-1095.
 15. Goure J, Broz P, Attree O, Cornelis GR, Attree I (2005) Protective anti-V antibodies inhibit *Pseudomonas* and *Yersinia* translocon assembly within host membranes. *J Infect Dis* 192: 218-225.
 16. Gebus C, Faudry E, Bohn YS, Elsen S, Attree I (2008) Oligomerization of PcrV and LcrV, protective antigens of *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia pestis*. *J Biol Chem* 283: 23940-23949.
 17. Broz P, Mueller CA, Muller SA, Philippsen A, Sorg I, et al. (2007) Function and molecular architecture of the *Yersinia* injectisome tip complex. *Mol Microbiol* 65: 1311-1320.
 18. Goure J, Pastor A, Faudry E, Chabert J, Dessen A, et al. (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.
 19. Schoehn G, Di Guilmi AM, Lemaire D, Attree I, Weissenhorn W, et al. (2003) Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*. *EMBO J* 22: 4957-4967.
 20. Faudry E, Vernier G, Neumann E, Forge V, Attree I (2006) Synergistic pore formation by type III toxin translocators of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 45: 8117-8123.
 21. Hayward RD, Cain RJ, McGhie EJ, Phillips N, Garner MJ, et al. (2005) Cholesterol binding by the bacterial type III translocon is essential for virulence effector delivery into mammalian cells. *Mol Microbiol* 56: 590-603.
 22. Skoudy A, Mounier J, Aruffo A, Ohayon H, Gounon P, et al. (2000) CD44 binds to the *Shigella* IpaB protein and participates in bacterial invasion of epithelial cells. *Cell Microbiol* 2: 19-33.
 23. Lafont F, Tran Van Nhieu G, Hanada K, Sansonetti P, van der Goot FG (2002) Initial steps of *Shigella* infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44-IpaB interaction. *EMBO J* 21: 4449-4457.
 24. Aili M, Isaksson EL, Carlsson SE, Wolf-Watz H, Rosqvist R, et al. (2008) Regulation of *Yersinia* Yop-effector delivery by translocated YopE. *Int J Med Microbiol* 298: 183-192.
 25. Mejia E, Bliska JB, Viboud GI (2008) *Yersinia* controls type III effector delivery into host cells by modulating Rho activity. *PLoS Pathog* 4: e3.
 26. Dewoody R, Merritt PM, Houppert AS, Marketon MM (2011) YopK regulates the *Yersinia pestis* type III secretion system from within host cells. *Mol Microbiol* 79: 1445-1461.
 27. Rucks EA, Olson JC (2005) Characterization of an ExoS Type III translocation-resistant cell line. *Infect Immun* 73: 638-643.
 28. McGuffie EM, Fraylick JE, Hazen-Martin DJ, Vincent TS, Olson JC (1999) Differential sensitivity of human epithelial cells to *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *Infect Immun* 67: 3494-3503.
 29. Marketon MM, DePaolo RW, DeBord KL, Jabri B, Schneewind O (2005) Plague bacteria target immune cells during infection. *Science* 309: 1739-1741.
 30. Roehrich AD, Martinez-Argudo I, Johnson S, Blocker AJ, Veenendaal AK (2010) The extreme C terminus of *Shigella flexneri* IpaB is required for regulation of type III secretion, needle tip composition, and binding. *Infect Immun* 78: 1682-1691.

31. Grassme H, Jendrossek V, Riehle A, von Kurthy G, Berger J, et al. (2003) Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nat Med* 9: 322-330.
32. Manes S, Martinez AC (2004) Cholesterol domains regulate the actin cytoskeleton at the leading edge of moving cells. *Trends Cell Biol* 14: 275-278.
33. Fenteany G, Zhu S (2003) Small-molecule inhibitors of actin dynamics and cell motility. *Curr Top Med Chem* 3: 593-616.
34. Eitel J, Heise T, Thiesen U, Dersch P (2005) Cell invasion and IL-8 production pathways initiated by YadA of *Yersinia pseudotuberculosis* require common signalling molecules (FAK, c-Src, Ras) and distinct cell factors. *Cell Microbiol* 7: 63-77.
35. Uliczka F, Kornprobst T, Eitel J, Schneider D, Dersch P (2009) Cell invasion of *Yersinia pseudotuberculosis* by invasin and YadA requires protein kinase C, phospholipase C-gamma1 and Akt kinase. *Cell Microbiol* 11: 1782-1801.
36. Ireton K, Payraastre B, Chap H, Ogawa W, Sakaue H, et al. (1996) A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science* 274: 780-782.
37. Kierbel A, Gassama-Diagne A, Mostov K, Engel JN (2005) The phosphoinositol-3-kinase-protein kinase B/Akt pathway is critical for *Pseudomonas aeruginosa* strain PAK internalization. *Mol Biol Cell* 16: 2577-2585.
38. Bridge DR, Novotny MJ, Moore ER, Olson JC (2010) Role of host cell polarity and leading edge properties in *Pseudomonas* type III secretion. *Microbiology* 156: 356-373.
39. Hakansson S, Bergman T, Vanooteghem JC, Cornelis G, Wolf-Watz H (1993) YopB and YopD constitute a novel class of *Yersinia* Yop proteins. *Infect Immun* 61: 71-80.
40. Hakansson S, Schesser K, Persson C, Galyov EE, Rosqvist R, et al. (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.
41. Neyt C, Cornelis GR (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.
42. Akopyan K, Edgren T, Wang-Edgren H, Rosqvist R, Fahlgren A, et al. (2011) Translocation of surface-localized effectors in type III secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 1639-1644.
43. Charpentier X, Oswald E (2004) Identification of the secretion and translocation domain of the enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector Cif, using TEM-1 beta-lactamase as a new fluorescence-based reporter. *J Bacteriol* 186: 5486-5495.
44. Diaz MH, Hauser AR (2010) *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU is injected into phagocytic cells during acute pneumonia. *Infect Immun* 78: 1447-1456.
45. Charpentier X, Gabay JE, Reyes M, Zhu JW, Weiss A, et al. (2009) Chemical genetics reveals bacterial and host cell functions critical for type IV effector translocation by *Legionella pneumophila*. *PLoS Pathog* 5: e1000501.
46. McGhie EJ, Hume PJ, Hayward RD, Torres J, Koronakis V (2002) Topology of the *Salmonella* invasion protein SipB in a model bilayer. *Mol Microbiol* 44: 1309-1321.
47. Vasanji A, Ghosh PK, Graham LM, Eppell SJ, Fox PL (2004) Polarization of plasma membrane microviscosity during endothelial cell migration. *Dev Cell* 6: 29-41.
48. Hudson KJ, Bliska JB, Bouton AH (2005) Distinct mechanisms of integrin binding by *Yersinia pseudotuberculosis* adhesins determine the phagocytic response of host macrophages. *Cell Microbiol* 7: 1474-1489.

