



HAL
open science

Franchissement des barrières épithéliales et endothéliales par le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*

Guillaume Golovkine

► To cite this version:

Guillaume Golovkine. Franchissement des barrières épithéliales et endothéliales par le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiologie et Parasitologie. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT: . tel-01496872v1

HAL Id: tel-01496872

<https://theses.hal.science/tel-01496872v1>

Submitted on 28 Mar 2017 (v1), last revised 5 Jul 2017 (v2)

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 GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Virologie, Microbiologie, Immunologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Guillaume GOLOVKINE

Thèse dirigée par **Philippe HUBER** et
codirigée par **Eric FAUDRY**

préparée au sein du **Laboratoire de Biologie du Cancer et de
l'Infection**

dans **l'École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant**

Franchissement des barrières épithéliales et endothéliales par le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*

Thèse soutenue publiquement le **29 Octobre 2015**
devant le jury composé de :

Dr. Bertrand TOUSSAINT

Professeur, Grenoble, Président du jury

Dr. Eric OSWALD

Directeur de Recherche, Toulouse, Rapporteur

Dr. Emmanuel LEMICHEZ

Directeur de Recherche, Nice, Rapporteur

Dr. Guy TRAN VAN NHIEU

Directeur de Recherche, Paris, Examineur

Dr. Romé VOULHOUX

Directeur de Recherche, Aix-Marseille, Examineur

Dr. Philippe HUBER

Directeur de Recherche, Grenoble, Directeur de thèse



A mes grands-parents,

A mes parents et à Bastien,

A Laura.

Remerciements

Je remercie les Docteurs Éric Oswald et Emmanuel Lemichez d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je vous remercie du temps et de l'énergie que vous avez consacré à la lecture de ce manuscrit.

Je souhaite remercier le Professeur Bertrand Toussaint et les Docteurs Romé Voulhoux et Guy Tran Van Nhieu, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je dois des remerciements additionnels au Dr. Tran Van Nhieu, pour son investissement lors de mes comités de suivi de thèse, au cours desquels il a su me faire part de conseils avisés. Pour la même raison, je remercie les Docteurs Alexei Grichine et Jean-Christophe Olivo-Marin.

Je remercie le CEA pour m'avoir salarié pendant ces trois années, la fondation Finovi pour avoir financé ce projet, et plus généralement les tutelles institutionnelles de notre équipe (CEA, Inserm, CNRS et Université Joseph Fourier) pour l'aide financière et matérielle apportée.

J'adresse mes remerciements à Ina Attrée, la directrice de l'équipe PB&RC, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, et avoir accordé beaucoup de temps et d'attention à mon projet. Merci également à Jean-Jacques Feige et Jérôme Garin, pour m'avoir reçu respectivement au sein de leur laboratoire et institut.

Mes plus sincères remerciements à Philippe Huber, mon directeur de thèse, pour m'avoir formé à la recherche avec patience et bienveillance. Grâce à lui, ma thèse s'est déroulée dans d'excellentes conditions, et je lui en suis particulièrement reconnaissant.

Merci à Éric Faudry, mon co-directeur de thèse, pour son caractère enjoué et pour son aide précieuse sur le plan scientifique. Merci également à Stéphanie Bouillot, pour avoir été si patiente à mes débuts.

Je remercie chaleureusement tous mes collègues de l'équipe PB&RC, passés ou présents, pour m'avoir soutenu au cours de ma thèse, et pour tous les bons moments que nous avons partagés. J'ai passé trois années et demie formidables à vos côtés.

Merci à Laëtitia Kurzawa, Laurent Guyon et Jean-Philippe Kleman pour m'avoir aidé à mes débuts en microscopie.

Merci du fond du cœur à ma famille, pour avoir cru en moi et pour le soutien qu'elle m'a apporté malgré la distance.

Et finalement, merci à Laura, pour tout.

Avant-propos

Au cours de mes études, j'ai eu l'opportunité d'effectuer deux stages en laboratoire de recherche. J'ai décidé d'intégrer des laboratoires étudiant des pathogènes bactériens, car je souhaitais associer mes compétences d'ingénieur au domaine de la santé, pour lequel j'éprouve un vif intérêt.

Mon premier stage s'est déroulé dans l'équipe de Martha Clokie au sein du Département d'Infection, Immunité et Inflammation de l'Université de Leicester (Royaume-Uni). Durant trois mois, mon objectif a été de créer un kit de détection de la bactérie pathogène *Clostridium difficile*, afin de pouvoir rapidement identifier des surfaces contaminées en milieu hospitalier.

Pour mon second stage, j'ai intégré l'Institut de Recherche en Technologie et Science pour le Vivant, au sein duquel j'ai rejoint l'équipe « Pathogénèse Bactérienne et Réponses Cellulaires » dirigée par Ina Attrée. Dans cette équipe, j'ai débuté un projet de recherche portant sur le pathogène bactérien opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*. C'est au cours de ce stage que s'est fait le « déclic » : je me suis découvert un fort attrait pour le domaine de l'interaction hôte-pathogène. Etant déterminé à poursuivre l'étude que j'avais entamée, j'ai obtenu une bourse de thèse financée par le CEA pour poursuivre mes travaux sous la supervision de Philippe Huber.

Au cours de ma thèse, j'ai pu travailler sur deux projets, dont la ligne directrice est l'étude du franchissement des barrières tissulaires par *P. aeruginosa* au cours de l'infection aiguë.

Le premier projet que j'ai développé a porté sur l'interaction entre *P. aeruginosa* et l'endothélium. J'ai pu mettre en évidence le clivage de la VE-cadhérine, une protéine essentielle des jonctions intercellulaires, par la protéase LasB de *P. aeruginosa*. Ce mécanisme a été caractérisé biochimiquement, et son importance a été démontrée sur cellules endothéliales et dans un modèle murin de pneumonie aiguë.

Le second projet sur lequel j'ai travaillé a porté sur l'interaction entre *P. aeruginosa* et l'épithélium. J'ai mis en place un modèle *in vitro* de visualisation de l'infection d'une

monocouche de cellules épithéliales par vidéomicroscopie confocale. Ces travaux mettent en évidence le fait que *P. aeruginosa* est capable de franchir la barrière épithéliale en exploitant les processus dynamiques de renouvellement de cette barrière. En effet, *P. aeruginosa* peut trans migrer massivement aux sites de divisions et de morts cellulaires, pour induire ensuite une rupture rapide de la monocouche de cellules.

Dans l'ensemble, mes travaux de thèse apportent une meilleure compréhension des mécanismes mis en œuvre par *P. aeruginosa* pour franchir les barrières tissulaires de l'hôte au cours d'infections aiguës. Le but de ce manuscrit est de présenter ces travaux.

Dans la section « Introduction », je présente le contexte scientifique de mon projet de thèse. J'y décris notamment les différents types d'infections à *P. aeruginosa*. La section « Résultats et Discussion » est quant à elle composée de deux articles scientifiques, qui sont l'aboutissement de mes travaux, ainsi que d'une discussion de chacun de ces articles.

Table des Matières

Remerciements	- 3 -
Avant-propos	- 5 -
Table des Matières	- 7 -
Liste des Figures.....	- 11 -
Liste des Tableaux.....	- 12 -
Introduction	- 13 -
Chapitre I : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , pathogène opportuniste	- 15 -
A. Présentation	- 15 -
a. Propriétés	- 15 -
b. Résistance aux antibiotiques	- 16 -
c. Mode de vie.....	- 17 -
B. Infections à <i>P. aeruginosa</i>	- 18 -
a. Incidence clinique des infections à <i>P. aeruginosa</i>	- 18 -
b. Principaux sites infectieux et facteurs de risque associés	- 19 -
c. Infections chroniques à <i>P. aeruginosa</i>	- 22 -
d. Infections aiguës à <i>P. aeruginosa</i>	- 25 -
Chapitre II : Les facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i>	- 30 -
A. Le flagelle	- 30 -
a. Structure du flagelle	- 31 -
b. Mobilité et adhésion médiées par le flagelle.....	- 32 -
c. Chimiotactisme et flagelle au cours du swimming	- 33 -
d. Importance du flagelle au cours de l'infection	- 34 -
B. Les pili de type IV.....	- 35 -
a. Structure du pilus	- 35 -

b.	Mobilité et adhésion médiée par les pili	- 37 -
c.	Chimiotactisme et pili	- 38 -
d.	Interaction entre pili et cellules hôtes	- 39 -
e.	Importance des pili au cours de l'infection.....	- 40 -
C.	Le Système de Sécrétion de Type 2	- 41 -
a.	Structure du SST2	- 41 -
b.	Substrats du SST2	- 42 -
c.	Importance du SST2 au cours de l'infection.....	- 44 -
D.	Le Système de Sécrétion de Type 3	- 45 -
a.	Structure et activation du SST3	- 45 -
b.	Effecteurs du SST3	- 46 -
c.	Importance du SST3 au cours de l'infection.....	- 49 -
E.	Autres facteurs de virulence	- 50 -
a.	Les autres systèmes de sécrétion de <i>P. aeruginosa</i>	- 50 -
b.	Les autres molécules sécrétées.....	- 51 -
Chapitre III : Les barrières tissulaires au cours de l'infection.....		- 54 -
A.	La barrière épithéliale	- 54 -
a.	Localisation des cellules épithéliales dans l'organisme.....	- 54 -
b.	Propriétés des cellules épithéliales.....	- 56 -
c.	Spécificités des cellules épithéliales pulmonaires	- 61 -
B.	La barrière endothéliale	- 63 -
a.	Localisation des cellules endothéliales dans l'organisme.....	- 63 -
b.	Spécificités des cellules endothéliales	- 65 -
c.	Les jonctions intercellulaires endothéliales	- 65 -
Chapitre IV : Interaction entre <i>P. aeruginosa</i> et les cellules épithéliales et endothéliales-		67
-		
A.	Interaction avec les cellules épithéliales	- 67 -
a.	Internalisation de <i>P. aeruginosa</i>	- 67 -
b.	Invasion de l'épithélium par une voie paracellulaire.....	- 70 -
B.	Interaction avec les cellules endothéliales	- 72 -

a.	Internalisation de <i>P. aeruginosa</i>	- 72 -
b.	Effet du SST3.....	- 73 -
c.	Effet d'autres facteurs de virulence	- 73 -
	Chapitre V : Mécanismes d'action d'autres pathogènes bactériens sur les barrières épithéliales et endothéliales	- 75 -
A.	La voie transcellulaire.....	- 76 -
a.	Phagocytose par des cellules spécialisées.....	- 76 -
b.	Entrée dans les cellules non phagocytaires	- 77 -
c.	Formation de tunnels transcellulaires	- 79 -
B.	La voie paracellulaire.....	- 80 -
a.	Jonctions serrées	- 81 -
b.	Jonctions adhérentes	- 81 -
C.	Mécanisme du « cheval de Troie »	- 83 -
D.	Induction de l'inflammation	- 84 -
E.	Comparaison à <i>P. aeruginosa</i>	- 85 -
	Résultats et Discussion.....	- 87 -
	Chapitre VI : Franchissement de la barrière endothéliale par <i>P. aeruginosa</i>	- 89 -
A.	Introduction.....	- 89 -
B.	Publication dans PLoS pathogens	- 91 -
C.	Discussion.....	- 93 -
a.	Injection des toxines et polarité des cellules.....	- 93 -
b.	Cibles de LasB	- 94 -
c.	Conservation de l'activité de LasB chez différentes souches de <i>P. aeruginosa</i> -	95 -
d.	Clivage de la VE-cadhérine et types de vaisseaux.....	- 96 -
e.	Etude <i>in vivo</i>	- 97 -
f.	Détection de la septicémie à <i>P. aeruginosa</i>	- 98 -
g.	Différence entre la E- et la VE-cadhérine.....	- 99 -
h.	Dégradation des jonctions par d'autres pathogènes bactériens.....	- 100 -

Chapitre VII : Franchissement de la barrière épithéliale par <i>P. aeruginosa</i>	- 102 -
A. Introduction.....	- 102 -
B. Manuscrit soumis pour publication.....	- 103 -
C. Discussion.....	- 105 -
a. Résistance de l'épithélium à l'infection.....	- 105 -
b. Vers une complexification du modèle utilisé.....	- 106 -
c. Attraction des bactéries par le domaine basal.....	- 107 -
d. Rôle des pili dans la transmigration.....	- 108 -
e. Exploitation des divisions et morts cellulaires.....	- 110 -
f. Internalisation ou transmigration ?	- 112 -
g. Mécanismes de renouvellement de l'épithélium pulmonaire	- 114 -
h. Modèles <i>in vivo</i> envisageables.....	- 115 -
Conclusion.....	- 120 -
Annexes.....	- 126 -
Annexe 1 : Lettre scientifique de l'iRTSV N°42	- 128 -
Annexe 2 : Faits marquants de la DSV.....	- 129 -
Annexe 3 : Poster présenté lors de la conférence « Pseudomonas 2013 ».....	- 130 -
Annexe 4 : Poster présenté lors de la Gordon Research Conference en Juillet 2015....	- 133 -
Bibliographie.....	- 136 -

Liste des Figures

Figure 1 : Alternance de vie planctonique et vie sessile de <i>P. aeruginosa</i>	- 18 -
Figure 2 : Principaux microorganismes isolés à partir d'infections nosocomiales.....	- 19 -
Figure 3 : Colonisation des poumons de patients atteints de mucoviscidose par les pathogènes bactériens ...	- 23 -
Figure 4 : Dissémination de <i>P. aeruginosa</i> au cours de l'infection pulmonaire aiguë.....	- 26 -
Figure 5 : Origine des bactériémies	- 29 -
Figure 6 : Image en microscopie électronique du flagelle et des pili de <i>P. aeruginosa</i>	- 31 -
Figure 7 : Structure du flagelle des bactéries à Gram négatif.....	- 32 -
Figure 8 : Visualisation macroscopique sur gélose du swimming et du swarming de <i>P. aeruginosa</i>	- 33 -
Figure 9 : Schéma de pilus de <i>P. aeruginosa</i>	- 36 -
Figure 10 : Vue macroscopique et microscopique du twitching.....	- 37 -
Figure 11 : Représentation schématique du SST2 de <i>P. aeruginosa</i>	- 41 -
Figure 12 : Représentation schématique du SST3 de <i>P. aeruginosa</i>	- 45 -
Figure 13 : Principaux effets des toxines du SST3 de <i>P. aeruginosa</i> sur les macrophages, neutrophiles et cellules épithéliales	- 49 -
Figure 14 : Principaux types d'épithéliums du corps humain.....	- 56 -
Figure 15 : Vue schématique de la structure d'une cellule épithéliale polarisée	- 57 -
Figure 16 : Connection des contacts focaux aux filaments d'actine et des hémodesmosomes aux filaments intermédiaires	- 58 -
Figure 17 : Junctions serrées, junctions adhérentes et desmosomes dans les cellules épithéliales.....	- 59 -
Figure 18 : Vue Schématique des bronchioles et des alvéoles pulmonaires humaines.....	- 62 -
Figure 19 : Structure d'une alvéole pulmonaire.....	- 62 -
Figure 20 : Modèle proposé par Engel et ses collaborateurs pour l'entrée de <i>P. aeruginosa</i> dans les cellules épithéliales.	- 69 -
Figure 21 : Modèle d'infection d'épithélium développé par Heiniger et ses collaborateurs.....	- 71 -
Figure 22 : Modèle d'invasion d'épithélium de muqueuse par <i>P. aeruginosa</i> proposé par Heiniger et ses collaborateurs.	- 71 -
Figure 23 : Organisation des plaques de Peyer.....	- 77 -
Figure 24 : Mécanismes d'entrée des bactéries dans les cellules épithéliales.....	- 78 -

<i>Figure 25 : Franchissement de la barrière intestinale par Salmonella, Shigella et Listeria</i>	- 79 -
<i>Figure 26 : Mécanisme d'ouverture des jonctions cellulaires au niveau de la barrière hémato-encéphalique par N. meningitidis</i>	- 83 -
<i>Figure 27 : Diminution de la quantité de VE-cadhérine au cours de l'infection, par un mécanisme indépendant du SST3</i>	- 89 -
<i>Figure 28 : Image en microscopie confocale d'HUVEC</i>	- 94 -
<i>Figure 29 : Mécanismes d'interaction des pathogènes bactériens avec les intégrines</i>	- 95 -
<i>Figure 30 : Marquages E-cadhérine et VE-cadhérine de poumons de souris</i>	- 97 -
<i>Figure 31 : Extravasation d'un neutrophile par voie paracellulaire</i>	- 98 -
<i>Figure 32 : Extraits de l'alignement des séquences de la VE-cadhérine et de la E-cadhérine.</i>	- 99 -
<i>Figure 33 : Recrutement de la VE-cadhérine et de l'actine par N. meningitidis</i>	- 101 -
<i>Figure 34 : Recrutement massif de bactéries aux futurs sites de transmigration</i>	- 107 -
<i>Figure 35: Phénotype du mutant $\Delta pilV$</i>	- 109 -
<i>Figure 36 : Comportement des jonctions adhérentes au cours de la division cellulaire dans différents tissus épithéliaux</i>	- 111 -
<i>Figure 37 : Mécanisme supposé de renouvellement de l'épithélium pulmonaire</i>	- 115 -
<i>Figure 38 : Histologie de poumons de souris</i>	- 116 -
<i>Figure 39 : Injection des pneumocytes au cours de l'infection pulmonaire aiguë</i>	- 116 -
<i>Figure 40 : Préparation d'échantillons ex vivo par la méthode du "swiss roll"</i>	- 118 -
<i>Figure 41 : Mécanisme proposé de franchissement des barrières épithéliales et endothéliales par P. aeruginosa au cours de l'infection aiguë</i>	- 123 -

Liste des Tableaux

<i>Tableau 1 : Types d'infections nosocomiales et prévalence de P. aeruginosa</i>	- 20 -
<i>Tableau 2 : Infections à P. aeruginosa les plus communes et facteurs de risque majeurs</i>	- 21 -
<i>Tableau 3 : Lignées cellulaires et cellules épithéliales primaires utilisées pour l'observation de l'internalisation de P. aeruginosa</i>	- 68 -

Introduction

Chapitre I : *Pseudomonas aeruginosa*, pathogène opportuniste

A. Présentation

a. Propriétés

Pseudomonas aeruginosa a été isolée pour la première fois par le docteur Gessard en 1882 à partir d'une blessure infectée. Bactérie à Gram négatif, elle a été longtemps dénommée bacille pyocyanique en France, à cause de sa capacité à produire un pigment coloré, la pyocyanine, qui donne aux blessures infectées une couleur bleue très caractéristique (Lyczak et al., 2000).