49. Shin H, Cornelis GR (2007) Type III secretion translocation pores of *Yersinia enterocolitica* trigger maturation and release of pro-inflammatory IL-1 β . *Cell Microbiol* 9: 2893-2902.
50. Auerbuch V, Golenbock DT, Isberg RR (2009) Innate immune recognition of *Yersinia pseudotuberculosis* type III secretion. *PLoS Pathog* 5: e1000686.
51. Franchi L, Stoolman J, Kanneganti TD, Verma A, Ramphal R, et al. (2007) Critical role for Ipaf in *Pseudomonas aeruginosa*-induced caspase-1 activation. *Eur J Immunol* 37: 3030-3039.
52. Miao EA, Ernst RK, Dors M, Mao DP, Aderem A (2008) *Pseudomonas aeruginosa* activates caspase 1 through Ipaf. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 2562-2567.
53. Sutterwala FS, Mijares LA, Li L, Ogura Y, Kazmierczak BI, et al. (2007) Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *J Exp Med* 204: 3235-3245.
54. Yu XJ, McGourty K, Liu M, Unsworth KE, Holden DW (2010) pH sensing by intracellular *Salmonella* induces effector translocation. *Science* 328: 1040-1043.
55. Seveau S, Eddy RJ, Maxfield FR, Pierini LM (2001) Cytoskeleton-dependent membrane domain segregation during neutrophil polarization. *Mol Biol Cell* 12: 3550-3562.
56. Gomez-Mouton C, Abad JL, Mira E, Lacalle RA, Gallardo E, et al. (2001) Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9642-9647.
57. Schweizer HP (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.
58. Schweizer HP (1991) *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19. *Gene* 97: 109-121.
59. Vance RE, Rietsch A, Mekalanos JJ (2005) Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in vivo. *Infect Immun* 73: 1706-1713.
60. Chuanchuen R, Narasaki CT, Schweizer HP (2002) Benchtop and microcentrifuge preparation of *Pseudomonas aeruginosa* competent cells. *Biotechniques* 33: 760, 762-763.
61. Christophe T, Karlsson A, Dugave C, Rabiet MJ, Boulay F, et al. (2001) The synthetic peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH₂ specifically activates neutrophils through FPRL1/lipoxin A4 receptors and is an agonist for the orphan monocyte-expressed chemoattractant receptor FPRL2. *J Biol Chem* 276: 21585-21593.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Characterization of ExoS-Bla and ExoY-Bla reporters. **A/** Secretion profiles of *P. aeruginosa* strains carrying the reporter fusion ExoS-Bla. Fifteen μ L of culture supernatants of either wild-type CHA strain or mutant CHA strains expressing ExoS-Bla grown under T3SS-inducing conditions were analyzed by immunoblotting with antibodies directed against ExoS, PopB, PopD and PcrV. **B/** Co-cultures of A549 cells with *P. aeruginosa* strains for 3h at MOI 10. Injection of either ExoS-Bla or ExoY-Bla

fusions by strains CHA and PAO1 Δ STY was detected after incubating cells with β -lactamase substrate CCF2-AM either by fluorescence microscopy using a 20x objective (upper panel) or by flow cytometry (lower panel). The horizontal bar in flow-cytometry histograms indicates the gating used to determine the percentage of β -lactamase positive cells revealing ExoS-Bla injection. Mean Fluorescence Intensity is indicated in each panel. Scale bar, 100 μ m.

Figure 2. Efficiency of ExoS-Bla and ExoY-Bla translocation in different cell lines.

A/ A549 epithelial cells, BJAB, Jurkat, non-differentiated HL-60 cells (HL-60), or HL-60 differentiated into neutrophils, macrophages and monocytes by DMSO, PMA or Vitamin D3 (VD3), respectively, were infected at MOI of 10, for 3 h, with CHA Δ S expressing ExoS-BlaR146A and analyzed by flow cytometry. **B/** HL-60 and U937 were differentiated in monocytes with VD3 (black bars) or not (white bars) and infected at MOI 10 with PAO1 Δ STY strains expressing either ExoS-BlaR146A or ExoY-Bla as described above. The error bars indicate standard deviation (n=3). **C/** Non-differentiated HL-60 (thin lane) or HL-60 differentiated in neutrophils (dot line), monocytes (dash line) or macrophage (thick line) were labelled with a FITC conjugated antibody specific for CD11b and analysed by flow cytometry.

Figure 3. PopB/D proteins presence in the membrane of permissive and resistant cells is strictly due to translocon insertion.

A/ Non-differentiated HL-60 cells (ND) or VD3-differentiated HL-60 cells (VD3) were infected with CHA Δ S-SBlaR146A for 3 h, at MOI 50, or not infected (Ni). After three washes, plasma membranes were purified by sucrose gradient centrifugation. The same amounts of plasma membrane proteins (7 μ g) were separated by SDS-PAGE and revealed by immunoblotting with antibodies specific for PopB, PopD, PcrV, LAT2 or flotillin. **B/** After infection as above, non-differentiated and VD3-differentiated HL-60 cells were washed three times, treated to prepare plasma membrane fractions, and analysed by SDS-PAGE (lane 1 and 2, respectively) and immunoblotting for the presence of RpoA and PopB.

Aliquots of supernatants corresponding to $2 \cdot 10^6$ or $2 \cdot 10^5$ bacteria incubated with undifferentiated HL-60 cells (lane 3 and 4) or with VD3-differentiated HL-60 cells (lane 5 and 6) were lysed and analysed as above. **C/** Calibration of antibodies used in panel A and B. 0.3 ng of recombinant proteins PopB, PopD and His-tagged PcrV and 20 μ l of induced *P. aeruginosa* were loaded on SDS-PAGE, transferred and revealed by immunoblotting with antibodies specific for PopB, PopD or PcrV.

Figure 4. Cholesterol is essential for ExoS-Bla translocation in permissive HL-60 cells. **A/** VD3-differentiated HL-60 cells were grown as described in Materials and Methods and treated with 1 mM, 2 mM and 3 mM of Methyl- β -cyclodextrine (Me β CD) for 2 h, before infection at MOI 10 with the CHA Δ S-SBlaR146A strain. Me α CD an inactive isomer was used as control. The percentage of ExoS-Bla-injected cells was quantified by flow cytometry. The error bars indicate standard deviation (n=3). **B/** Cholesterol-rich membranes (lipid rafts) were purified by flotation on sucrose step gradients after infection of cells at MOI 50 with the CHA Δ S-SBla strain. For each fraction, the same amounts of proteins were separated by SDS-PAGE and analysed by immunodetection with antibodies specific for PopB or flotillin, a host marker for lipid rafts.

* indicates a proteolysed form of PopB.

Figure 5. Injection of ExoS-Bla into differentiated HL-60 cells is sensitive to pharmacological agents. **A/** VD3-differentiated HL-60 cells were exposed to 10 μ M of cytochalasin D (CytoD), 10 μ M of latrunculin B (LtrB) or 50 nM of Wortmannin for 30 min prior and during infection, or to 2 μ M of TAT-C3 toxin, 100 μ M of LY-294002, 12 μ M of genistein, 10 μ M of PP2, and 10 μ M of PF-573-228 for 120 min prior and during a 3 h infection period at MOI 10 with the PAO1 Δ STY-SBlaR146A strain. The percentage of injection-positive cells was evaluated by flow cytometry. **B/** Eukaryotic plasma membranes were purified by fractionation on sucrose gradient, after infection of cells pre-treated with inhibitors as above. Proteins were analysed by

immunoblotting using anti-PopB. Ni : non-infected VD3-differentiated HL-60 cells, CTRL : infected VD3-differentiated HL-60 cells without inhibitor. C/ The ability of PAO1ΔSTY-SBlaR146A strain to secrete ExoS-Bla *in vitro* was assayed for each inhibitor modifying injection by immunoblotting of total secreted ExoS-Bla protein using the anti-β-lactamase antibody. Pa : supernatant of T3SS non-induced *P.aeruginosa*, IPa : supernatant of T3SS induced *P. aeruginosa* without inhibitor.

Figure 6. Switching T3SS resistant HL-60 cells to T3SS permissive cells by serum starvation or panning to anti-CD43. Non-differentiated HL-60 cells were treated as follows : maintained during 15 min in medium supplemented (+ FCS) or not (- FCS) (a), incubated during 5 min in either naive (- anti CD43) or coated wells with a monoclonal anti CD43 (+ anti CD43), first panned in a anti CD43-coated well during 5 min and then transferred to a naïve well, (transferred) (b) and cells were next incubated at MOI 10 with the CHAΔS-SblaR146A strain and analysed by flow cytometry. Non-differentiated HL-60 were incubated during 5 min in a well coated with anti CD43 in the absence (- CytoD) or the presence (+ CytoD) of 10 μM of cytochalasine D for 30 min prior and during infection at MOI 10 with the CHAΔS-SblaR146A strain (c). The error bars indicate standard deviation (n=3). Insert : schematic drawing of the experiments presented in the histogram (part b).

SUPPORTING INFORMATION LEGENDS

Figure S1. Effects of Rho GTPase and Rho kinase inhibitors on the migration of VD3-differentiated HL-60 cells. To determine whether TAT-C3 (0,33 μM), or the ROCK inhibitor Y27632 (100 μM) were readily active and had a physiological effect on VD3-differentiated HL-60 cells, we examined whether they had the capacity to alter the migration of VD3-differentiated HL-60 cells through a 3 μm pore membrane to a source of chemoattractants, namely the supernatant of cultures of *P. aeruginosa* growing in the exponential phase (see Materials and Methods). In each set of experiment, we counted the number of cells present in the lower chamber either in

the absence of inhibitor (control) or in the presence of inhibitors in five microscopic fields chosen at random (magnification $\times 100$). Results are presented as migrating cells expressed in percent of cells migrating in the control.