P. aeruginosa est une bactérie ubiquitaire, retrouvée principalement dans les sols et milieux humides. Cette bactérie a la forme d'un bacille, doté d'un seul flagelle polaire. Ce flagelle ainsi que ses pili de type IV lui permettent de se déplacer efficacement à la fois en milieu liquide et sur support solide.

Elle est capable de métaboliser un grand nombre de substrats carbonés et, bien qu'elle soit aérobique, elle peut se développer en absence d'oxygène en utilisant le nitrate comme accepteur final d'électrons (Vasil, 1986). Sa température optimale de croissance est comprise entre 30°C et 37°C, mais elle peut tout de même se développer à des températures allant de 4°C à 42°C en ralentissant son métabolisme.

P. aeruginosa possède un génome de très grande taille pour une bactérie. A ce jour, les souches de *P. aeruginosa* séquencées ont un génome de taille comprise entre 5,5 et 7 millions de paires de bases. Une grande partie de ce génome est composée de gènes de régulation ou de gènes impliqués dans le métabolisme, le transport ou l'efflux de composés organiques (Stover et al., 2000). Ce grand génome, associé à une très grande plasticité génétique, confère à *P. aeruginosa* la capacité de survivre dans une grande variété d'environnements. On la retrouve principalement dans des milieux riches, plutôt associés aux activités humaines. *P. aeruginosa* est également présente occasionnellement sur la peau, dans l'appareil respiratoire

ou l'appareil digestif chez l'individu sain. Sa capacité d'adaptation et sa résistance naturelle à de nombreux antiseptiques lui confèrent également l'aptitude de coloniser des environnements artificiels, y compris des surfaces et des matériels médicaux en milieu hospitalier (Abdallah et al., 2014).

Ce dernier point est particulièrement problématique car *P. aeruginosa* peut, sous certaines conditions, être un pathogène pour l'homme. C'est un pathogène opportuniste, qui profite d'un affaiblissement du patient pour l'infecter. Les infections à *P. aeruginosa* sont particulièrement graves car elles touchent des catégories de patients généralement très affaiblis (Lyczak et al., 2000).

b. Résistance aux antibiotiques

On constate aujourd'hui l'apparition et la propagation en milieu hospitalier de souches de *P. aeruginosa* résistantes à de nombreux antibiotiques, notamment grâce à une résistance intrinsèque liée à la faible perméabilité de sa membrane externe et à l'expression de nombreuses pompes d'efflux. De plus, elle est capable d'acquérir une résistance adaptative (par mutation) à presque tous les traitements actuellement disponibles (Strateva and Yordanov, 2009). Cette acquisition est favorisée par la forte pression de sélection appliquée aux bactéries en milieu hospitalier à cause de l'utilisation abusive d'antibiotiques et de désinfectants.

Les conséquences cliniques des infections par des souches résistantes aux antibiotiques sont nombreuses : augmentation de la mortalité, du recours à des interventions chirurgicales, du temps de séjour passé en hôpital, ainsi que du coût global du traitement de l'infection (Lister et al., 2009). Un problème encore plus préoccupant est le développement de la résistance aux antibiotiques au cours de la thérapie. Ce phénomène d'adaptation de la bactérie aux traitements antibiotiques représente une grave complication de l'infection, qui peut doubler le temps de séjour en hôpital et le coût des soins (Lister et al., 2009).

La recherche de nouvelles molécules antibiotiques pour lutter contre *P. aeruginosa* est très active. Malheureusement, de moins en moins de molécules efficaces sont découvertes. Une approche alternative aux antibiotiques actuels est le développement de molécules réduisant la virulence de *P. aeruginosa* en bloquant ses facteurs de virulence. Une telle approche

permettrait sans doute de limiter la pression de sélection appliquée aux bactéries, et ralentirait ainsi l'apparition de nouveaux phénomènes de résistance (Kipnis et al., 2006).

c. Mode de vie

Le type d'infection provoqué par *P. aeruginosa* est influencé par de nombreux paramètres, dont beaucoup restent encore non identifiés à ce jour. Cependant, il a cependant été établi que le type d'infection à *P. aeruginosa* est très fortement lié au mode de vie adopté par les bactéries, à savoir planctonique ou sessile (Furukawa et al., 2006).

P. aeruginosa sous sa forme planctonique est généralement associée aux infections aiguës. Sous cette forme, les bactéries expriment des molécules adhésives telles que les pili ou le flagelle et sont très invasives et cytotoxiques. La toxicité envers les cellules de l'hôte est provoquée par la sécrétion de toxines et de protéases par différents facteurs de virulence, ainsi que par l'injection de toxines dans le cytoplasme des cellules par le biais de son Système de Sécrétion de Type 3 (SST3). Les infections de ce type sont généralement de courte durée, mais sont associées à des symptômes sévères. Les organes les plus fréquemment touchés par ce type d'infection sont l'arbre respiratoire, la vessie et la cornée.

Sous sa forme sessile, *P. aeruginosa* se comporte tout à fait différemment. Dans ce contexte, les bactéries adoptent un phénotype beaucoup moins agressif. Elles perdent leur mobilité (soit par mutation soit par dérégulation des gènes) et cessent d'exprimer les facteurs de virulence associés à sa cytotoxicité (Système de Sécrétion de Type 2 et de Type 3). *P. aeruginosa* peut alors, dans certains cas, adopter un phénotype dit « mucoïde », en sécrétant des molécules telles que des exopolysaccharides dont les alginates, ce qui lui permet de former des structures multibactériennes appelées biofilms. Le biofilm est une communauté structurée qui confère aux bactéries une protection efficace contre le système immunitaire et les traitements antibiotiques (Mulcahy et al., 2014). Les infections de ce type sont associées à des symptômes moins sévères que les infections aiguës, mais peuvent s'étendre sur de très longues périodes, pouvant atteindre plusieurs dizaines d'années. Les infections chroniques à *P. aeruginosa* touchent des catégories de patients bien spécifiques, la plus connue étant celle des patients atteints de mucoviscidose. Elles peuvent également toucher des patients souffrant de pneumonies chroniques, ou des patients chez qui des dispositifs médicaux, tels que des cathéters, ont été implantés sur de longues périodes (David et al., 2005).

Ces deux modes de vie, et donc les deux types d'infections qui leur sont associés, ne sont pas exclusifs mais au contraire complémentaires : des bactéries sous forme planctonique colonisent de nouveaux environnements et peuvent, sous certaines conditions spécifiques, se développer sous forme de biofilm. Une fois le biofilm arrivé à maturation, il pourra libérer de nouvelles bactéries planctoniques qui iront explorer de nouveaux environnements à coloniser (voir Figure 1) (Mikkelsen et al., 2011).

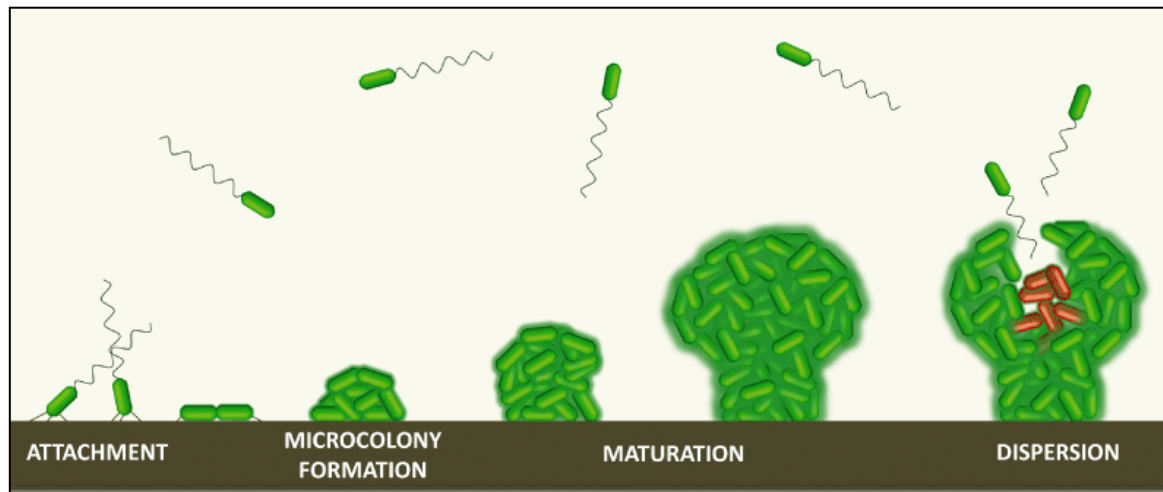


Figure 1 : Alternance de vie planctonique et vie sessile de *P. aeruginosa* (Mikkelsen et al., 2011)

B. Infections à *P. aeruginosa*

a. Incidence clinique des infections à *P. aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène opportuniste pour l'être humain : une défaillance des défenses de l'hôte est généralement nécessaire à l'établissement de l'infection. Cette défaillance peut être une faiblesse des barrières tissulaires de l'hôte (lésion de la peau ou des muqueuses) ou un affaiblissement de ses défenses immunitaires (patients atteints de mucoviscidose, de cancers ou du SIDA) (Lyczak et al., 2000). Les patients ayant subi des interventions chirurgicales invasives, notamment avec intubation ou pose de cathéter sont également susceptibles de développer des infections à *P. aeruginosa* (David et al., 2005).

Les infections à *P. aeruginosa* sont très souvent des infections nosocomiales. En France, *P. aeruginosa* est le troisième pathogène isolé à partir d'infections nosocomiales (8,4%), derrière

Escherichia coli (26%) et *Staphylococcus aureus* (15,9%) (voir Figure 2) (Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN)).

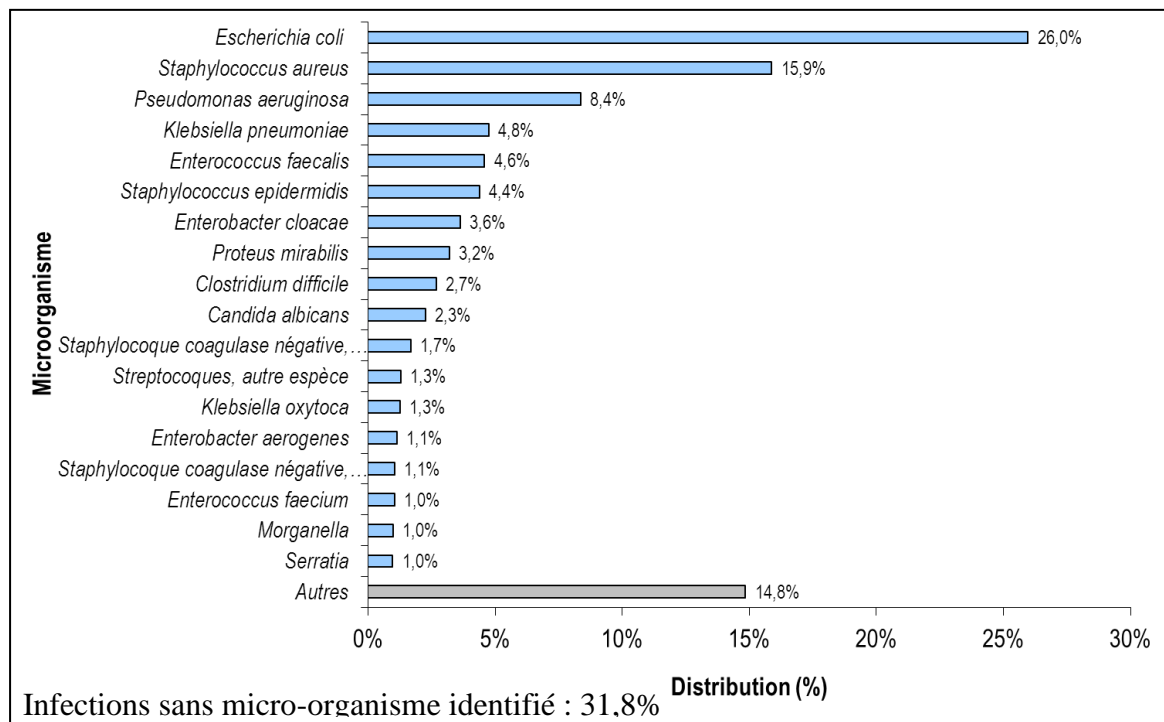


Figure 2 : Principaux microorganismes isolés à partir d'infections nosocomiales (étude menée sur 12581 patients) (RAISIN)

b. Principaux sites infectieux et facteurs de risque associés

L'occurrence des infections à *P. aeruginosa* varie grandement en fonction du site infectieux. Le Tableau 1 récapitule les infections nosocomiales les plus fréquemment rencontrées, ainsi que l'occurrence de *P. aeruginosa* pour chacun de ces types d'infection.

Type d'infection	Répartition des principaux sites infectieux (tous pathogènes confondus)	Incidence des infections à <i>P. aeruginosa</i>	Rang de <i>P. aeruginosa</i> parmi les pathogènes isolés
Infections urinaires	29,9%	6,9%	2 ^{ème}
Pneumonies	16,7%	18,1%	1 ^{er}
Infections du site opératoire	13,5%	6,9%	4 ^{ème}
Bactériémies (infections sanguines)	10,1%	5,8%	4 ^{ème}
Infections de la peau et des tissus mous	6,7%	44,1%	1 ^{er}

Tableau 1 : Types d'infections nosocomiales et prévalence de *P. aeruginosa*
Adapté de (RAISIN)

En France, en milieu hospitalier, les infections nosocomiales les plus fréquentes sont les infections urinaires et les infections du système respiratoire. *P. aeruginosa* est fréquemment isolée de ces deux types d'infections, et tout particulièrement dans le cas des infections pulmonaires, indiquant un fort tropisme de la bactérie pour cet organe. Les infections du système urinaire et de l'appareil respiratoire représentent plus de 50% des infections nosocomiales à *P. aeruginosa* (RAISIN).

D'autres types d'infections (infections du site opératoire après chirurgie, bactériémies, infections de la peau) sont également représentées, bien que moins fréquemment. Il est à noter que les infections de la peau ne représentent qu'une petite portion des infections nosocomiales, mais qu'elles sont très fréquemment associées à *P. aeruginosa*.

L'occurrence des infections nosocomiales à *P. aeruginosa* décrite dans cette étude est similaire à celle dans la plupart des pays européens et d'Amérique du Nord. Ainsi, dans une étude menée aux Etats-Unis sur 28500 patients atteints d'infections nosocomiales, *P. aeruginosa* représente 7,9% des pathogènes isolés lors d'infections nosocomiales. Cette proportion passe à 16,3% dans le cas des pneumonies sous ventilation mécanique, qui représentent approximativement 18% du total des infections nosocomiales (Hidron et al., 2008).

Par ailleurs, *P. aeruginosa* est capable de causer des infections aux manifestations cliniques très variées, selon le site initial d'infection et l'état de santé du patient atteint. Le Tableau 2

récapitule les infections à *P. aeruginosa* les plus courantes, ainsi que les facteurs de risque majeurs associés à ces pathologies.

Infection	Facteurs de risque majeurs
Peau et tissus « mous »	Brûlure, blessures, post-opératoire
Urinaire	Pose de cathéter urinaire
Bactériémie	Immunodéficience
Pied diabétique	Diabète, problèmes de circulation microvasculaire
Respiratoire / pneumonie	Age avancé, bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), mucoviscidose, ventilation mécanique
Otite externe	Endommagement des tissus, rétention d'eau dans le canal auditif
Kératite (infection de la cornée)	Contact prolongé avec des lentilles de contact, contamination des solutions de lavage des lentilles de contact
Folliculite (inflammation de follicules pileux)	Baignoire mal nettoyée

Tableau 2 : Infections à P. aeruginosa les plus communes et facteurs de risque majeurs (Gellatly and Hancock, 2013)

Il apparaît clairement que les facteurs de risque associés aux infections à *P. aeruginosa* peuvent être classés en 3 catégories :

- Les endommagements des barrières tissulaires de l'hôte : brûlure, blessure, opération chirurgicale, pose de cathéter, de sonde ou de respirateur, etc.
- Les dysfonctionnements du système immunitaire : immunodéficience, mucoviscidose, vieillesse, etc.
- Les expositions prolongées au pathogène, notamment en conditions humides : rétention d'eau dans le canal auditif, port de lentilles de contact, contact avec une baignoire mal nettoyée, etc.