Figure S2. Dose effect of pharmacological agents. HL-60 VD3 were exposed to different concentrations of cytochalasin D (cytoD), latrunculin B (LtrB), wortmannin for 30 min prior and during infection or to different concentrations of LY-294002, Genistein, PP2 or PF-573-228 for 120 min prior and during infection. HL-60 VD3 were infected at MOI of 10, for 3 h, with PAO1F Δ 3STY ExoSBl_aR146A strain and then analysed by flow cytometry.

Figure 1

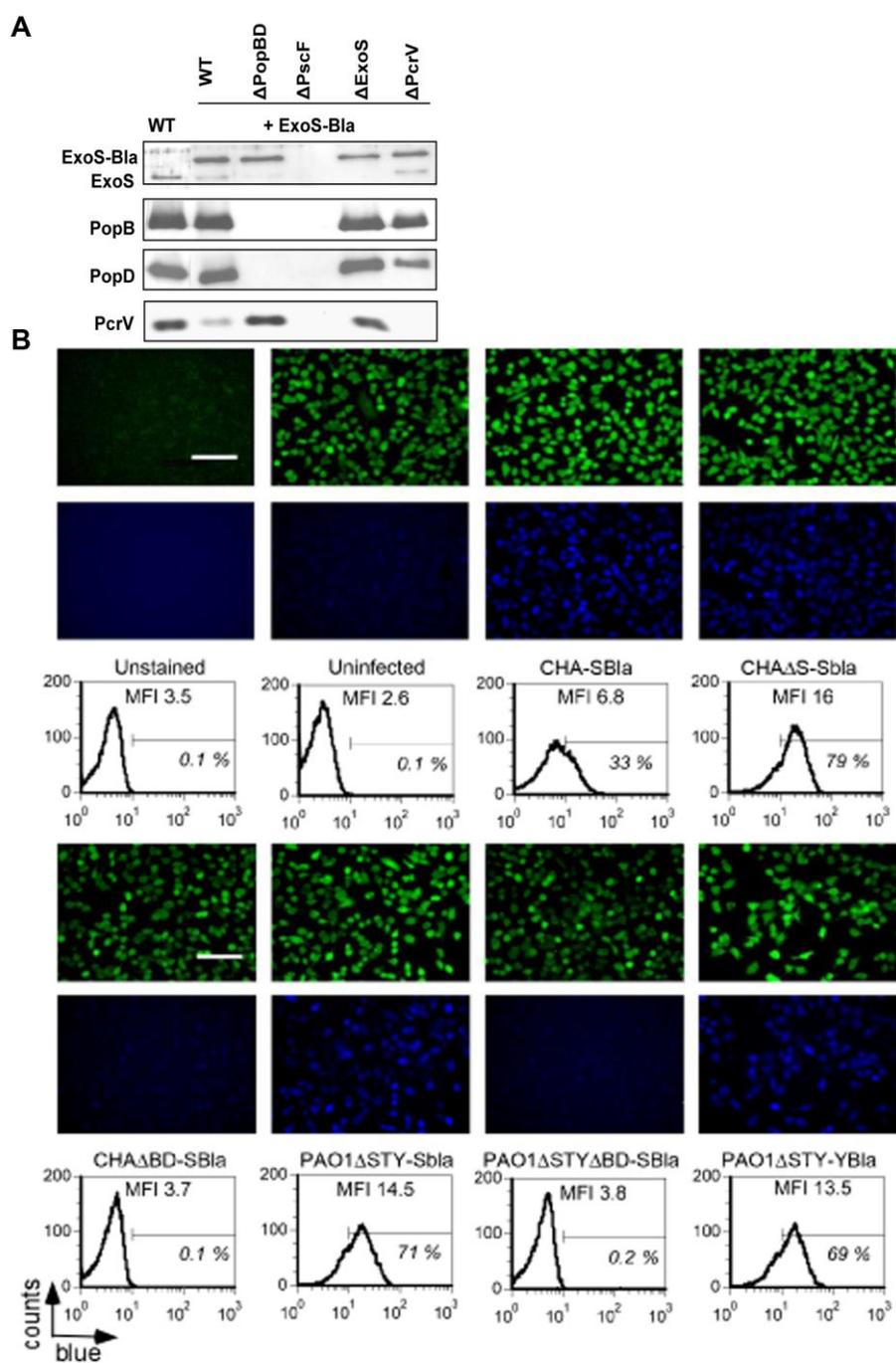


Figure 2

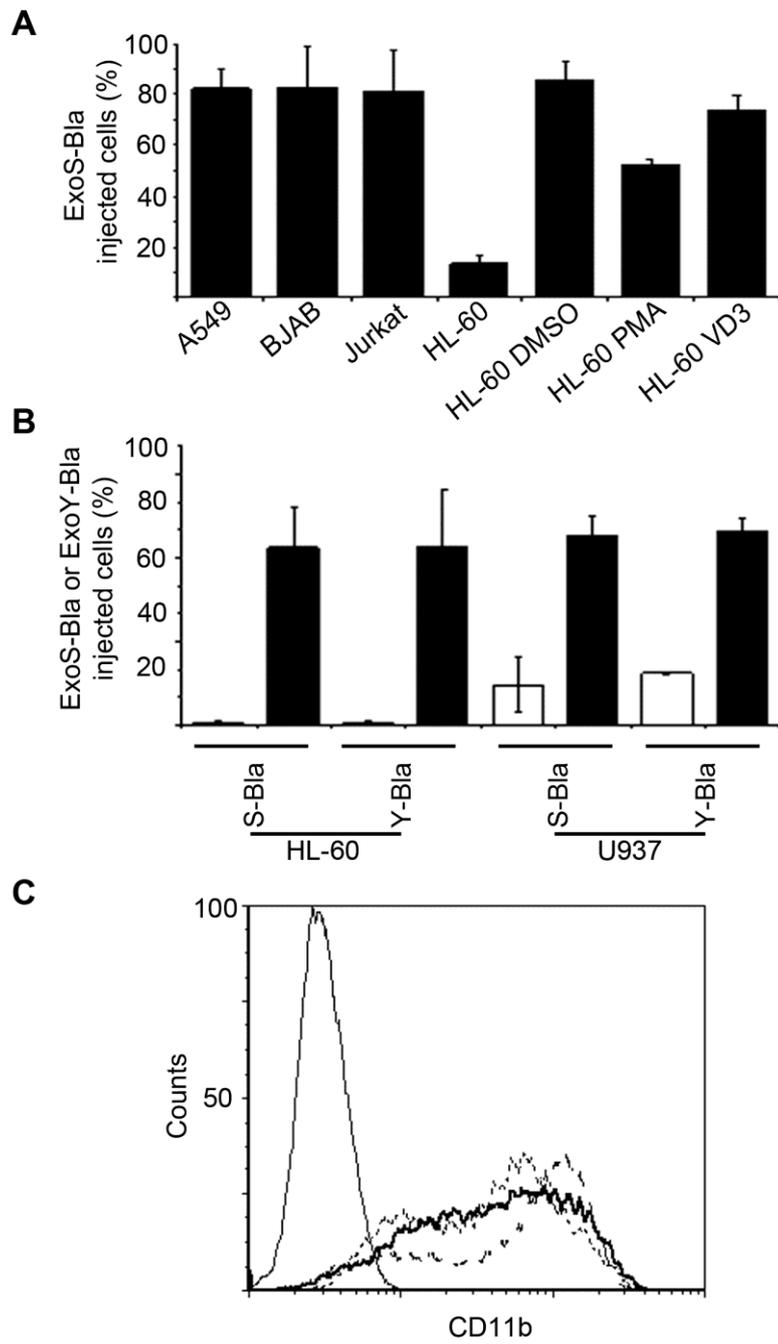
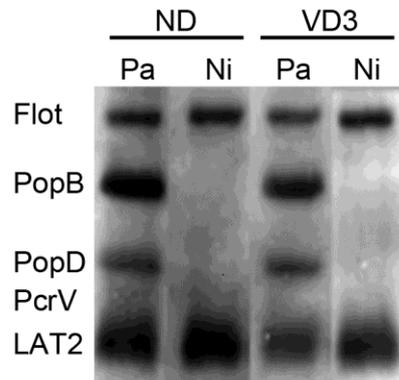
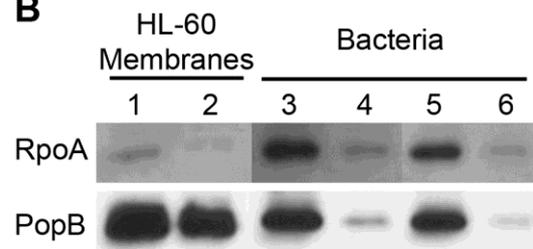


Figure 3

A



B



C

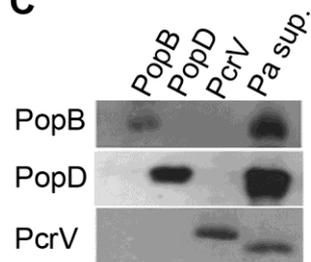
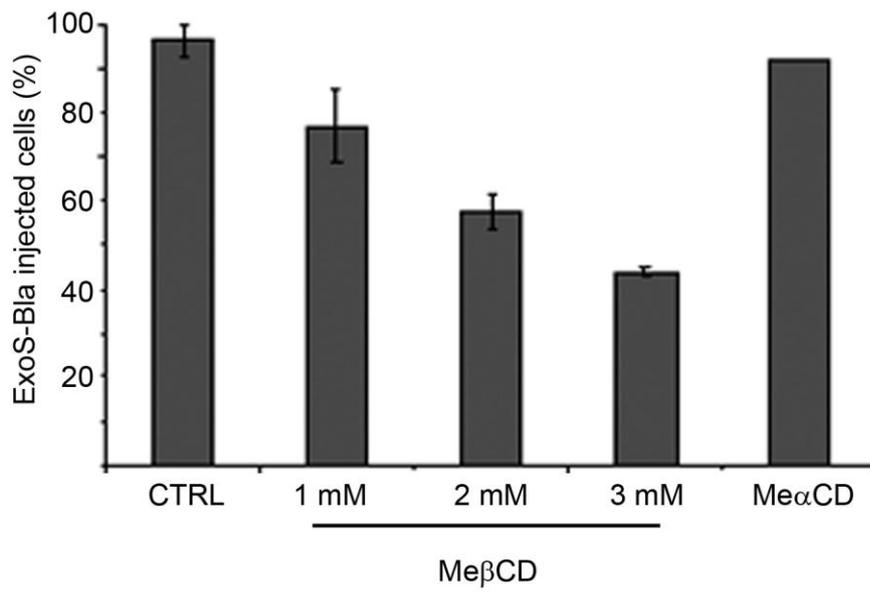


Figure 4

A



B

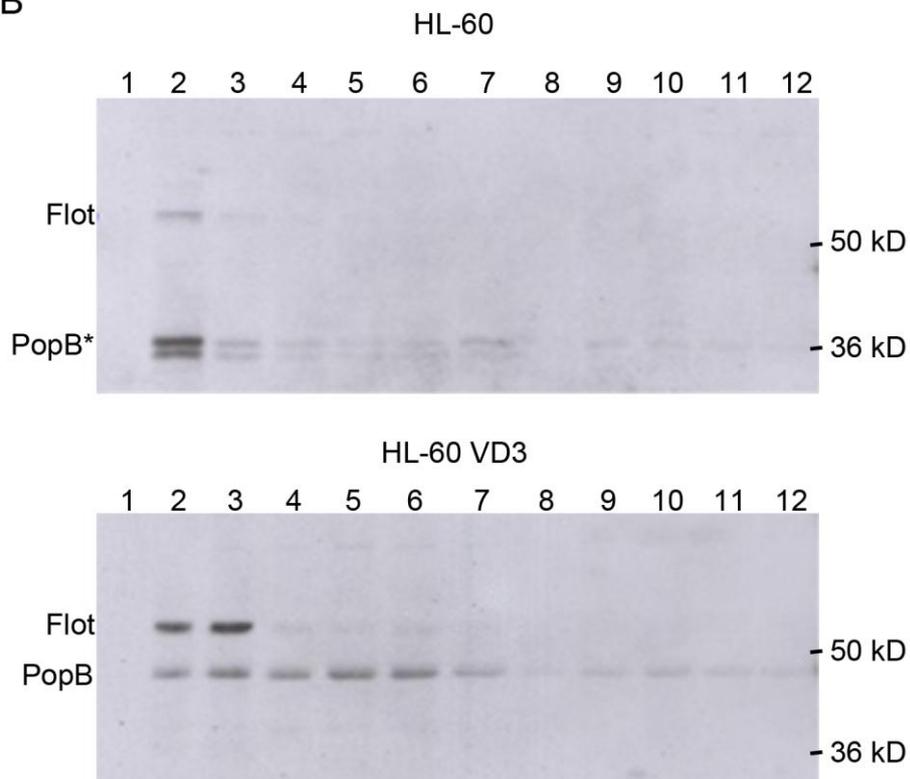


Figure 5

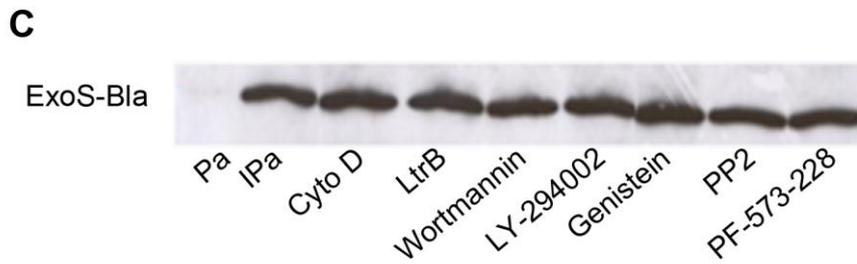
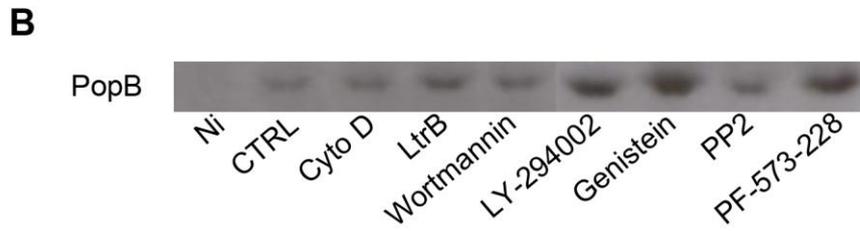
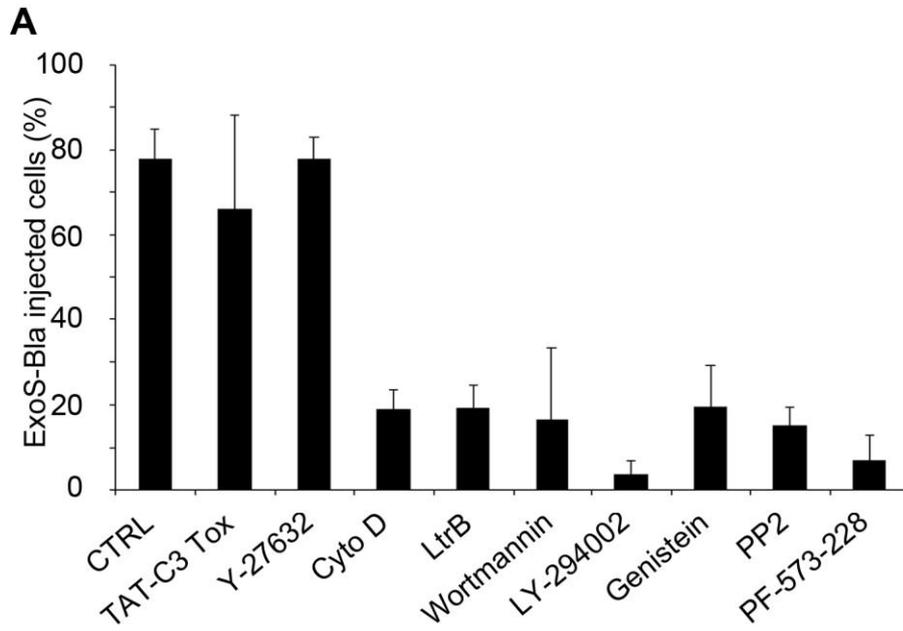