Ces différents types d'infections pourraient également être classés selon le phénotype de l'infection : infections chroniques ou aiguës.

c. Infections chroniques à *P. aeruginosa*

Les infections chroniques à *P. aeruginosa* sont fréquentes chez les personnes atteintes de mucoviscidose ou de problèmes respiratoires chroniques (Williams et al., 2010). *P. aeruginosa* colonise et s'établit de manière durable dans certains organes de ces patients (les poumons pour les deux pathologies citées ci-dessus), induisant une inflammation chronique à l'origine d'une destruction progressive des tissus. Au cours des infections chroniques, le franchissement des barrières tissulaires par *P. aeruginosa*, qui est le sujet de cette thèse, n'existe pas ou peu. Pour cette raison, ce type d'infection ne sera que brièvement décrit.

i. *Caractéristiques de l'infection chronique à P. aeruginosa*

Les infections chroniques à *P. aeruginosa* sont associées à la vie sous forme de biofilm des bactéries. Ce type d'infection peut toucher diverses catégories de patients. Les patients les plus touchés sont les personnes atteintes de mucoviscidose, la maladie génétique la plus fréquente dans la population caucasienne. La colonisation des poumons de ces patients par *P. aeruginosa* est généralement associée à une dégradation de leur état de santé. Les bactéries s'établissent de façon durable dans les poumons, entraînant peu à peu une réduction de la capacité pulmonaire, conduisant à une forte insuffisance respiratoire qui est généralement à l'origine du décès du patient.

D'autres patients peuvent également être touchés par des infections chroniques à *P. aeruginosa*. Ce sont souvent des patients atteints de problèmes respiratoires, ou pour qui des cathéters ont été implantés.

ii. *Infection de patients atteints de mucoviscidose*

P. aeruginosa a été le plus communément étudié dans le contexte d'infection de patients atteints de mucoviscidose. Dans ce contexte, la principale cause de mortalité des patients est l'inflammation pulmonaire chronique déclenchée par ce pathogène (Doring, 2012).

La mucoviscidose est une maladie génétique récessive. Elle est liée à des mutations du gène CFTR, entraînant une altération de la protéine CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Cette protéine, présente majoritairement dans les épithéliums glandulaires mais aussi dans de nombreux organes, forme un canal permettant le transport d'ions chlorure à travers les membranes cellulaires. L'absence de fonctionnalité de cette

protéine chez les personnes souffrant de mucoviscidose entraîne de graves troubles gastro-intestinaux, endocriniens, métaboliques et pulmonaires. L'atteinte pulmonaire, particulièrement dramatique, est liée à une augmentation de la viscosité du mucus, ce qui empêche son élimination des poumons par le système de clairance muco-ciliaire. L'obstruction des voies aériennes inférieures qui en résulte crée un terrain favorable pour la colonisation par différents pathogènes, dont *P. aeruginosa*.

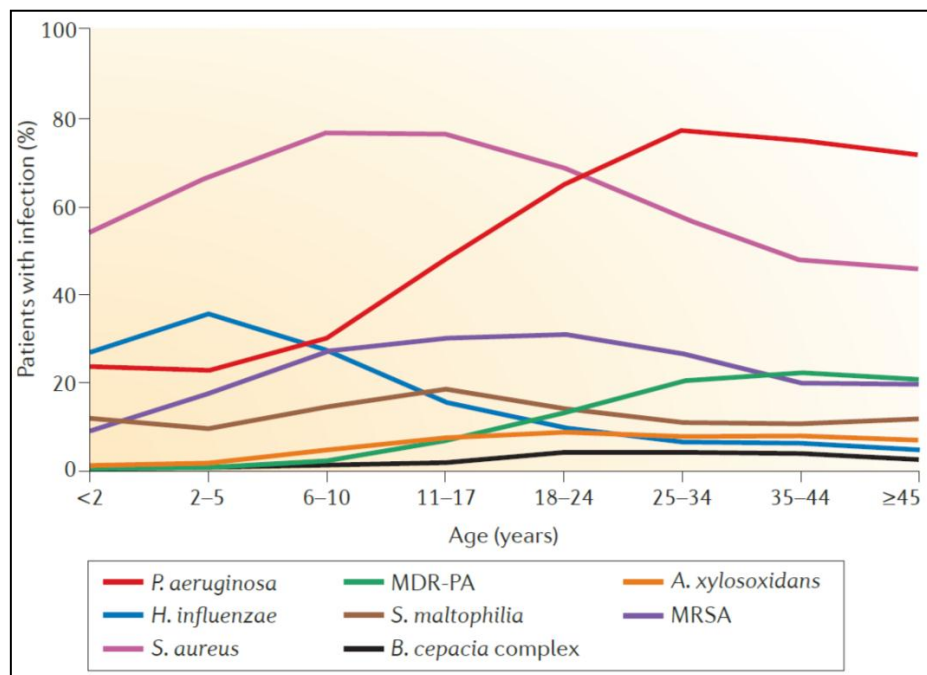


Figure 3 : Colonisation des poumons de patients atteints de mucoviscidose par les pathogènes bactériens (Folkesson et al., 2012)

Comme illustré dans la Figure 3, *P. aeruginosa* ne s'établit que tardivement dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose en comparaison à d'autres pathogènes tels que *Staphylococcus aureus* (Folkesson et al., 2012). L'établissement de *P. aeruginosa* débute par des phases de colonisation intermittentes récurrentes, puis évolue vers un état d'infection chronique. Au cours de cette colonisation, *P. aeruginosa* subit une forte adaptation génétique et phénotypique à ce nouvel environnement en accumulant un certain nombre de mutations génétiques et en sous-exprimant certains de ses gènes. Les adaptations phénotypiques qui en résultent comprennent notamment une augmentation de la résistance aux antibiotiques, une perte de mobilité, une production d'exopolysaccharides, ou encore une diminution de certains facteurs de virulence (Cullen and McClean, 2015). Ces modifications permettent à *P. aeruginosa* de perdurer sous forme de biofilm dans le mucus pulmonaire très épais et

visqueux des patients atteints de mucoviscidose (Hoiby et al., 2010). La croissance sous forme de biofilm permet aux bactéries d'adhérer au mucus (et non pas directement aux cellules épithéliales) et de résister au système immunitaire de l'hôte, ainsi qu'aux agents antimicrobiens utilisés pour le traitement de l'hôte (Breidenstein et al., 2011). *P. aeruginosa* va alors sécréter des composants (lipopolysaccharide, lectines, alginates, pyocyanine) qui génèrent une forte réponse inflammatoire, très destructrice pour les tissus mais pas pour le pathogène (Gellatly and Hancock, 2013).

iii. Autres infections chroniques à P. aeruginosa

Bien que la mucoviscidose soit la pathologie la plus associée aux infections chroniques à *P. aeruginosa*, il existe d'autres situations pour lesquelles des infections chroniques peuvent être un problème majeur. Parmi ces différentes situations, on retrouve d'autres pathologies respiratoires, des infections du système urinaire liées à la pose de cathéters, ou encore des infections chroniques suite à des blessures ou des brûlures (Mulcahy et al., 2014).

Parmi les pathologies respiratoires créant un terrain favorable aux infections chroniques par *P. aeruginosa*, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est la plus fréquemment associée à une comorbidité (Holm et al., 2013). La BPCO est caractérisée par une obstruction lente et progressive des poumons, liée à une distension permanente des alvéoles pulmonaires. D'autres pathologies, telles que la bronchiectasie (dilatation des bronches), le cancer du poumon ou l'asthme, peuvent également être associées à des infections chroniques par *P. aeruginosa* (Holm et al., 2013).

P. aeruginosa peut également être associée à des infections chroniques ne concernant pas le poumon. Elle est la deuxième bactérie la plus fréquemment isolée dans le cas d'infections urinaires (isolée dans 6,9% contre 49,8% pour *Escherichia coli*) (RAISIN). Les infections urinaires sont les infections nosocomiales les plus fréquentes en France (Cf. Tableau 1). Les infections urinaires à *P. aeruginosa* peuvent être des infections aiguës ou chroniques. Dans les deux cas, elles sont quasiment systématiquement associées à une pose de cathéter (Mittal et al., 2009). Plusieurs études ont démontré que *P. aeruginosa* est capable de croître sous forme de biofilm à la surface des cathéters ou des tubes de ventilation (Mulcahy et al., 2014).

Enfin, *P. aeruginosa* peut infecter des lésions locales de l'épiderme, et empêcher leur guérison. La catégorie de patients la plus susceptible de développer ce genre de « blessure

chronique » est celle des diabétiques, qui peuvent présenter des problèmes de circulation sanguine au niveau de leurs extrémités (Mulcahy et al., 2014).

d. Infections aiguës à *P. aeruginosa*

Les manifestations cliniques des infections aiguës sont extrêmement différentes de celles observées pour les infections chroniques. *P. aeruginosa* présente un phénotype beaucoup plus agressif, induisant une réponse inflammatoire intense et une destruction tissulaire marquée. Les infections aiguës à *P. aeruginosa* sont presque exclusivement des infections nosocomiales et les patients touchés présentent généralement des dysfonctionnements tissulaires ou immunitaires. Les infections aiguës seront décrites en détail dans ce chapitre, car c'est au cours de celles-ci qu'ont lieu les phénomènes de franchissement des barrières tissulaires qui nous intéressent dans cette étude.

*i. Caractéristiques de l'infection aiguë à *P. aeruginosa**

Les infections aiguës à *P. aeruginosa* sont généralement brèves et caractérisées par une forte multiplication bactérienne. Les bactéries, très mobiles grâce à leur flagelle et leurs pili, expriment fortement certains facteurs de virulence, notamment leurs Systèmes de Sécrétion de Type 2 et de Type 3 (Gellatly and Hancock, 2013).

Au cours de l'infection, elles sont confrontées à plusieurs barrières tissulaires, dont une barrière épithéliale. Cet épithélium constitue la première ligne de défense de l'organisme contre les agents infectieux. Il constitue une barrière physique contre les pathogènes, mais joue également un rôle de sentinelle qui active la réponse immunitaire en cas de détection d'un agent pathogène. Les cellules épithéliales disposent en effet de récepteurs de type Toll (Toll-Like Receptors TLR) leur permettant de détecter les bactéries (Gellatly and Hancock, 2013). Si ces récepteurs sont activés, les cellules épithéliales émettent des cytokines et des chemokines. Ceci, associé aux signaux émis par les macrophages résidant sur le site d'infection, permet le recrutement et l'activation des cellules de l'immunité, dont les neutrophiles (Williams et al., 2010).

Au cours de l'infection aiguë, un combat s'engage entre bactéries et cellules. Les neutrophiles jouent un rôle majeur dans l'endiguement de l'infection en phagocytant les bactéries pathogènes et en libérant des espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS)

dans l'environnement du site infectieux. Ces deux mécanismes permettent l'élimination des bactéries mais entraînent également une forte réponse inflammatoire, pouvant déclencher localement un œdème (Gellatly and Hancock, 2013).

Dans certains cas, l'épithélium pourra être franchi par les bactéries au cours de l'infection. Dans ce contexte, *P. aeruginosa* pourra échapper aux mécanismes de défense de l'organisme et accéder au système sanguin, notamment si le système immunitaire du patient est affaibli. Les bactéries vont alors se disséminer dans le sang (voir Figure 4). On parle de bactériémie, qui correspond à une complication grave de l'infection et qui est généralement associée à un mauvais pronostic vital pour le patient (Micek et al., 2005). Les bactéries pourront ensuite franchir la barrière endothéliale et provoquer des atteintes dans d'autres organes. Si l'infection n'est pas endiguée rapidement par un traitement antibiotique approprié, les bactéries pourront également induire un choc septique, c'est-à-dire une défaillance circulatoire aiguë pouvant entraîner la mort du patient (Micek et al., 2005).

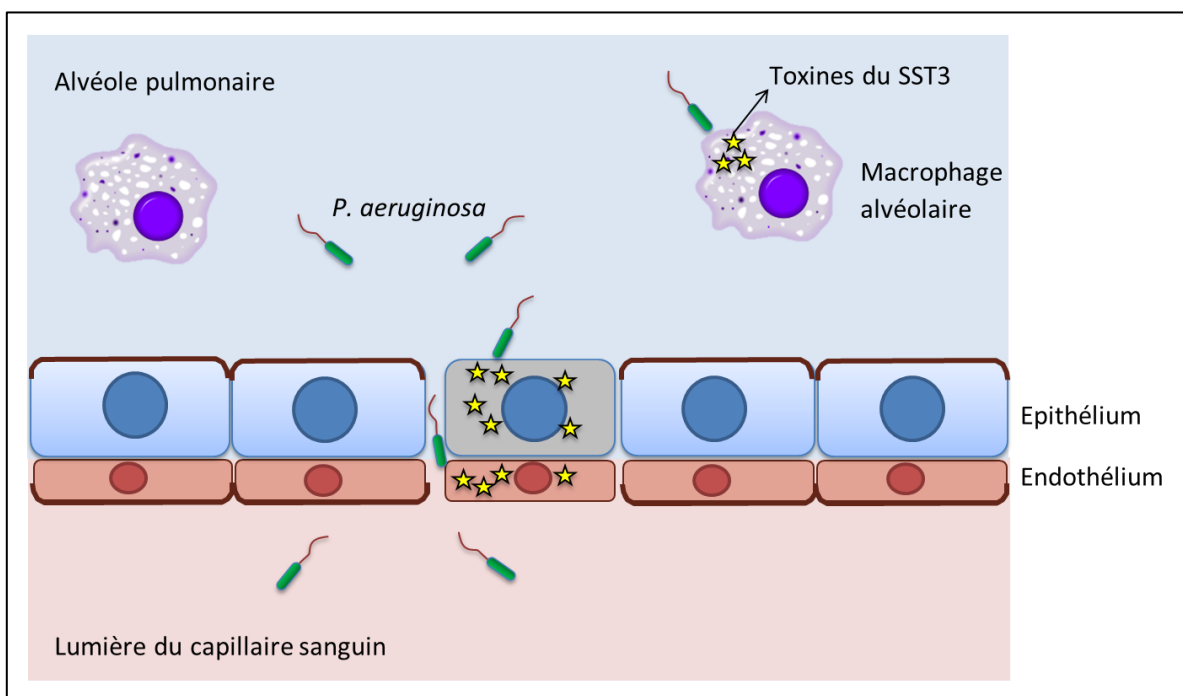


Figure 4 : Dissémination de *P. aeruginosa* au cours de l'infection pulmonaire aiguë

Il est à noter que pour certaines infections aiguës, les bactéries pathogènes n'ont pas à franchir de barrière tissulaire mais accèdent directement au sang. C'est le cas par exemple lorsque le point d'entrée de la bactérie dans l'organisme est un cathéter veineux.

Dans ce manuscrit, l'interaction entre *P. aeruginosa* et les cellules épithéliales et endothéliales sera largement détaillée. En revanche, l'interaction entre *P. aeruginosa* et les cellules de l'immunité ne sera pas abordée, car elle n'entre pas dans le cadre de ce projet de thèse.

ii. Types d'infections aiguës

Les manifestations cliniques d'infections aiguës à *P. aeruginosa* peuvent être extrêmement variées. Néanmoins, la majeure partie des infections aiguës constatées sont, comme pour les infections chroniques, des pneumonies ou des infections du système urinaire.

Les pneumonies aiguës touchent principalement les patients dont les voies aériennes sont endommagées, par exemple par des systèmes de ventilation mécanique ou après un traumatisme (Sadikot et al., 2005). Parmi les différents types d'infections nosocomiales pulmonaires, les pneumonies de patients sous ventilation mécanique en service de soins intensifs (les « ventilator-associated pneumonia ») sont celles avec la plus forte mortalité, allant jusqu'à 30% dans certains établissements (Williams et al., 2010). Les patients immunodéprimés sont également susceptibles de développer des infections pulmonaires aiguës (Williams et al., 2010).

P. aeruginosa peut aussi être associée à des infections du système urinaire. La distinction entre infections chroniques et aiguës n'est pas aisée dans ce contexte, car ce type d'infection peut mener à la formation de biofilm en surface du cathéter (infection chronique), mais peut également être à l'origine de bactériémies (infection aiguë) (Mittal et al., 2009).

P. aeruginosa est également associée à des infections oculaires, notamment des kératites (inflammation de la cornée). Ces infections font généralement suite à un léger traumatisme de la cornée suite au port de lentilles de contact (Willcox, 2007). De même, des infections auriculaires à *P. aeruginosa* sont aussi rapportées (Schaefer and Baugh, 2012). Ces deux types d'infections résultent du tropisme de *P. aeruginosa* pour les milieux humides.

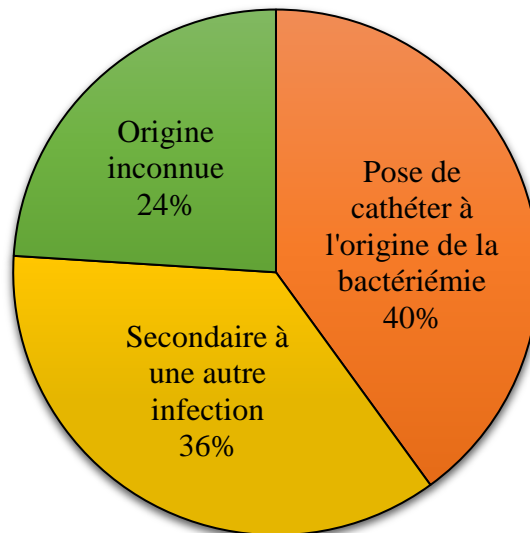
Des infections de l'appareil digestif ont également été documentées. Elles affectent généralement des enfants en bas-âge ou des adultes neutropéniques.

En outre, *P. aeruginosa* peut infecter d'autres organes, bien que ces infections soient moins fréquentes. On constate notamment des endocardites (inflammation de la paroi des valves cardiaques, principalement chez les toxicomanes pratiquant des injections intraveineuses), des infections du système nerveux central, ou encore des infections des os ou des articulations (ce sont principalement les vertèbres qui sont touchées, suite à une infection du système urinaire) (www.medscape.com).

iii. Les infections sanguines, cas particuliers d'infections aiguës

Comme mentionné précédemment, les bactériémies, ou infections sanguines, sont des contaminations transitoires du sang par un germe. Elles peuvent résulter de deux situations distinctes : soit les pathogènes ont directement accès au système sanguin (ce qui est le cas des infections liées à un cathéter veineux), soit ils ont accès au système sanguin suite à un franchissement des barrières tissulaires à partir d'un premier site d'infection. Dans ces deux situations, les bactériémies sont associées à un mauvais pronostic vital pour le patient si un traitement antibiotique approprié n'est pas mis en place rapidement (Micek et al., 2005). Elles peuvent ensuite dégénérer en septicémie (contamination grave et durable du sang par un germe) voire en choc septique (défaillance circulatoire aiguë, entraînant des désordres hémodynamiques, métaboliques et viscéraux, déclenchée par un agent infectieux) dans les cas les plus graves (Angus and van der Poll, 2013).

Selon une étude menée par le Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN) sur 12 581 patients infectés, les bactériémies représentent 10% des infections nosocomiales en France (données de 2012). La pose d'un cathéter est à l'origine de 40% des bactériémies. Pour les autres bactériémies, l'origine de l'infection était documentée dans 60% des cas : ces bactériémies sont secondaires à une première infection, dont les plus fréquemment rapportées sont les infections urinaires ou digestives (voir Figure 5). Les pathogènes les plus fréquemment isolés de bactériémies nosocomiales sont *Staphylococcus aureus* (18,4% des cas), *Escherichia coli* (15,4%) et *Staphylococcus epidermidis* (14,4%). *P. aeruginosa* est le quatrième microorganisme le plus fréquemment isolé (5,8% des cas) (RAISIN).



*Figure 5 : Origine des bactériémies
Adapté de (RAISIN)*

Au cours d'une bactériémie, *P. aeruginosa* est en contact direct avec les cellules endothéliales. L'interaction entre *P. aeruginosa* et ce type cellulaire spécifique constitue l'objet de la première étude présente dans ce manuscrit.

Chapitre II : Les facteurs de virulence de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa possède de nombreux facteurs de virulence, qui sont en fait les « armes » dont dispose la bactérie pour coloniser différents hôtes (végétaux ou animaux). L'expression de ces facteurs de virulence est très finement régulée : chaque facteur de virulence sera exprimé ou non en fonction du contexte dans lequel se trouve la bactérie. Ainsi, certains facteurs de virulence, tels que le flagelle, les pili ou certains systèmes de sécrétion, seront exprimés au cours de l'infection aiguë, mais ne seront généralement pas exprimés dans le contexte d'une infection chronique (Gellatly and Hancock, 2013).

Dans ce chapitre, les facteurs de virulence jouant un rôle important au cours de l'infection aiguë, et notamment dans les phénomènes d'interaction avec les cellules épithéliales et endothéliales seront présentés de manière détaillée. Parmi ceux-ci, sont compris les appendices extracellulaires qui permettent la mobilité de *P. aeruginosa* (le flagelle et les pili de type IV) et deux des cinq systèmes de sécrétion utilisés par *P. aeruginosa* pour la sécrétion de molécules dans le milieu extracellulaire ou l'injection de toxines dans des cellules eucaryotes (les Systèmes de Sécrétion de Type 2 et de Type 3).

Les facteurs de virulence ayant un rôle moins avéré dans l'infection aiguë, ou étant uniquement impliqués dans les infections chroniques, ne seront que rapidement évoqués dans ce chapitre.

A. Le flagelle

Le flagelle est considéré comme l'un des facteurs de virulence majeurs de *P. aeruginosa* car, outre sa fonction dans la mobilité de la bactérie en milieu liquide et semi-solide, il joue également un rôle important dans l'adhésion à des surfaces solides. La flagelline, le

constituant principal du flagelle, est également un des principaux activateurs de la réponse inflammatoire de l'hôte.

a. Structure du flagelle

Le flagelle est l'appendice externe le plus communément utilisé par les bactéries pour se déplacer en milieu liquide. Le nombre de flagelles et leur arrangement à la surface de la bactérie varie fortement d'une espèce de bactérie à une autre. *P. aeruginosa* est une bactérie monotriche, c'est-à-dire qu'elle ne possède qu'un seul flagelle, situé à un de ses deux pôles (voir Figure 6). Ce flagelle a une longueur de 15 à 20 μm , et permet le déplacement de la bactérie en milieu liquide (nage) ou en milieu semi-solide (essaimage ou « swarming »).

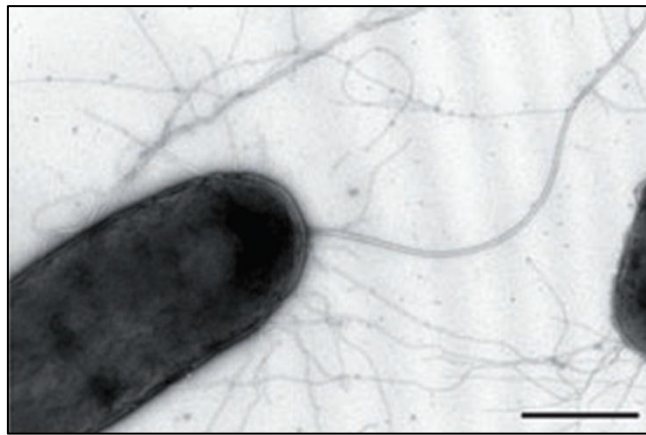


Figure 6 : Image en microscopie électronique du flagelle et des pili de *P. aeruginosa*. Le flagelle est le filament le plus long, les pili sont les petits filaments de diamètre inférieur. Barre d'échelle : 500 nm (Heiniger et al., 2010)

La structure du flagelle des bactéries à Gram négatif peut être divisée en trois sous-unités (Cf. Figure 7) :

- Le corps basal (« stator » et « rotor »), qui est ancré dans la membrane cellulaire et fournit l'énergie nécessaire à la rotation du flagelle
- Le filament en forme d'hélice, composé principalement de la protéine flagelline (Belas, 2014).
- Le crochet (« hook »), qui sert de lien entre le corps basal et le filament.

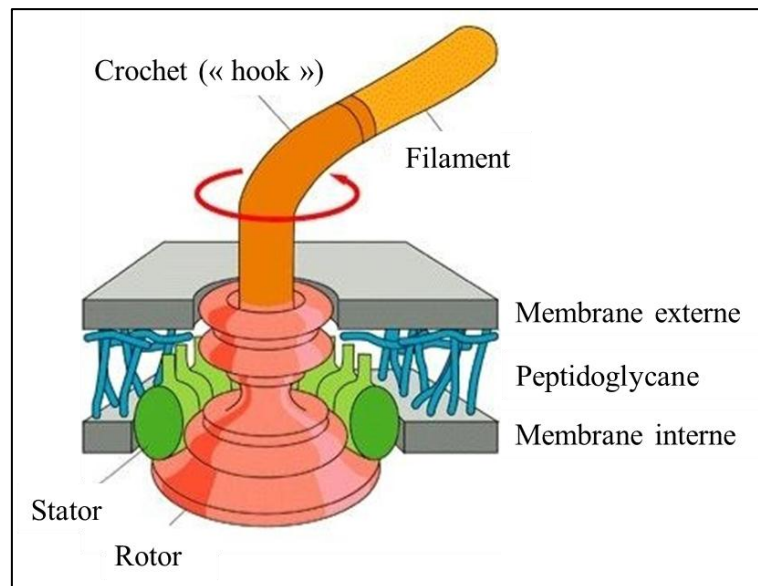


Figure 7 : Structure du flagelle des bactéries à Gram négatif adapté de (Madigan)

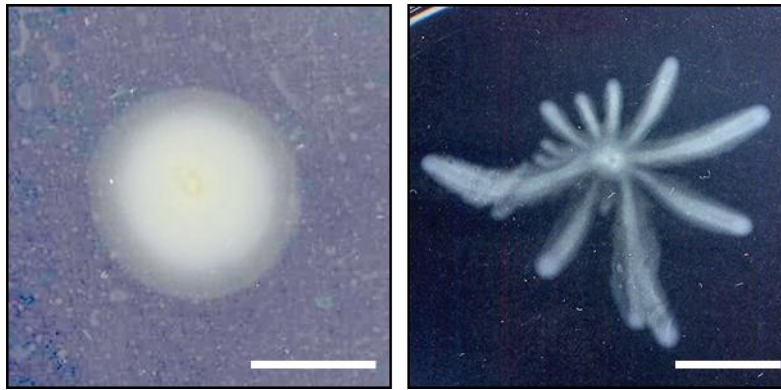
b. Mobilité et adhésion médiées par le flagelle

i. Mobilité

Le flagelle permet à *P. aeruginosa* d'opérer deux types de mobilité, qui seront mis en place par la bactérie en fonction de la viscosité du milieu dans lequel elle se trouve.

Le type de mobilité médié par le flagelle le mieux compris à ce jour est la nage. Ce type de mobilité est utilisé par *P. aeruginosa* en milieu liquide de viscosité faible (*in vitro*, des milieux LB contenant jusqu'à 0,3% d'agar sont utilisés pour l'observer, tel que montré dans la Figure 8). La force motrice générée par l'ATPase située dans le corps basal du flagelle imprime un mouvement de rotation au filament du flagelle. Cette rotation entraîne une propulsion de la bactérie (vers l'avant ou l'arrière selon le sens de rotation du flagelle). La nage est le type de mobilité bactérienne le plus rapide, car il permet aux bactéries d'atteindre des vitesses de plusieurs dizaines de micromètres par seconde (Conrad et al., 2011).

Le swarming est un type de mobilité bien moins compris. Ce mode de migration collective est utilisé par *P. aeruginosa* sur des surfaces semi-solides. Tout comme pour le swimming, la présence d'un flagelle fonctionnel semble indispensable. Cependant, le swarming dépend également d'autres éléments tels que le quorum sensing ou la production de biosurfactants (Wang et al., 2014). Ce type de mobilité peut être observé *in vitro* sur des géloses contenant 0,5% d'agar, comme montré dans la Figure 8.



*Figure 8 : Visualisation macroscopique sur gélose du swimming (gauche) et du swarming (droite) de *P. aeruginosa**
Barres d'échelle : 1 cm (données non publiées)

ii. Adhésion

Par ailleurs, le flagelle joue un rôle important dans l'adhésion de *P. aeruginosa*. Ainsi, Bruzard et ses collaborateurs ont montré que l'adhésion à des surfaces hydrophobes dépend essentiellement du flagelle, tandis que les pili ne sont pas impliqués (Bruzard et al., 2015). De même, le flagelle est important pour l'interaction avec les cellules épithéliales. Bucior et ses collaborateurs ont montré que le flagelle est nécessaire et suffisant à la liaison aux protéoglycanes à sulfate d'héparane (molécules associée au domaine basal des cellules qui sont importantes notamment pour l'adhésion à la matrice extracellulaire) du côté basal des cellules épithéliales polarisées (Bucior et al., 2012).

c. Chimiotactisme et flagelle au cours du swimming

Le flagelle se compose principalement d'un filament rigide en forme d'hélice. Par rotation de ce flagelle, *P. aeruginosa* peut se propulser à des vitesses élevées (environ 60 $\mu\text{m/s}$) (Conrad et al., 2011). Les bactéries sont propulsées vers l'avant lorsqu'elles font tourner leur flagelle dans le sens contraire des aiguilles d'une montre, et vers l'arrière quand le flagelle tourne dans le sens des aiguilles d'une montre. Les bactéries peuvent suivre un signal chimiotactique en utilisant une cascade de signalisation élaborée, jouant sur la fréquence d'inversion du sens de rotation du moteur du flagelle (Qian et al., 2013).

Chez *P. aeruginosa*, 26 gènes codant pour des chémorécepteurs (*i.e.* des protéines ancrées dans la membrane servant à la détection de signaux environnementaux) ont été identifiés (Kato et al., 2008). De nombreux composés, ayant des structures chimiques diverses (acides aminés, composés aromatiques, dérivés du furane, etc.) ont un effet chémoattractant

(Sampedro et al., 2015). Les signaux captés par les chémorécepteurs sont ensuite transmis au flagelle par le biais d'une cascade de signalisation appelée le système Che, composé d'au moins 20 protéines (Kato et al., 2008).

d. Importance du flagelle au cours de l'infection

Le rôle joué par le flagelle dans l'infection aiguë est à ce jour encore ambigu. Le flagelle joue un rôle prépondérant dans la mobilité de *P. aeruginosa* et dans son adhésion aux cellules épithéliales, mais il déclenche également une forte réponse immunitaire.

Le flagelle est l'activateur spécifique du Récepteur de Type Toll 5 (Toll-Like Receptor 5, TLR5). Le TLR5 est un récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes. Il est exprimé sur les cellules de l'immunité (macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles) et aussi dans la membrane apicale des cellules épithéliales pulmonaires (Prince, 2006). La reconnaissance de la flagelline par le TLR5 déclenche l'émission de signaux pro-inflammatoires et la sécrétion de mucine. La mucine, composant principal du mucus, se lie de manière spécifique au flagelle de *P. aeruginosa* (Ramphal and Arora, 2001) et favorise l'élimination du pathogène par l'escalator mucociliaire (voir Chapitre III). La motilité bactérienne médiée par le flagelle (et non pas le flagelle directement) est par ailleurs l'élément déclencheur de la phagocytose par les cellules de l'immunité innée (Amiel et al., 2010).

Plusieurs études se sont penchées sur l'importance du flagelle au cours de l'infection. Feldman et ses collaborateurs ont pu montrer dans un modèle murin néonatal de pneumonie aiguë que le flagelle est essentiel à l'établissement de l'infection. Ils ont montré que des mutants de *P. aeruginosa* sans flagelle peuvent causer une inflammation locale à l'endroit où ils sont instillés, mais ne peuvent pas disséminer dans le poumon ou vers le système sanguin (Feldman et al., 1998). Dans un autre modèle de pneumonie aiguë, Balloy et ses collaborateurs ont quant à eux étudié les rôles joués respectivement par la flagelline et par le swimming. Les conclusions de cette étude sont que, dans ce modèle d'infection, la flagelline est la principale responsable de la mortalité des souris, et non pas la mobilité médiée par le flagelle (Balloy et al., 2007). Ces deux modèles, contradictoires à première vue, laissent supposer un double rôle joué par le flagelle : la mobilité qu'il permet serait importante dans les phases précoces de l'infection afin de permettre la dissémination bactérienne, puis ce

serait son rôle de déclencheur de l'inflammation qui deviendrait capital dans les phases plus tardives.

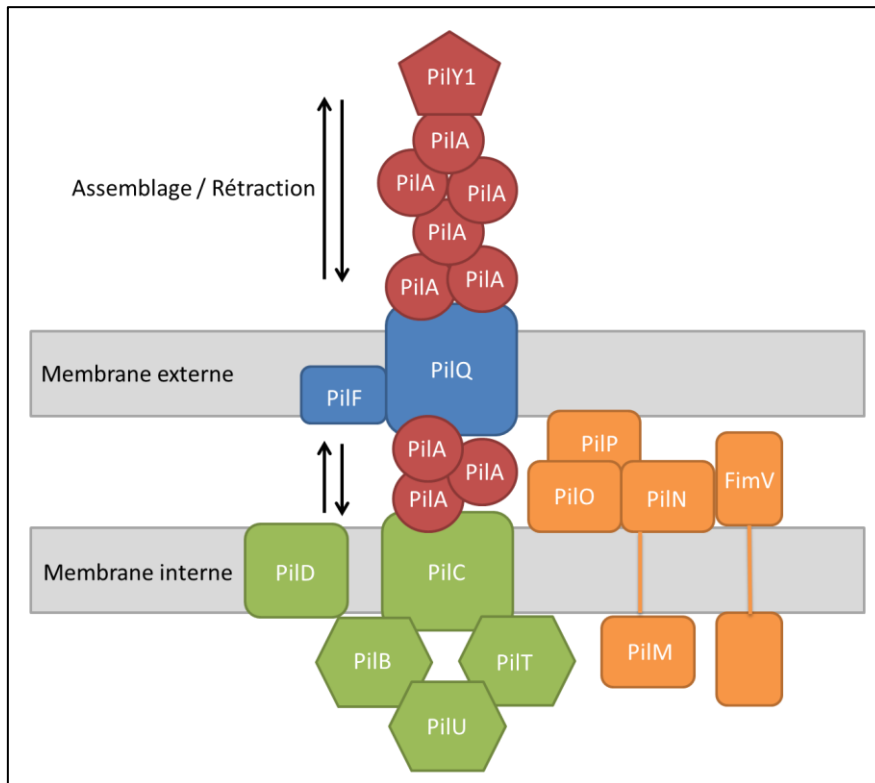
Il est à noter que de nombreux isolats cliniques collectés à partir d'infections chroniques ont perdu leur flagelle ou sous-expriment les gènes de synthèse du flagelle ou de mobilité (Wolfgang et al., 2004). Cette adaptation phénotypique s'explique par la forte pression de sélection exercée sur les bactéries flagellée par le système immunitaire. En perdant leur flagelle, les bactéries sont moins facilement reconnues par les cellules de l'immunité, et peuvent ainsi coloniser de manière durable l'organe cible.