Figure 6

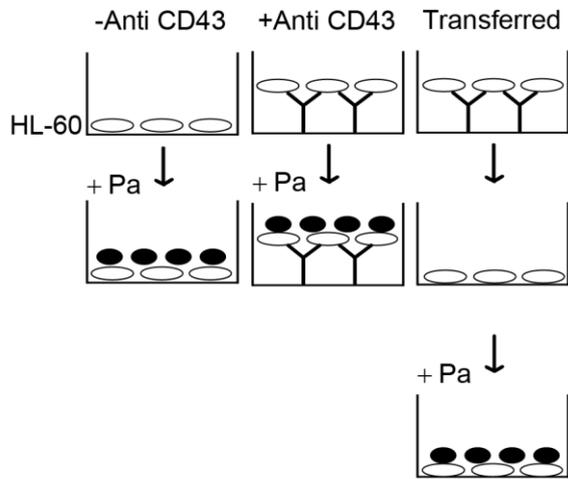
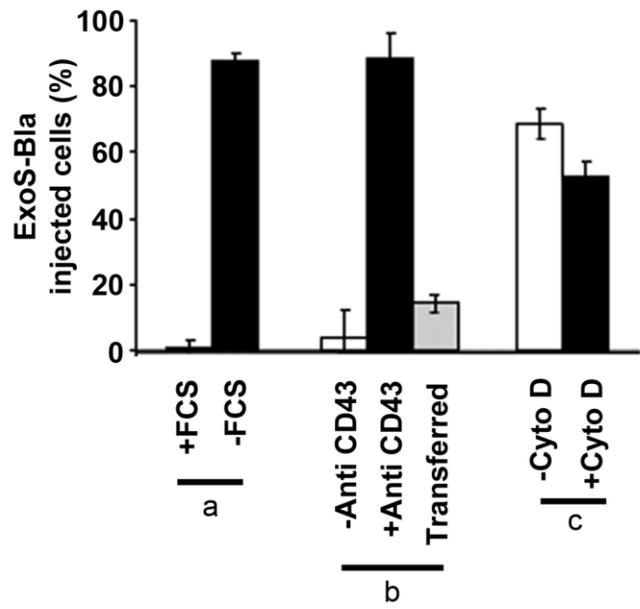


Figure S1

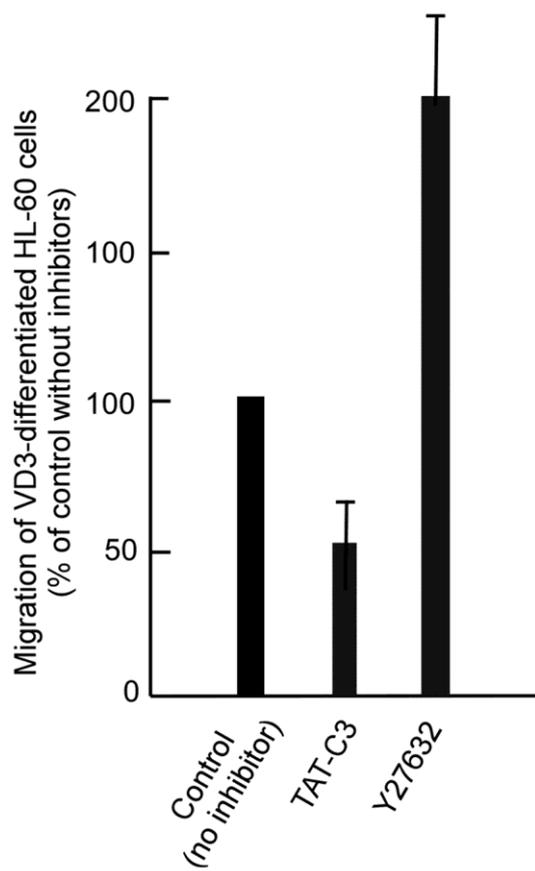
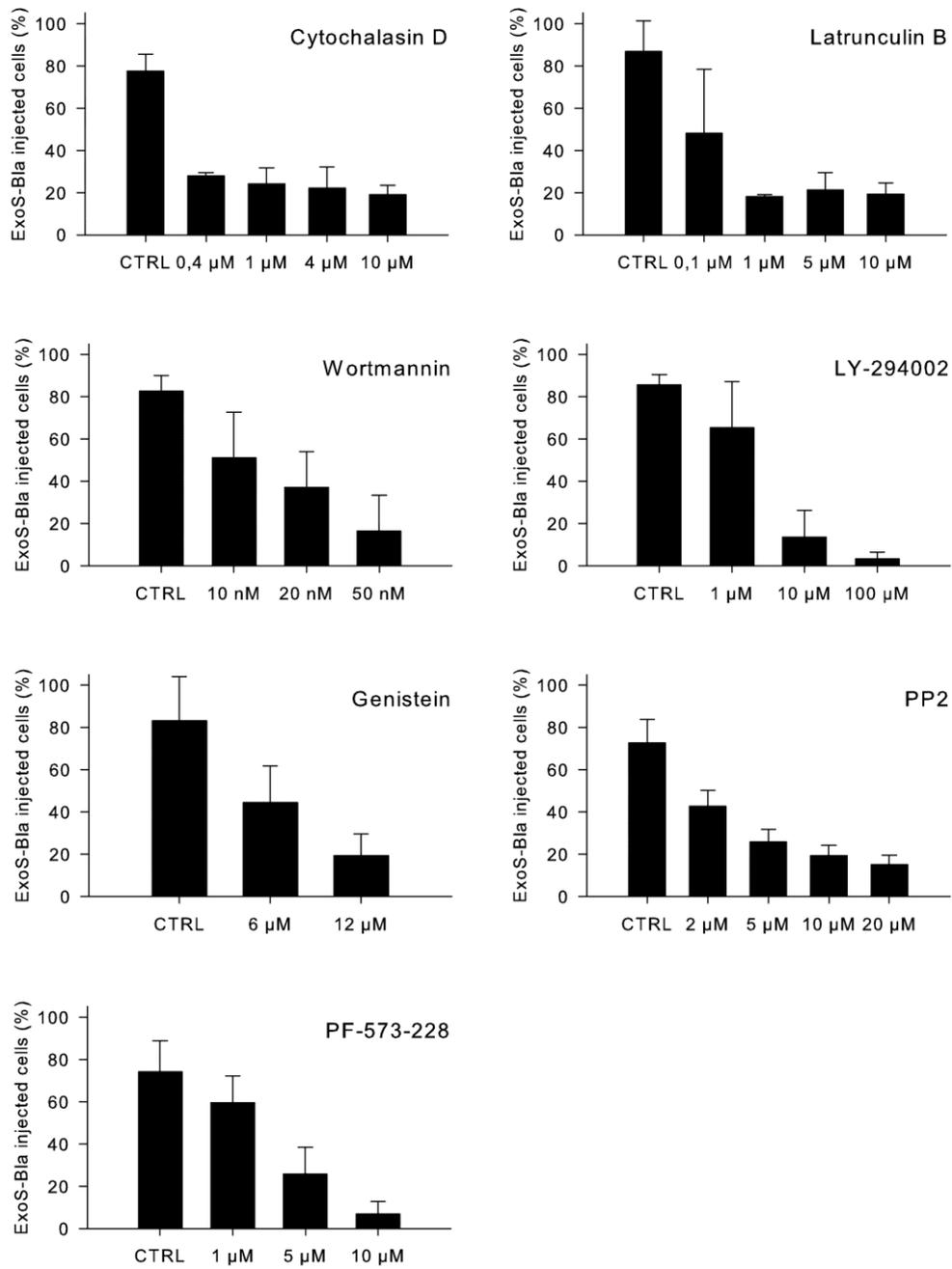