B. Les pili de type IV

Les pili de type IV sont des structures situées en surface des cellules. Il existe deux types de pili de type IV : les IVa et les IVb. Les pili de type IVa sont des appendices extracellulaires indispensables à la virulence de *P. aeruginosa*. Ils sont impliqués dans l'adhésion à des surfaces abiotiques ou aux cellules, et permettent plusieurs types de mobilité, dont le « twitching » (sorte de reptation des bactéries par interaction avec une surface). Les pili de type IVb sont des pili de type conjugatifs, qui servent au transfert d'éléments génétiques d'une bactérie à l'autre. Leur implication dans la virulence de *P. aeruginosa* n'est à ce jour pas démontrée. Dans ce paragraphe, seuls les pili de type IVa seront décrits, et seront désignés sous le terme « pili ».

a. Structure du pilus

Les pili sont des filaments très flexibles de diamètre compris entre 5 et 8 nm (Beaussart et al., 2014). Ils peuvent former des structures très longues, allant jusqu'à plusieurs microns (Burrows, 2012) (voir Figure 6). Le nombre de pili varie fortement d'une bactérie à l'autre au sein d'une culture, mais est généralement inférieur à 5 pili par bactérie (Beaussart et al., 2014; Weiss, 1971).



*Figure 9 : Schéma de pilus de P. aeruginosa
Adapté de (Burrows, 2012)*

Les pili sont des appendices qui peuvent être décomposés en quatre sous-complexes (voir Figure 9) :

- Un sous-complexe inséré dans la membrane externe, comprenant notamment une sécrétine (PilQ)
- Un sous-complexe inséré dans la membrane interne qui est composé notamment de trois ATPases, l'une fournissant l'énergie nécessaire à la polymérisation du pilus (PilB), et les deux autres à sa dépolymérisation (PilT et PilU)
- Un complexe dit « d'alignement », dont la fonction supposée est de créer une connexion physique entre les sous-complexes des membranes externes et internes (PilmNOP et FimV)
- Le pilus lui-même, qui est composé de sous-unités de la piline majeure PilA et de pilines mineures, ainsi que de l'adhésine PilY1, située à l'extrémité du pilus.

Cette dernière partie est la plus dynamique des quatre, puisqu'elle est synthétisée et désassemblée continuellement.

b. Mobilité et adhésion médiée par les pili

i. Mobilité

Deux principaux types de mobilités pour lesquels les pili sont impliqués ont été décrits : le swarming et le twitching.

Comme mentionné plus haut, le flagelle semble être indispensable au swarming, mais les pili sont également impliqués, bien que leur rôle exact reste incertain. Une étude récente à ce sujet suggère que les pili ne sont pas impliqués directement dans le déplacement des bactéries, mais favoriseraient le déplacement en groupe en renforçant l'interaction entre les bactéries (Anyan et al., 2014).

Le twitching est de loin le type de mobilité impliquant les pili le mieux compris. Ce mode de migration collective est exclusivement médié par les pili. Il s'opère *in vitro* sur des surfaces humides de viscosité moyenne (classiquement 1% agar) (voir Figure 10). Bien que des bactéries individuelles puissent se déplacer, elles s'associent généralement pour former des structures appelées « radeaux » ou « rafts ». Dans ces groupes, les bactéries sont généralement alignées le long de leur axe longitudinal (voir Figure 10) (Gloag et al., 2013b).

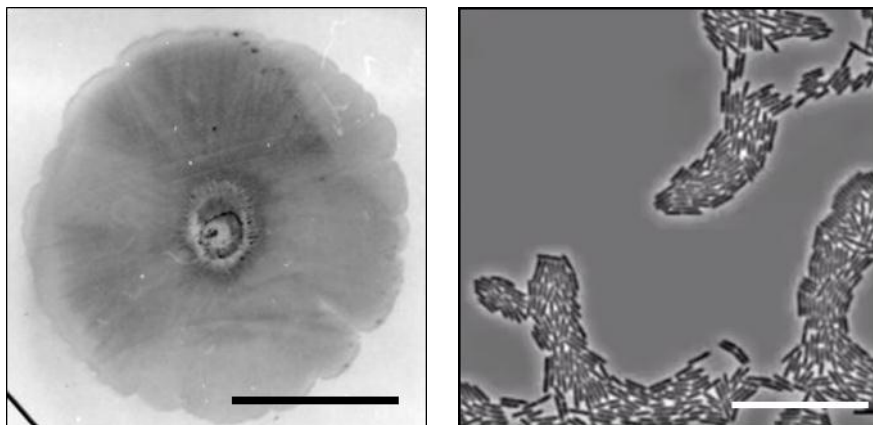


Figure 10 : Vue macroscopique (gauche) et microscopique (droite) du twitching de *P. aeruginosa* sur gélose
 (Gauche) Barre d'échelle : 1 cm (données non publiées) ; (Droite) Barre d'échelle : 15 μ m
 (Gloag et al., 2013b)

Le twitching de *P. aeruginosa* est un phénomène extrêmement complexe. Plusieurs groupes ont récemment mis en place de nouvelles approches par microscopie pour étudier ce phénomène, ce qui a permis de mieux l'appréhender. Ces auteurs ont mis en évidence le fait

que les bactéries forment des sillons dans la gélose au fur et à mesure de leur progression, ce qui guide les bactéries suivantes (Gloag et al., 2013a). Le twitching repose également sur la production de signaux permettant le guidage des bactéries : ADN extracellulaire (Gloag et al., 2013b) et exopolysaccharide Psl (Zhao et al., 2013). D'autres signaux environnementaux, comme l'ATP extracellulaire, ont quant à eux pour effet d'inhiber le twitching (Nolan et al., 2015).

Swarming et twitching sont des types de mobilités qui permettent à *P. aeruginosa* d'explorer de nouveaux environnements à l'échelle macroscopique. Par exemple, le twitching pourrait être important au cours d'infections en permettant l'expansion de biofilms le long de systèmes médicaux implantés tels que des cathéters (Gloag et al., 2013a).

Les pili peuvent également être impliqués dans des processus d'exploration de l'environnement à l'échelle microscopique. Ainsi, Conrad et ses collaborateurs ont récemment décrits de nouveaux types d'interactions avec des surfaces abiotiques : le crawling et le walking (Conrad et al., 2011), qui sont des phases d'attachement transitoire de *P. aeruginosa*, suivies d'une exploration locale de la surface.

ii. *Adhésion à des surfaces abiotiques*

Les pili sont également très importants pour l'adhésion à des surfaces abiotiques et pour la formation de biofilms : un mutant de *P. aeruginosa* déficient en pili aura la capacité de former des agrégats bactériens sans former l'architecture complexe développée par la souche parentale (Conrad et al., 2011). Une étude intéressante, dans laquelle des cocultures de *P. aeruginosa* avec ou sans pili ont été réalisées, a permis de montrer que les pili servent aux bactéries à escalader l'agrégat formé, et leur permettent d'accéder aux couches supérieures du biofilm (Barken et al., 2008).

c. Chimiotactisme et pili

Le twitching de *P. aeruginosa* est contrôlé par plusieurs systèmes de régulation qui perçoivent des signaux extérieurs et les transduisent pour moduler l'extension et la rétraction des pili. La majorité des signaux perçus est encore inconnue. Certains signaux ont cependant été identifiés : ils peuvent être de nature physique (par exemple la viscosité) ou chimiques (phospholipides, fer) (Burrows, 2012). La régulation de l'assemblage des pili implique

notamment le système de chimiotactisme Pil-Chp. Ce système, bien que plus complexe, possède des similarités avec le système Che qui contrôle la rotation du flagelle.

d. Interaction entre pili et cellules hôtes

i. Récepteurs cellulaires des pili

Les pili sont particulièrement importants pour l'interaction avec des cellules. La situation la plus étudiée est l'interaction entre *P. aeruginosa* et des cellules épithéliales. Le flagelle et les pili sont les deux acteurs majeurs de cette interaction, et interagissent avec différents récepteurs à la surface apicale et la surface basale des cellules épithéliales (Bucior et al., 2012). Du côté apical des cellules, les pili interagissent avec les N-glycanes (polymères composés de monosaccharides reliés entre eux par une liaison glycosidique) (Bucior et al., 2012). Les Asialo Gangliosides M1 (aG_{M1} : exprimés sur la surface apicale des cellules épithéliales respiratoires) ont également été proposés comme cibles potentielles des pili (de Bentzmann et al., 1996), mais ce résultat a été contesté par plusieurs groupes (Emam et al., 2006; Schroeder et al., 2001b). Du côté basal des cellules, les pili interagissent spécifiquement avec les intégrines (Roger et al., 1999). Cette interaction est médiée par l'adhésine PilY1, située au bout du pilus, par reconnaissance d'un motif RGD (Johnson et al., 2011).

ii. Lien entre pili et injection des toxines

Les pili sont par ailleurs nécessaires à l'injection des toxines par le SST3, car ils permettent un contact rapproché entre bactérie et cellule eucaryote (Sundin et al., 2002). Il est intéressant de noter que, parmi les différentes activités des pili, c'est l'activité d'adhésine qui est nécessaire à l'injection : Sundin et ses collaborateurs ont montré qu'il est possible de substituer une autre adhésine (l'antigène pH6 de *Yersinia pestis*) aux pili sans que l'activité d'injection de toxine n'en soit affectée (Sundin et al., 2002).

iii. Les pili : des senseurs mécaniques potentiels ?

Enfin, une étude récente suggère que les pili pourraient jouer un autre rôle essentiel au cours de l'infection : ils seraient des « senseurs mécaniques », permettant la détection de surfaces, ce qui déclencherait en retour l'expression de facteurs de virulence (Persat et al., 2015).

L'importance capitale des pili dans l'invasion d'épithélium (sous forme de monocouches ou d'épithéliums reconstitués) a été largement documentée (Hayashi et al., 2015; Heiniger et al.,

2010; Kang et al., 1997). Ce point sera repris plus en détail dans le Chapitre III de ce manuscrit.

e. Importance des pili au cours de l'infection

Les pili sont de très importants facteurs de virulence pour *P. aeruginosa* car ils permettent d'établir le contact initial avec l'hôte. Ils jouent un rôle prépondérant dans les phases initiales de l'infection, ou au cours d'infections aiguës.

Plusieurs études ont été menées pour comprendre l'importance des pili au cours de l'infection aiguë. Dans un modèle murin néonatal d'infection pulmonaire, Tang et ses collaborateurs ont mis en exergue l'importance des pili au cours de l'infection. Dans ce modèle, les bactéries avec pili sont plus fréquemment associées à des pneumonies, des bactériémies et à une mortalité plus élevée que les bactéries non-piliées (Tang et al., 1995). Les pneumonies provoquées par les souches piliées ont tendance à être plus sévères et plus étendues.

Il est à noter que l'injection de protéines de piline purifiée dans les poumons conduit également à une inflammation locale, indiquant que la piline est reconnue par le système immunitaire (Tang et al., 1995). L'importance des pili est également prouvée dans le cas d'une infection par voie intrapéritonéale (Hahn, 1997), ou d'une infection de la cornée (Zolfaghar et al., 2003).

Une question intéressante à propos des pili est de savoir laquelle de leurs fonctions (adhésion, mobilité, contact rapproché pour l'injection des toxines) est importante pour l'infection. Ces trois fonctions étant difficilement dissociables, le déterminer sera sans doute difficile (Burrows, 2012). Plusieurs études *in vivo* ont cependant porté sur le sujet, et ont démontré que l'activité d'adhésion seule n'est pas suffisante à l'infection, que ce soit dans un modèle d'infection pulmonaire aiguë (Comolli et al., 1999) ou dans un modèle de kératite (Zolfaghar et al., 2003).

Il est à noter que, tout comme le flagelle, les pili sont souvent perdus par dérégulation ou par mutation dans le cas d'infections chroniques, notamment au cours de l'infection de patients atteints de mucoviscidose.

C. Le Système de Sécrétion de Type 2

La sécrétion de type 2 est un processus permettant l'export de larges protéines dans le milieu extracellulaire. *P. aeruginosa* utilise ce système pour exporter de nombreuses molécules, dont certaines jouent un rôle important dans la virulence.

a. Structure du SST2

L'export de protéines par le Système de Sécrétion de Type 2 (SST2) s'opère en deux étapes : les substrats sont d'abord exportés à travers la membrane cytoplasmique par les machineries Sec ou Tat, puis ces substrats sont pris en charge par le SST2 pour leur export depuis le périplasma bactérien vers le milieu extracellulaire. Le repliement des substrats du SST2 a lieu dans le périplasma (Bleves et al., 2010).

La machinerie du SST2 est constituée de 3 composants. Une première partie, située au niveau de la membrane interne, a pour fonction principale de fournir de l'énergie au système par hydrolyse d'ATP. Une seconde partie est insérée dans la membrane externe et forme un canal de large diamètre permettant l'export de grosses protéines. Une troisième partie forme un pseudopilus dont la fonction proposée est de former un piston permettant l'expulsion mécanique des protéines à travers le canal (voir Figure 11) (Bleves et al., 2010).

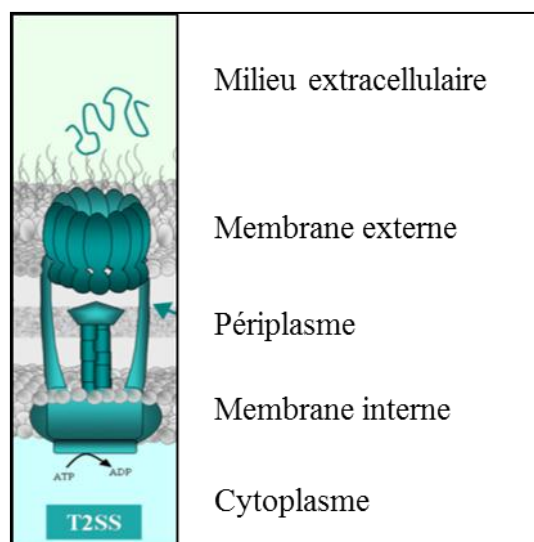


Figure 11 : Représentation schématique du SST2 de *P. aeruginosa* (Bleves et al., *Int J Med Microbiol* 2010).

Chez *P. aeruginosa*, trois systèmes de sécrétion de type 2 ont été identifiés à ce jour. Le système Xcp est de loin le système le mieux caractérisé et sécrète plusieurs facteurs de virulence jouant un rôle important au cours de l'infection. Les deux autres SST2, Hxc (actif uniquement en conditions de limitation en phosphate) et Txc (présent uniquement chez la souche PA7 de *P. aeruginosa*), sont à ce jour bien moins caractérisés (Bleves et al., 2010; Roy et al., 2010). Dans cette étude, seul le système Xcp sera décrit, et il sera appelé SST2.

L'expression du SST2, comme celle de nombreux autres facteurs de virulence tels que les rhamnolipides, la pyocyanine ou la pyoverdine, est régulée par le quorum sensing (QS), un mécanisme de régulation permettant aux bactéries de communiquer entre elles et de coordonner leurs actions. Ce système repose sur la production de petites molécules diffusibles, dont la concentration sert d'indication de la densité bactérienne. A partir d'une concentration seuil, ces molécules vont activer la transcription de gènes codant pour des facteurs de virulence (Stevens et al., 2012).

b. Substrats du SST2

Plusieurs substrats sécrétés par le SST2 de *P. aeruginosa* jouent un rôle dans la virulence. Parmi ces substrats, les plus importants au cours de l'infection sont les élastases LasA et LasB, l'exotoxine ToxA, la protéase IV (une sérine protéase) et des lipases et phospholipases.

i. LasB

L'élastase LasB est la protéase extracellulaire sécrétée par *P. aeruginosa* la plus importante au cours de l'infection. LasB participe à l'évasion des bactéries du système immunitaire, à la colonisation de l'hôte et à la destruction des tissus. Ces activités sont opérées grâce au clivage d'un certain nombre de protéines :

- Plusieurs composants de la matrice extracellulaire : l'élastine (composant majeur du tissu pulmonaire), la fibronectine, la vitronectine, certains collagènes (Beaufort et al., 2011).
- Certaines protéines en surface des cellules : uPAR (récepteur de l'urokinase plasminogène activateur uPA, mais également impliqué dans l'adhésion de la cellule à la matrice), mais aussi les claudine-1 et -4 et l'occludine (protéine des jonctions serrées) qui sont perturbées de façon transitoire par LasB (Nomura et al., 2014).

- Certaines molécules impliquées dans la reconnaissance et l'élimination du pathogène par l'hôte : les protéines SP-A et SP-D (protéines du surfactant ayant une forte activité bactériostatique), immunoglobulines G et A, ainsi que certains composants du système du complément (protéines de l'immunité innée contenues dans le sérum) (Strateva and Mitov, 2011).
- La VE-cadhérine (le clivage de la VE-cadhérine a été démontré par notre groupe et le groupe du Dr. Pidard) (Beaufort et al., 2013; Golovkine et al., 2014).

ii. LasA

LasA est une autre protéase sécrétée par *P. aeruginosa*. Elle possède également une activité élastolytique (dégradation de l'élastine), bien que faible en comparaison de celle de LasB. Elle est cependant capable d'augmenter de façon significative l'activité de LasB en rendant l'élastine plus accessible au clivage (Kessler et al., 1997; Peters and Galloway, 1990). LasA est également connue en tant qu'enzyme à forte activité staphylolytique à cause de sa capacité à dégrader le peptidoglycane de *S. aureus* (Kessler et al., 1993). Cette capacité peut potentiellement constituer un avantage important pour *P. aeruginosa* au cours de la colonisation des poumons de patients atteints de mucoviscidose.

iii. ToxA

ToxA (anciennement appelée ETA) est une toxine AB, c'est-à-dire une toxine possédant une cible intracellulaire. Elle est capable de s'internaliser dans les cellules cibles pour aller ensuite inhiber le facteur d'élongation EF-2. Cette inhibition a pour conséquence une inhibition de la synthèse protéique, qui conduit à la mort de la cellule ciblée par nécrose (Bleves et al., 2010).

iv. Protéase IV (PrpL)

PrpL est une sérine protéase. Son rôle a été documenté pour les kératites (Matsumoto, 2004). Elle dégrade le fibrinogène, le plasminogène et l'immunoglobuline G. PrpL joue également un rôle dans les infections respiratoires grâce à sa capacité à dégrader les protéines A, B et D du surfactant (Malloy et al., 2005).

v. *Lipases et phospholipases*

P. aeruginosa sécrète également un certain nombre de lipases et de phospholipases (dont des phospholipases C). Ces enzymes ciblent plusieurs types cellulaires :

- Elles dégradent les phospholipides des membranes cellulaires des cellules épithéliales (Kipnis et al., 2006).
- Certaines phospholipases sont également responsables d'une hémolyse (lyse des globules rouges) (Ostroff et al., 1990).
- La phospholipase C affiche par ailleurs une forte cytotoxicité vis-à-vis des cellules endothéliales, et inhibe l'angiogenèse (*i.e.* formation de nouveaux vaisseaux sanguins). Tout ceci pourrait être impliqué dans la mauvaise guérison des blessures infectées par *P. aeruginosa* (Vasil et al., 2009).

c. Importance du SST2 au cours de l'infection

Les rôles respectifs du SST2 et du SST3 ont été évalués dans un modèle de pneumonie aiguë chez des souris dépourvues de TLR2 et TLR4 par le groupe de Jyot et ses collaborateurs (Jyot et al., 2011). La charge bactérienne utilisée dans leur modèle est telle que les souches possédant à la fois le SST2 et le SST3 sont létales pour les souris en moins de 24 heures, tandis qu'une souche dépourvue de ces deux facteurs de virulence est avirulente sur une période de 7 jours. Dans ce contexte, les bactéries n'ayant que le SST3 (*i.e.* dépourvues de SST2), sont létales pour les souris en 24 h. Les bactéries n'ayant que le SST2 induisent également une mortalité chez les souris, mais avec un effet retardé (3 jours). Les conclusions de cette étude sont que, bien que le SST3 soit le facteur de virulence principal au cours d'infections aiguës, le SST2 joue également un rôle important.

Une étude menée par Le Berre et ses collaborateurs évalue quant à elle l'importance de trois facteurs de virulence de *P. aeruginosa* : l'élastase LasB, le SST3 et les lipopolysaccharides. Pour cela, la virulence de 56 souches de *P. aeruginosa* isolées chez des patients souffrant de pneumonie sous ventilation mécanique a été testée dans un modèle d'infection pulmonaire aiguë chez la souris. Les données de cette étude suggèrent que le SST3 et, dans une moindre mesure, l'élastase sont les deux facteurs de virulence les plus importants chez les souches cliniques de *P. aeruginosa* (Le Berre et al., 2011).

D. Le Système de Sécrétion de Type 3

Le Système de Sécrétion de Type 3 (SST3) est un complexe protéique en forme de seringue permettant l'injection directe de toxines dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. Comme pour d'autres bactéries à Gram négatif, le SST3 est considéré comme étant le facteur de virulence principal de *P. aeruginosa* au cours de l'infection aiguë.

a. Structure et activation du SST3

Le SST3 est constitué de trois sous-ensembles : un corps basal, inséré dans les membranes internes et externes de la bactérie, une aiguille de sécrétion, qui s'assemble à l'extérieur de la bactérie et un translocon composé de trois protéines qui s'insère dans la membrane de la cellule eucaryote ciblée (voir Figure 12).

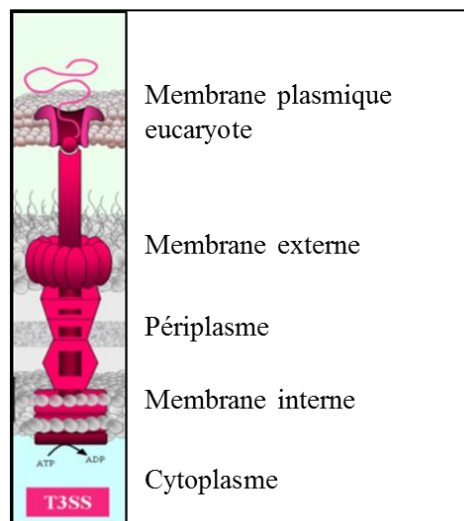


Figure 12 : Représentation schématique du SST3 de P. aeruginosa (Bleves et al., Int J Med Microbiol 2010).

La sécrétion de type 3 est régulée à deux niveaux : au niveau transcriptionnel et au niveau de l'initiation de la sécrétion. Ces deux niveaux de régulation sont liés, puisque la transcription des gènes de sécrétion est induite lors de l'activation du processus de sécrétion. Cette double régulation permet aux bactéries de produire en grande quantité les protéines du SST3 lorsque celles-ci sont nécessaires (Hauser, 2009). Le mécanisme déclenchant la sécrétion est encore mal compris à ce jour bien qu'il ait été montré que le contact avec la cellule eucaryote est le stimulus physiologique à l'origine de la sécrétion (Vallis et al., 1999). *In vitro*, le SST3 peut également être activé par exposition des bactéries à un milieu sans calcium.

b. Effecteurs du SST3

Le SST3 de *P. aeruginosa* permet l'injection de quatre toxines dans le cytoplasme de cellules eucaryotes : ExoS, ExoT, ExoY et ExoU. Ces quatre toxines sont exprimées de façon variable dans les différentes souches ou isolats cliniques. Les souches de *P. aeruginosa* expriment généralement ExoS ou ExoU, mais très rarement ces deux toxines en même temps (Shaver and Hauser, 2004). La majorité des souches expriment également ExoT et ExoY. Une étude menée sur cent isolats a montré que 72% des souches portaient le gène codant pour ExoS, 28% celui d'ExoU, 100% celui d'ExoT et 89% celui d'ExoY (Feltman et al., 2001).

Pour chacune de ces quatre toxines du SST3, trois éléments seront décrits :

- Les mécanismes de toxicité dans les cellules (dans la majorité des cas, les modèles cellulaires utilisés sont les cellules épithéliales).
- L'importance *in vivo* de la toxine.
- Les effets démontrés sur cellules endothéliales.

i. *ExoS*

ExoS est une toxine composée de deux domaines ayant des activités enzymatiques distinctes : un domaine ayant une activité GAP (GTPase activating Protein) et un domaine ADPRT (ADP Ribosyl-Transférase).

Le domaine GAP d'ExoS cible les petites GTPases Rho, Rac et Cdc42 dans les cellules épithéliales. Ces petites GTPases sont des acteurs importants de la régulation cellulaire eucaryotes, qui régulent notamment le maintien du cytosquelette d'actine. En inactivant ces GTPases, le domaine GAP d'ExoS entraîne un démantèlement du cytosquelette d'actine des cellules épithéliales, conduisant à l'arrondissement puis à la mort de la cellule (Hauser, 2009).

Le domaine ADPRT d'ExoS catalyse le transfert d'ADP-ribose à de nombreuses protéines dans la cellule cible. Les cibles principales connues de ce domaine sont les petites GTPases Ras, Rac, Cdc42 et la famille de protéines ERM (ezrin, radixin, moesin). Ras est une petite GTPase impliquée dans de nombreux processus cellulaires, tels que la prolifération cellulaire ou la structure du cytosquelette d'actine. La famille de protéines ERM est quant à elle impliquée dans des processus cellulaires liés à l'actine, tels que la migration, l'adhésion ou le maintien de la forme de la cellule. En altérant la signalisation cellulaire associée à ces

protéines, le domaine ADPRT entraîne une perturbation du cytosquelette d'actine puis l'arrondissement et la mort de la cellule. D'autres effets tels que l'inhibition de la synthèse d'ADN ou de l'endocytose ont également été documentés (Hauser, 2009).

L'impact d'ExoS *in vivo* a été documenté par plusieurs groupes. Shaver et ses collaborateurs ont été les premiers à montrer qu'ExoS joue un rôle important dans la virulence bactérienne dans un modèle de pneumonie aiguë. Ce rôle est largement dépendant de l'activité ADPRT d'ExoS (Shaver and Hauser, 2004). L'impact marqué du domaine ADPRT s'explique en partie par sa capacité à inhiber la phagocytose de *P. aeruginosa* par les macrophages et neutrophiles, comme cela a été démontré dans un modèle murin de pneumonie aiguë (Rangel et al., 2014). Une étude récente a également confirmé *in vivo* qu'ExoS est injecté dans les pneumocytes de type I (cellules épithéliales dans les alvéoles pulmonaires) au cours de l'infection pulmonaire. L'injection a d'abord lieu très localement, puis les zones de cellules injectées s'étendent au cours de l'infection. L'injection de cellules épithéliales est fortement diminuée lorsque le domaine ADPRT d'ExoS est inactivé (Rangel et al., 2015).

Une étude récente menée par notre groupe sur l'effet des toxines du SST3 sur cellules endothéliales a montré qu'ExoS affecte la voie de la Lim-kinase-cofilin, conduisant à un démantèlement des filaments d'actine (Huber et al., 2014).

ii. *ExoT*

ExoT est une toxine très homologue à ExoS (elles possèdent 75% d'identité au niveau de leurs séquences d'acides aminés). ExoT est également composée d'un domaine GAP et d'un domaine ADPRT.

Le domaine GAP d'ExoT cible les mêmes protéines que le domaine GAP d'ExoS : les petites GTPases Rho, Rac et Cdc42. Les effets de ces deux domaines GAP sur les cellules épithéliales sont sensiblement identiques (Hauser, 2009).

Son domaine ADPRT a en revanche une activité différente de celui d'ExoS. Les cibles de ce domaine sont moins nombreuses, et les effets sur la cellule moins importants. Initialement, le domaine ADPRT d'ExoT était supposé inactif mais des mutations dans sa séquence ont permis de mettre en évidence son effet sur plusieurs processus cellulaires tels que la migration

cellulaire, l'adhésion ou la guérison de blessures (Engel and Balachandran, 2009). Récemment, une cible d'ExoT a été identifiée : la famille de protéine Crk. Le domaine ADPRT d'ExoT peut convertir Crk en une cytotoxine, conduisant à une inhibition des contacts focaux et de la migration cellulaire (Wood et al., 2015).

Dans un modèle de pneumonie aiguë, ExoT ne joue qu'un rôle mineur dans la virulence bactérienne comparé à ExoU ou ExoS (Shaver and Hauser, 2004). En revanche, dans un modèle de kératite, ExoS et ExoT jouent toutes les deux un rôle important, notamment en promouvant l'apoptose des neutrophiles (Sun et al., 2012).

L'effet d'ExoT sur cellules endothéliales est identique à celui d'ExoS (Huber et al., 2014).

iii. ExoU

ExoU, la plus toxique des toxines du SST3, est une phospholipase A₂ capable d'engendrer une mort rapide de cellules eucaryotes par perte d'intégrité de leurs membranes plasmiques (nécrose) (Hauser, 2009). Une fois injectée dans la cellule cible, ExoU est rapidement associée à la membrane eucaryote, dans laquelle elle s'insère. L'activité phospholipase de la toxine est alors déclenchée, conduisant à une rupture de la membrane plasmique de la cellule (Gendrin et al., 2012). La toxicité d'ExoU a été décrite sur de nombreux types cellulaires tels que les cellules épithéliales (Sato and Frank, 2014), les neutrophiles ou les macrophages (Hauser, 2009).

In vivo, ExoU est la toxine du SST3 ayant le plus fort impact sur la virulence bactérienne (Shaver and Hauser, 2004). Une étude menée dans un modèle murin de pneumonie aiguë a montré que les macrophages alvéolaires sont les premières cellules prises pour cible. Les neutrophiles sont injectés dans les étapes plus tardives (Diaz and Hauser, 2010). La lyse des cellules phagocytaires induite par ExoU au cours de l'infection aiguë est probablement un élément clé de l'infection, car elle induit une immunosuppression locale dans les tissus (Diaz et al., 2008).

ExoU semble avoir la même activité phospholipase sur cellules endothéliales que sur cellules épithéliales. Elle induit une mort cellulaire rapide (Bouillot et al., 2015).

iv. *ExoY*

ExoY, décrit originellement comme une adénylate cyclase, est en fait une nucléotidyl cyclase, avec une préférence pour la production de cGMP et cUMP (Beckert et al., 2014; Ochoa et al., 2012). Cependant, son importance *in vivo* reste matière à débat (Hauser, 2009). Certains groupes considèrent qu'ExoY n'a pas d'effet sur les cellules épithéliales ou endothéliales (Ganter et al., 2009; Huber et al., 2014), alors que d'autres montrent, dans les temps tardifs, une augmentation de la phosphorylation de la protéine Tau l'empêchant d'interagir avec les microtubules et perturbant ainsi leur assemblage (Balczon et al., 2013; Ochoa et al., 2012).

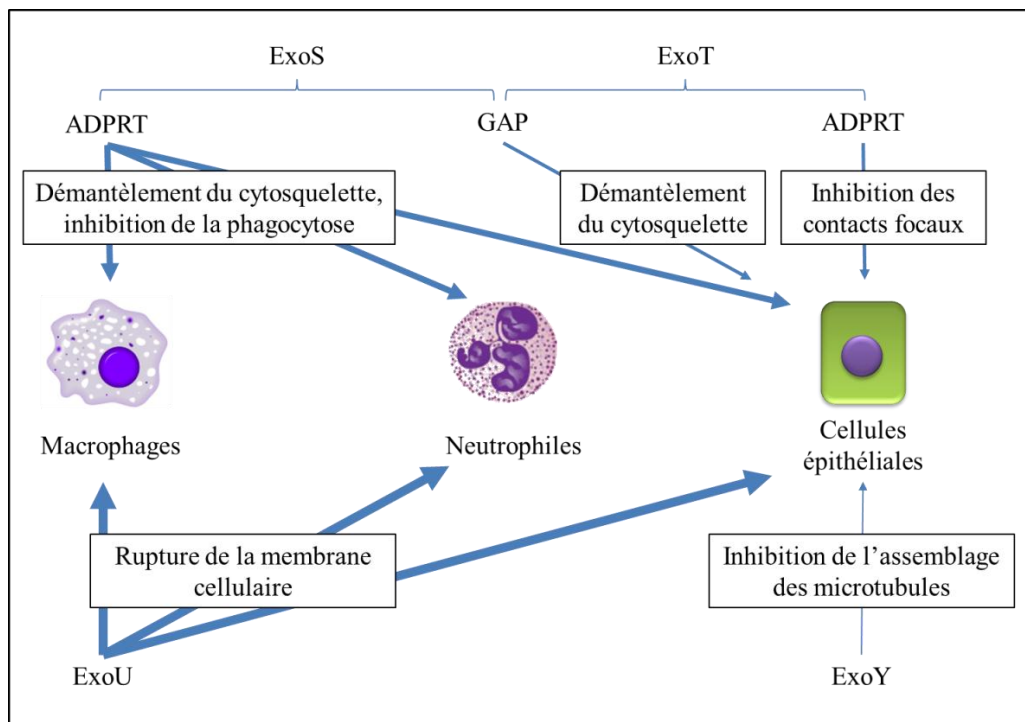


Figure 13 : Principaux effets des toxines du SST3 de *P. aeruginosa* sur les macrophages, neutrophiles et cellules épithéliales

c. Importance du SST3 au cours de l'infection

Bien que non indispensable à l'infection, le SST3 augmente fortement la sévérité de l'infection dans de nombreux modèles animaux tels que des modèles de pneumonie aiguë, de kératite, de bactériémie, de péritonite ou de brûlure (Hauser, 2009).

Une étude menée par Vance et ses collaborateurs a montré dans un modèle murin de bactériémie que le SST3 est nécessaire à la survie dans le sang (Vance et al., 2005). Ce résultat est en adéquation avec ceux obtenus par plusieurs groupes étudiant les bactériémies

en milieu clinique. Parmi ceux-ci, El-Solh et ses collaborateurs ont mis en évidence que l'expression des toxines du SST3 dans des isolats cliniques à partir de bactériémie est associée à un très mauvais pronostic pour le patient. Ce constat est d'autant plus vrai si, parmi les exotoxines, ExoU est exprimée (El-Solh et al., 2012).

Par ailleurs, il est à noter qu'un rôle important est attribué au SST3 au cours de l'internalisation de *P. aeruginosa* dans les cellules épithéliales. Ce point n'a pas été abordé dans cette section, mais sera débattu dans le Chapitre III.

E. Autres facteurs de virulence

a. Les autres systèmes de sécrétion de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa possède trois autres systèmes de sécrétion : Le SST1, le SST5 et le SST6.

i. SST1

Le SST1 est un système de sécrétion permettant l'export de protéines directement depuis le cytosol jusqu'au milieu extracellulaire. L'activation de ce système est sous contrôle du quorum sensing. Les effecteurs transportés par le SST1 sont encore mal connus. Parmi ceux-ci, la protéase alcaline AprA est de loin l'effecteur le mieux caractérisé. AprA est capable de dégrader les protéines suivantes :

- La fibrine (protéine filamenteuse résultant du processus de coagulation)
- Des protéines impliquées dans la défense de l'hôte telles que les protéines du complément C1q, C2 et C3, et l'interféron γ (Laarman et al., 2012)
- Les monomères de flagelline, réduisant ainsi la réponse immunitaire médiée par le TLR5 (Bardoel et al., 2011)

Le rôle d'AprA *in vivo* est documenté dans les kératites comme toutes les protéases produites par *P. aeruginosa* (Guzzo et al., 1991).

ii. SST5

Le SST5 permet l'export de protéines en deux étapes : une première étape de transport dans le périplasme par les machineries Sec ou Tat, puis une étape de transport dans le milieu extracellulaire par un mécanisme d'autotransport ou de transport à deux partenaires. Chez *P.*

aeruginosa, le SST5 permet la sécrétion de la protéase LepA et de l'estérase EstA, impliquée dans la production de rhamnolipides (Wilhelm et al., 2007). Récemment, un nouveau système de sécrétion à deux partenaires a été découvert sur une souche clinique isolée à Grenoble, CLJ1. Il est composé d'un transporteur ExlB et de l'exolysine ExlA. Ceci confère à CLJ1 un phénotype extrêmement virulent, ce qui est particulièrement inhabituel pour une souche dépourvue de SST3. Bien que la prévalence de telles souches reste à déterminer, CLJ1 pourrait être la première représentante d'une catégorie de souches de *P. aeruginosa* virulentes négligées jusqu'à présent (Elsen et al., 2014).

iii. SST6

Le SST6 est un système bien conservé parmi les bactéries à Gram négatif. Chez *Vibrio cholerae*, première bactérie chez laquelle le SST6 a été identifié, ce système permet l'injection de toxines dans le cytoplasme de cellules eucaryotes (Pukatzki et al., 2006).