Figure S2



Résumé

La pathogénicité de *P. aeruginosa* (*P. a*) repose sur de nombreux facteurs de virulence dont le système de sécrétion de type III (SST3). Ce complexe multiprotéique est constitué d'une aiguille se terminant par un translocon composé des protéines PopB et PopD. En s'insérant dans les membranes plasmiques, le translocon permet le passage des exotoxines dans le cytoplasme de la cellule cible. L'induction de la synthèse et de la sécrétion des exotoxines est dépendante d'un contact entre *P. a* et la cellule cible. Dans ce travail, nous avons examiné l'influence de facteurs cellulaires sur l'efficacité de translocation des toxines. L'utilisation d'un système rapporteur fluorescent CCF2/ β -lactamase a permis de visualiser l'injection de toxine. En parallèle, l'association des protéines du translocon avec la membrane de la cellule hôte a été évaluée par immunodétection de PopB/D après fractionnement des membranes sur gradient de sucrose. Les cellules promyélocyaires HL-60 et promonocytaires U937 sont résistantes à l'injection de toxine, bien que PopB et PopD soient associées à la membrane. Après différenciation, ces cellules deviennent sensibles à l'injection sans que l'on détecte de variation notable de la quantité de protéines du translocon insérées dans la membrane. Le traitement des cellules HL-60 sensibles avec un agent déplétant le cholestérol, entraîne une diminution de l'injection de toxine. De plus, la protéine PopB est retrouvée dans la fraction membranaire, obtenue par purification sur gradient de sucrose, contenant le marqueur des radeaux lipidiques flotilline. Par une approche pharmacologique, nous apportons la preuve que, en plus de la composition de la membrane, des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la polymérisation de l'actine sont essentielles pour la formation d'un pore fonctionnel.

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa*, système de sécrétion de type 3, signalisation cellulaire

Study of the susceptibility of host cells to toxin injection by the type 3 secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*

Abstract

The pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* (*P.a*) implies multiple virulence factors among which the type III secretion system (T3SS). This multiprotein complex is composed of a needle through which four exotoxins are exported. The protein PopB and PopD form an oligomeric structure (translocon) at the end of the needle that inserts into the host cell membrane and translocates the exotoxins into the cytoplasm. Synthesis and toxin secretion is induced on contact with eukaryotic cell. In this work, we examined the influence of host cell elements on exotoxin translocation efficiency. The delivery of T3SS toxins was investigated using a CCF2/ β -lactamase fluorescent reporter system. In parallel, the association of translocon proteins with host plasma membranes was evaluated by immunodetection of PopB/D following sucrose gradient fractionation of membranes. Promyelocytic HL-60 cells and promonocytic U937 cells were found to be resistant to toxin injection even though PopB/D associated with host cell plasma membranes. Differentiation of these cells resulted in an injection-sensitive phenotype without any significant change in the level of membrane-inserted translocon proteins. Treatment of sensitive HL-60 cells with a cholesterol-depleting agent, resulted in a diminished injection of toxin. Moreover, the PopB translocator was found in the membrane fraction obtained from sucrose-gradient purifications and containing lipid-raft marker flotillin. Through a pharmacological approach, we brought evidence that, in addition to membrane composition, some general signalling pathways involved in actin polymerization may be critical for the formation of a functional pore.

Key words : *Pseudomonas aeruginosa*, type III secretion system, cell signaling