Chez *P. aeruginosa*, trois SST6 ont été identifiés : les SST6-1, -2 et -3 (Bleves et al., 2010). A ce jour, le SST6-1 est le mieux caractérisé. Contrairement au SST6 de *V. cholerae*, le SST6-1 ne cible pas les cellules eucaryotes, mais est impliqué dans la compétition avec d'autres espèces bactériennes (Hood et al., 2010). Le SST6-1 étant exprimé au cours d'infections chroniques, ce système est sans doute impliqué dans la colonisation et l'implantation de *P. aeruginosa* dans les organes infectés au détriment d'autres espèces bactériennes. Les SST6-2 et -3 sont quant à eux capables de cibler à la fois des cellules eucaryotes et procaryotes (Bleves et al., 2014). Une étude récente a permis de démontrer que le SST6-2 favorise l'internalisation de *P. aeruginosa* dans des cellules épithéliales en ciblant les microtubules (Sana et al., 2015).

b. Les autres molécules sécrétées

i. Les lipopolysaccharides

Les lipopolysaccharide (LPS) sont des molécules composées de trois parties : une chaîne lipidique, un corps composé de motifs polysaccharidiques et d'une partie oligosaccharide appelée Antigène O. Lorsque les LPS sont sécrétés par *P. aeruginosa*, ils englobent la surface de sa membrane externe. Ils sont impliqués dans plusieurs processus au cours de l'infection :

- Les LPS servent à l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales, pour lesquelles plusieurs récepteurs tels que les protéines CFTR et aGM1 ont été décrits (Kipnis et al., 2006).
- Les LPS sont reconnus par le TLR4, ce qui déclenche une forte réponse pro-inflammatoire par sécrétion de cytokines (Pier, 2007).

Il est à noter que chez les patients atteints de mucoviscidose, les LPS sont fortement modifiés ce qui a pour effet de limiter la détection de la bactérie par le système immunitaire (Pier, 2007).

ii. Les facteurs d'attachement

Les exopolysaccharides sont des polymères de grands poids moléculaires, composés d'enchaînements de glucides. *P. aeruginosa* sécrète trois types d'exopolysaccharides : les alginates, le Psl et le Pel. Ces trois types de polysaccharides sont impliqués dans la fixation des bactéries sur une surface dans la formation de biofilms (Colvin et al., 2012; Ghafoor et al., 2011). Par ailleurs, les Psl sont impliqués dans l'extension du biofilm (Zhao et al., 2013).

P. aeruginosa produit également des lectines, qui sont des protéines qui se lient spécifiquement à certains glucides. Chez *P. aeruginosa*, ces lectines sont présentes dans le cytoplasme des bactéries, mais également sur leur membrane externe (Tielker et al., 2005). Chemani et ses collaborateurs ont montré que la suppression des lectines chez une souche de *P. aeruginosa* réduit l'adhésion des bactéries et leur cytotoxicité *in vitro*, ainsi que la dissémination *in vivo* dans un modèle de pneumonie aiguë (Chemani et al., 2009).

iii. Les chromophores

Plusieurs chromophores sont sécrétés par *P. aeruginosa* : la pyocyanine, la pyoverdine et la pyocheline.

La pyocyanine est un pigment bleu/vert impliqué dans l'établissement de l'infection chronique. Elle agit sur les cellules épithéliales de plusieurs manières, y compris par dommage direct, en empêchant la production de cytokines, en inhibant le mouvement des cils ou en bloquant des voies de signalisation cellulaire (Rada and Leto, 2013). Elle induit également l'apoptose des neutrophiles (Kipnis et al., 2006). En l'absence de pyocyanine, la

virulence de *P. aeruginosa* est atténuée dans un modèle murin d'infection pulmonaire (Lau et al., 2004).

La pyocyanine est également capable d'induire la libération du fer par la transferrine, une protéine du sérum impliquée dans le transport du fer (Cox, 1986). Ce fer peut alors être capté par la pyoverdine et la pyochéline, agissant comme des sidérophores. La pyoverdine pourrait également être impliquée dans l'homéostasie à d'autres métaux (Schalk and Guillon, 2013).

iv. Les rhamnolipides

Les rhamnolipides sont des glycolipides sécrétés par *P. aeruginosa*. Ils ont plusieurs rôles documentés au cours de l'infection :

- Ils coopèrent avec les phospholipases du SST2 pour dégrader les phospholipides du surfactant pulmonaire.
- Ils perturbent le mouvement des cils et favorisent l'invasion de l'épithélium pulmonaire (Zulianello et al., 2006).
- Ils participent à la protection de *P. aeruginosa* contre le système immunitaire en inhibant la phagocytose et en provoquant la lyse des macrophages (Alhede et al., 2014).
- Ils sont impliqués dans la mobilité de type « swarming » (Caiazza et al., 2005).

Chapitre III : Les barrières tissulaires au cours de l'infection

A. La barrière épithéliale

En dehors des infections à partir d'un cathéter, la barrière épithéliale est toujours la première barrière tissulaire à laquelle *P. aeruginosa* est confrontée au cours de l'infection. L'épithélium constitue à la fois une barrière physique contre les agressions extérieures et un système de détection efficace contre les pathogènes. Dans ce chapitre, différents types d'épithélium seront présentés, avec une emphase particulière sur l'épithélium pulmonaire. En effet, le poumon est un organe fréquemment associé à des infections nosocomiales, et *P. aeruginosa* est souvent isolé de ce type d'infections (voir Tableau 1).

a. Localisation des cellules épithéliales dans l'organisme

Les épithéliums forment un groupe très diversifié de tissus, recouvrant la surface externe et les cavités internes de l'organisme. Les épithéliums de surface sont organisés en feuillets, comprenant une ou plusieurs couches de cellules. Les cellules épithéliales sont reliées entre elles par des jonctions cellulaires, et reposent sur une membrane basale d'épaisseur variable. Une caractéristique importante des cellules épithéliales est leur polarisation : la surface exposée à la membrane basale ainsi que les membranes latérales possèdent des caractéristiques biochimiques et morphologiques très différentes de la surface faisant face à l'extérieur (la surface apicale) (Mostov et al., 2003). En fonction de leur localisation dans l'organisme, les épithéliums peuvent assurer différentes fonctions telles que la protection de l'organisme contre l'extérieur, la sécrétion, l'absorption ou la diffusion sélective de certaines molécules.

Les épithéliums peuvent être classifiés en fonction de leurs caractéristiques morphologiques (Young et al., 2011). Les principaux critères utilisés pour les différencier sont :

- le nombre de couches de cellules, qui permet de distinguer les épithéliums simples (une seule couche), les épithéliums stratifiés (plusieurs couches) et les épithéliums pseudostratifiés (épithélium simple dont les noyaux des cellules sont disposés à des niveaux différents, donnant l'impression d'un épithélium stratifié)
- la forme des cellules, qui peut être pavimenteuse (*i.e.* aplatie et polyédrique), cubique ou cylindrique
- la présence de spécialisations de surface telles que les cils ou le type de kératine, ainsi que la présence d'une couche de structures mortes appelées squames qui recouvre les cellules.

Comme l'illustre la Figure 14, les épithéliums présents dans l'organisme sont principalement de type :

- Pavimenteux simples, retrouvés par exemple dans les alvéoles pulmonaires
- Cuboïdes simples, présents dans certains organes tels que le rein
- Cylindriques simples, retrouvés notamment dans l'intestin grêle
- Cylindriques pseudostratifiés ciliés, retrouvé presque exclusivement dans les voies aériennes supérieures du système respiratoire
- Pavimenteux stratifiés, comme dans la cavité buccale, le pharynx, l'œsophage
- Pavimenteux stratifiés kératinisés, qui constitue l'épiderme.

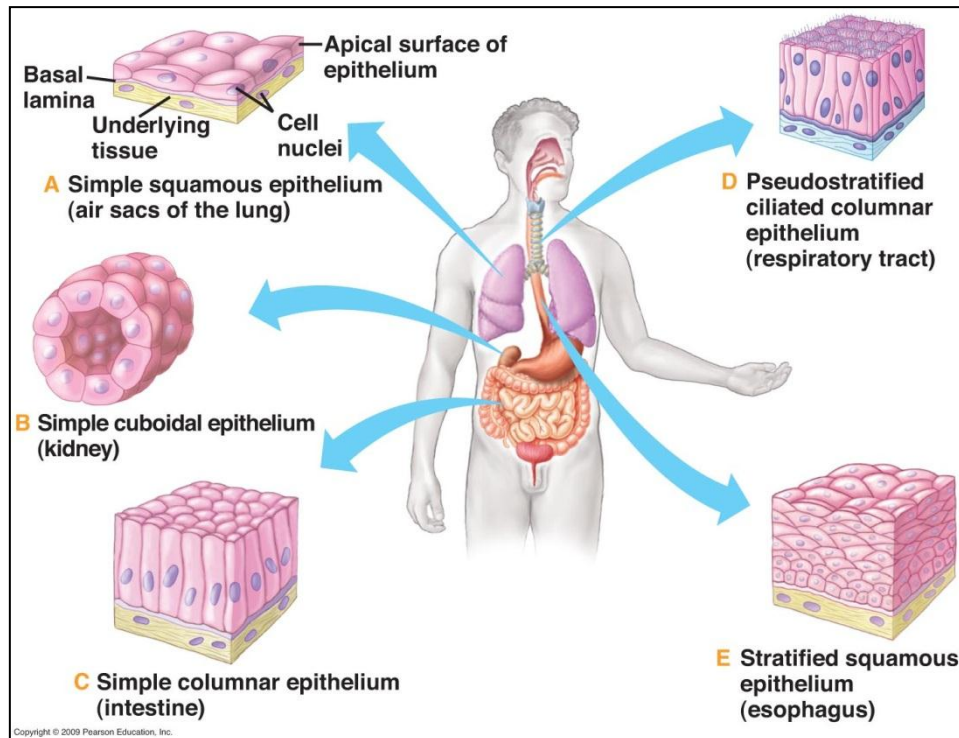


Figure 14 : Principaux types d'épithéliums du corps humain (Pearson Education 2009)

Par ailleurs, il existe un autre type de cellules épithéliales, spécialisé dans la sécrétion. Ces cellules, dites « glandulaires » peuvent être isolées dans un épithélium de revêtement ou regroupées sous forme d'amas. On parle alors d'épithélium glandulaire (Young et al., 2011).

Au cours de l'infection, *P. aeruginosa* pourra être confrontée à un nombre restreint de ces différents types d'épithéliums. Les pneumonies étant les infections à *P. aeruginosa* les plus fréquentes, seule l'interaction entre la bactérie et les cellules épithéliales pulmonaires sera détaillée dans la suite de cette étude.

b. Propriétés des cellules épithéliales

i. Architecture des cellules épithéliales

Les cellules épithéliales sont des cellules adhérentes qui, comme décrit précédemment, peuvent avoir des morphologies variées. La membrane plasmique de la cellule contient le cytoplasme, le noyau et les différents organites (réticulum endoplasmique, appareil de golgi, mitochondries...). L'architecture de la cellule est maintenue par son cytosquelette, qui est composé de microfilaments d'actine, de microtubules de tubuline et de filaments

intermédiaires constitués de kératines, une famille de protéines spécifiques aux épithéliums (voir Figure 15).

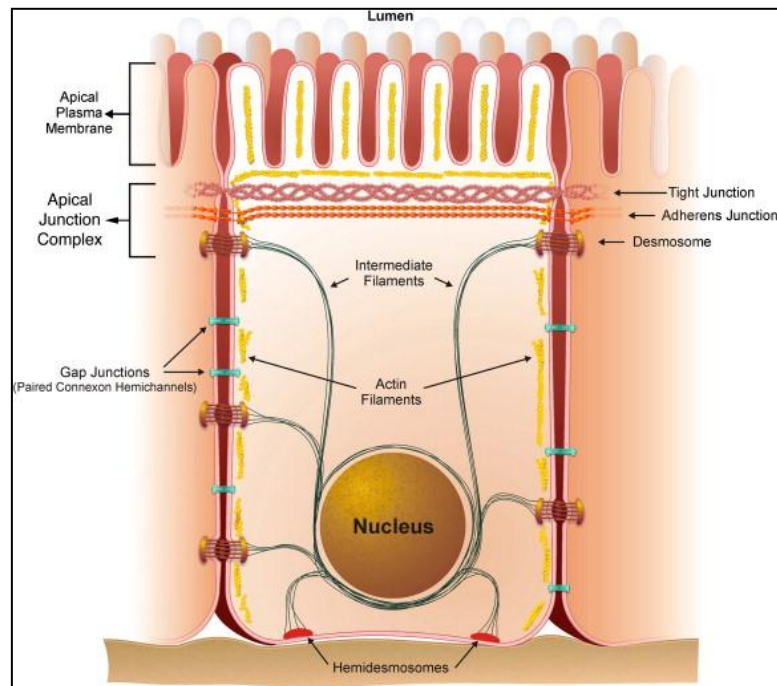


Figure 15 : Vue schématique de la structure d'une cellule épithéliale polarisée (Guttman and Finlay, 2009)

La cohésion de l'épithélium est assurée par des jonctions intercellulaires, qui lient entre elles les cellules adjacentes. Les jonctions cellulaires sont de trois types : serrées, d'ancrage et communicantes. Ces trois types de jonctions seront décrits en détail dans la prochaine section. Les jonctions serrées délimitent le domaine apical du domaine baso-latéral des cellules, qui diffèrent à la fois sur les plans fonctionnels et biochimiques, notamment dans leurs compositions lipidiques : le domaine apical est enrichi en phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP_2), tandis que la membrane basale contient majoritairement des phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP_3) (Martin-Belmonte and Mostov, 2008).

Le domaine apical est le domaine qui fait face à la lumière de l'organe. C'est le domaine le plus spécialisé, puisqu'il contient la majorité des protéines nécessaires aux fonctions spécifiques de l'organe (digestion, absorption de nutriments, etc.). Le domaine apical des cellules épithéliales peut également contenir des microvillosités ou des cils.

Le domaine baso-latéral est quant à lui en contact avec deux éléments : le partie latérale est en contact avec les cellules adjacentes auxquelles elle est reliée par les jonctions intercellulaires,

tandis que la partie basale est en contact avec la lame basale. La lame basale est un assemblage de protéines et glycoprotéines extracellulaires. Elle permet l'adhérence des cellules épithéliales à la matrice extracellulaire du tissu conjonctif sous-jacent. La lame basale est composée d'une mixture de protéines : collagène, laminine, fibronectine, perlecane, etc. Ces protéines se lient entre elles et forment une matrice fortement réticulée (Glentis et al., 2014).

L'adhérence de la cellule à cette lame basale se fait par le biais des contacts focaux et des hémidesmosomes (voir Figure 16). Les contacts focaux sont des jonctions adhérentes ponctuelles, composées d'un récepteur membranaire et de plusieurs protéines cytoplasmiques (vinculine, taline, p120CAS,...) qui sont reliées aux microfilaments d'actine. La formation des contacts focaux est un phénomène transitoire, notamment dans un épithélium en fort renouvellement. Les hémidesmosomes sont quant à eux des structures plus stables, qui font le lien entre la lame basale et les filaments intermédiaires de kératine. Les principaux récepteurs membranaires des contacts focaux et des hémidesmosomes font partie de la famille des intégrines, qui sont des glycoprotéines. Les intégrines peuvent se lier à différents composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène, la fibronectine ou la laminine, notamment par reconnaissance de motifs RGD (Arg-Gly-Asp) présents sur ces molécules. Les intégrines sont des glycoprotéines composées de deux polypeptides transmembranaires : les sous-unités α et β . Il existe 18 sous-unités α et 8 sous-unités β . Les différentes combinaisons entre sous-unités α et β permettent de faire varier les spécificités de liaison des intégrines avec leur substrat (Campbell and Humphries, 2011).

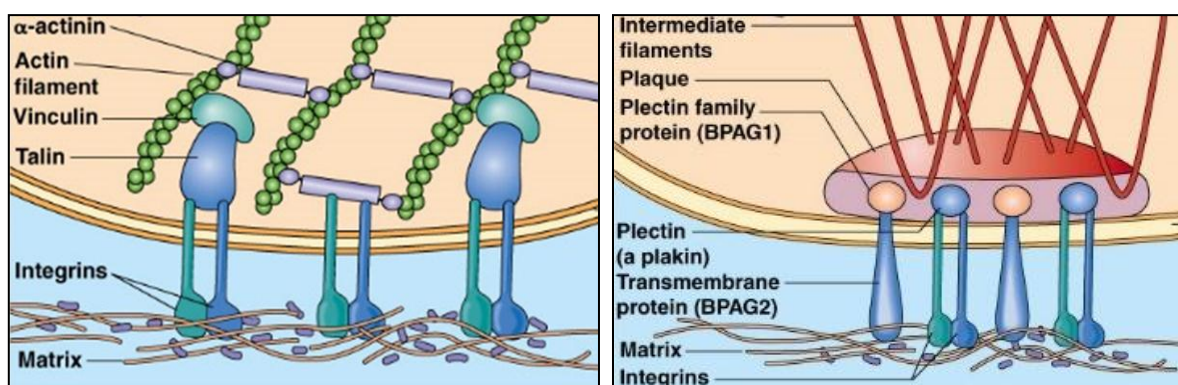


Figure 16 : (Gauche) Connection des contacts focaux aux filaments d'actine (Droite) Connections des hémodesmosomes aux filaments intermédiaires (Pearson Education 2012)

ii. Les jonctions intercellulaires épithéliales

Dans les épithéliums, les cellules sont étroitement associées les unes aux autres par des jonctions intercellulaires. Ces jonctions sont composées de molécules d'adhérence. Les jonctions intercellulaires des cellules épithéliales peuvent être classées en trois catégories selon leur structure et leur fonction :

- Les jonctions serrées (parfois appelées jonctions étanches)
- Les jonctions d'ancrage : jonctions adhérentes et desmosomes
- Les jonctions de type gap (autrement appelées jonctions communicantes).

Dans les cellules épithéliales, les jonctions serrées, jonctions adhérentes et desmosomes sont formées de trois éléments : des protéines transmembranaires, des éléments du cytosquelette et des protéines cytoplasmiques qui les relient.

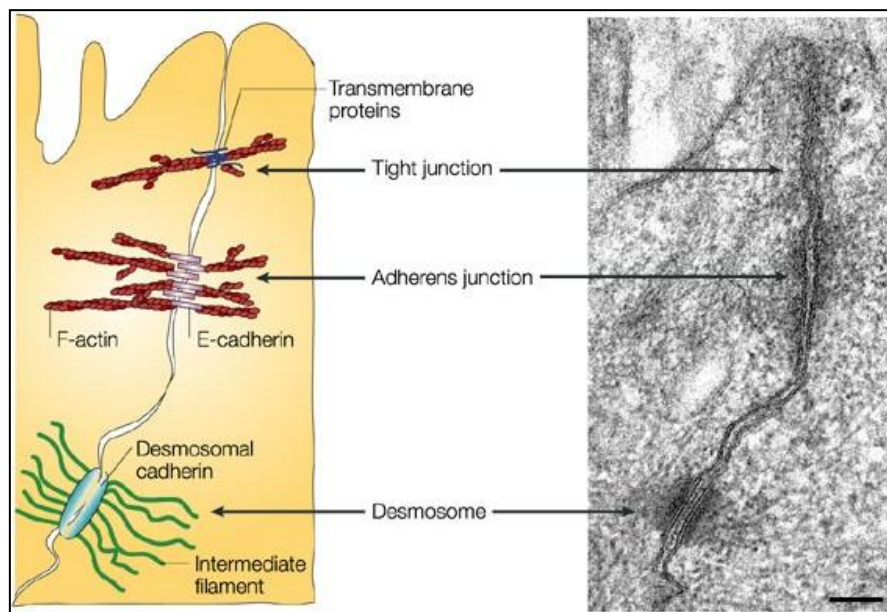


Figure 17 : Jonctions serrées, jonctions adhérentes et desmosomes dans les cellules épithéliales
(Kobielak and Fuchs, 2004)

- Les jonctions serrées

Les jonctions serrées sont situées à l'apex des cellules épithéliales. Elles sont composées de structures linéaires entremêlées qui bordent la cellule (zonula). La fonction principale des jonctions serrées est d'assurer l'étanchéité de l'épithélium : une fois formées, ces jonctions bloquent le passage de solutés à travers l'espace intercellulaire. Selon la nature du tissu,

l'étanchéité peut ne pas être totale : par exemple, dans le cas de l'épithélium intestinal, de petits solutés peuvent franchir ces jonctions (Liang and Weber, 2014)

Les jonctions serrées marquent la séparation entre membrane basolatérale et membrane apicale. Elles sont associées à un complexe de polarité qui participe à la ségrégation protéique et lipidique des deux membranes (Cao et al., 2012).

La jonction serrée est composée de quatre familles de protéines transmembranaires : les claudines, l'occludine, les JAM (junctional adhesion molecule) et les CAR (Coxsackievirus and Adenovirus Receptors). Les protéines des familles JAM et CAR ont un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire similaire à une immunoglobuline G. Les claudines et occludines possèdent quant à elles quatre domaines transmembranaires, et se lient de façon homotypique avec les protéines des cellules adjacentes. Les claudines sont les plus importantes de ces quatre familles de molécules : 24 isoformes de claudine ont été identifiées, et plusieurs de ces isoformes peuvent être présentes au sein d'une même jonction, permettant une variabilité dans la perméabilité de la jonction (Liang and Weber, 2014). Ces quatre familles de protéines transmembranaires sont associées à des protéines intracellulaires, qui sont de véritables plateformes d'interactions moléculaires, parmi lesquelles figurent ZO-1, ZO-2 et ZO-3 (ZO = Zonula occludens). Ces protéines sont elles-mêmes liées au cytosquelette d'actine (Guttman and Finlay, 2009).

- Les jonctions d'ancrage

Les jonctions d'ancrage sont situées sous les jonctions serrées, dans le domaine basolatéral. Elles jouent un rôle structural essentiel dans les tissus, puisqu'elles renforcent l'intégrité tissulaire en permettant à deux cellules adjacentes de connecter leur cytosquelette. Les jonctions d'ancrage sont constituées de jonctions adhérentes (autrement appelées zonula adherens) et de desmosomes (macula adherens). Les jonctions adhérentes sont localisées au-dessus des desmosomes. Tous deux sont composés de cadhérines, des protéines transmembranaires qui se lient aux cadhérines du même type, localisées sur les cellules adjacentes (liaisons homotypiques). Ces interactions permettent une association homophile des cellules de même nature au sein d'un tissu. Leur fonctionnement dépend des ions calcium (Perez and Nelson, 2004).

Dans les jonctions adhérentes, la E-cadhérine est liée aux filaments d'actine par le biais de caténines (α - et β -caténine). Le rôle fondamental de la E-cadhérine dans l'adhérence intercellulaire a été démontré par de nombreuses approches. La localisation jonctionnelle de cette molécule est finement régulée. Dans les carcinomes, sa disparition des cellules tumorales entraîne l'invasion tissulaire et la dissémination métastatique. La *E-cadhérine* est considéré de ce fait comme un gène suppresseur de tumeur (Perl et al., 1998).

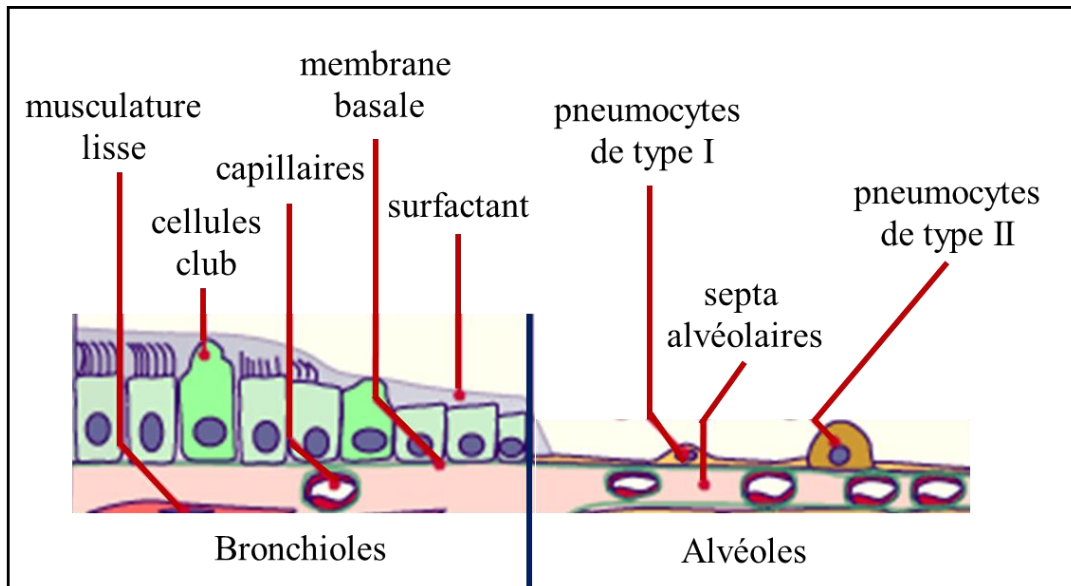
Les desmosomes sont quant à eux constitués de desmogléine et de desmocolline, deux protéines de la famille des cadhérines, qui s'associent aux filaments intermédiaires constitués de kératine.

- Les jonctions de type gap

Les jonctions de type gap, autrement appelées jonctions communicantes, sont des canaux formés entre les cytoplasmes de cellules adjacentes et permettant la circulation de signaux chimiques ou électriques. Les jonctions de type gap sont formées par un groupe de protéines appelées connexines. Ces connexines s'assemblent sous forme d'hexamères pour former un connexon. Lorsque les connexons de deux cellules adjacentes s'alignent, ils forment un canal continu permettant le passage du calcium, d'ATP ou de petites molécules (de taille inférieure à 1000 Daltons) (Goodenough and Paul, 2009).

c. Spécificités des cellules épithéliales pulmonaires

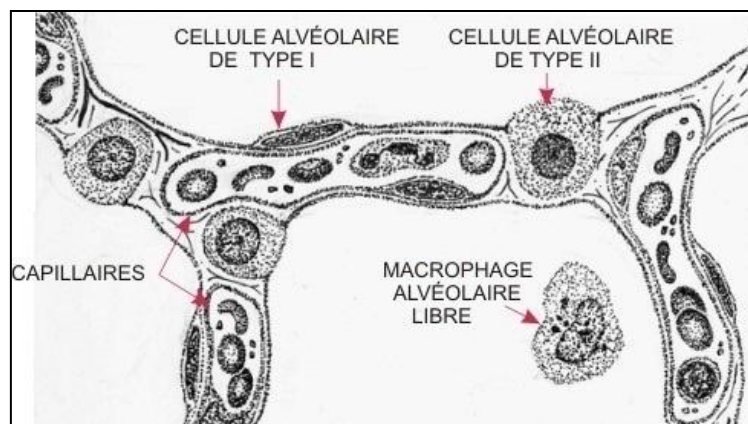
Les bactéries responsables d'infections pulmonaires accèdent aux poumons en étant directement inhalées ou en étant amenées par des dispositifs mécaniques tels que des respirateurs. Elles franchissent successivement le nez et la trachée. A partir de là, elles passent par les voies aériennes, qui se ramifient plusieurs fois en bronches puis bronchioles de diamètre de plus en plus réduit, pour arriver finalement dans les alvéoles pulmonaires où ont lieu les échanges gazeux (www.embryology.ch).



*Figure 18 : Vue Schématique des bronchioles et des alvéoles pulmonaires humaines.
Adapté de (www.embryology.ch)*

Comme le montre la Figure 18, la morphologie des cellules épithéliales qui forment les conduits pulmonaires change de façon drastique en passant des bronchioles aux alvéoles. Dans les bronchioles, les cellules épithéliales sont hautes et cylindriques, et la majorité des cellules épithéliales possèdent des cils sur leur face apicale. Ces cils vibratiles sont animés d'un mouvement coordonné servant à évacuer le mucus pulmonaire jusqu'au pharynx. Le mucus, qui piège les poussières et les microorganismes présents dans le poumon, est alors éliminé par voie digestive.

Au contraire, les cellules tapissant les alvéoles sont pavimenteuses et très plates, ce qui permet de maximiser les échanges gazeux. Elles sont dépourvues de cils.



*Figure 19 : Structure d'une alvéole pulmonaire
Adapté de (Clermont et al., 2009)*

Les parois des alvéoles pulmonaires sont composées de plusieurs types cellulaires (voir Figure 19). La majorité des cellules sont des pneumocytes de type 1, qui sont des cellules épithéliales pavimenteuses simples et très plates. Les alvéoles pulmonaires contiennent également des pneumocytes de type 2, qui sont des cellules épithéliales cubiques. Ce sont des cellules sécrétoires, dont le rôle est de produire le surfactant qui couvre la surface de l'épithélium alvéolaire, ce qui permet d'éviter l'affaissement des alvéoles et les protège d'agressions chimiques ou microbiologiques (Gellatly and Hancock, 2013).

C'est au niveau des alvéoles pulmonaires que *P. aeruginosa* peut franchir la barrière épithéliale et engendrer une septicémie au cours de l'infection aiguë (Rangel et al., 2015).

B. La barrière endothéliale

a. Localisation des cellules endothéliales dans l'organisme

On peut distinguer trois types de vaisseaux sanguins : les artères, les veines et les capillaires. Les artères et les veines sont généralement de gros vaisseaux. Les artères distribuent le sang venant du cœur aux différents tissus de l'organisme, tandis que les veines permettent le retour du sang vers le cœur. Les capillaires sont quant à eux des petits vaisseaux sanguins qui font le lien entre les extrémités du système artériel (artérioles) et celles du système veineux (veinules). Leur rôle est d'alimenter les tissus en dioxygène et nutriments (dont le glucose) et de capter le dioxyde de carbone (CO₂) et les déchets. Dans les alvéoles pulmonaires, les capillaires jouent le rôle inverse, puisqu'ils permettent le captage du dioxygène par l'hémoglobine et l'élimination du CO₂. Il faut noter également le système vasculaire lymphatique composé de vaisseaux de différentes tailles, borgnes à leur extrémité mais reliés au système veineux, qui assure le drainage tissulaire.

Selon leur localisation, les artères et les veines peuvent avoir des diamètres compris entre 20 µm et 3 cm. Leurs parois sont composées de trois couches concentriques : l'intima, la media et l'adventice. L'intima est composée d'une monocouche de cellules endothéliale pavimenteuse et d'une lame basale. La media, dont l'épaisseur est très variable en fonction du type de vaisseau, est constituée de couches concentriques de cellules musculaires lisses

séparées par des lames élastiques. Enfin, l'adventice est formée par des fibroblastes insérés dans une matrice extracellulaire abondante (Young et al., 2011).

Le diamètre des capillaires varie de 3 à 10 μm . Contrairement aux artères et aux veines, la paroi des capillaires est très fine : elle est composée d'un endothélium, d'une lame basale et de cellules péricytaires ayant une activité contractile (Young et al., 2011). Dans la majorité des organes (poumons, tubes digestif, muscles, etc.), les capillaires sanguins sont dits continus, par opposition aux capillaires fenestrés des glandes endocrines ou du foie, dont les cellules endothéliales sont criblées de trous operculés ou non (Aird, 2007).

Dans tous les types de vaisseaux sanguins ou lymphatiques, l'endothélium constitue la barrière vasculaire contrôlant les échanges entre sang et tissus, alors que les éléments péri-endothéliaux régulent la vasotonie ou assurent la continuité avec les tissus environnants. Cependant, l'endothélium a également d'autres fonctions, dans le contrôle de la vasotonie ou dans l'hémostase, qui ne seront pas abordées ici.

L'endothélium n'est pas composé d'une population homogène de cellules, mais constitue au contraire un regroupement de cellules aux phénotypes extrêmement variés. Le phénotype des cellules endothéliales varie en fonction de l'organe dans lequel elles se trouvent, mais également au sein même des organes (Aird, 2007).

Bien que les cellules endothéliales soient généralement plates, leur morphologie varie beaucoup en fonction de la taille du vaisseau sanguin dans lequel elles se trouvent. Dans les artères, les cellules endothéliales sont de forme arrondie ou cuboïde, tandis que dans les petits capillaires et les veines, elles sont pavimenteuses et extrêmement fines (Aird, 2007). Dans certains capillaires, notamment dans le poumon, l'épaisseur des cellules endothéliales sera de moins de 0,3 μm (Wallez and Huber, 2008). Dans ces vaisseaux, les cellules endothéliales adjacentes se chevauchent aux jonctions. Dans la plupart des cas, il a été montré que ces différenciations d'organe et de lit vasculaire sont l'effet de molécules sécrétées par l'environnement tissulaire, modelant ainsi le système vasculaire aux besoins de l'organe (Aird, 2007).

b. Spécificités des cellules endothéliales

L'endothélium est souvent considéré comme un épithélium de revêtement, mais il possède certaines spécificités qui lui sont propres.

De manière générale, les endothéliums sont plus perméables que les épithéliums, notamment les capillaires et surtout les veinules post-capillaires. Ces vaisseaux sont spécialisés dans les échanges entre le sang et les tissus. Plusieurs systèmes d'échanges, paracellulaires ou transcellulaires, permettent une perméabilité sélective aux solutés (Aird, 2007). Un autre point important est l'extravasation des neutrophiles et des monocytes au cours de l'inflammation. La production locale de molécules pro-inflammatoires, lors d'une infection par exemple, va déclencher une succession de mécanismes moléculaires et cellulaires permettant aux cellules inflammatoires de s'échapper des vaisseaux, sans créer d'hémorragie. Après de nombreuses controverses, il est maintenant couramment admis que ces cellules inflammatoires sont capables de transmigrer à travers l'endothélium par une voie paracellulaire ou par une voie transcellulaire (Dimasi et al., 2013). La voie paracellulaire, qui est le phénomène majoritaire, s'opère par diapédèse aux jonctions interendothéliales, après remodelage transitoire des jonctions (Woodfin et al., 2010).

Les jonctions entre cellules endothéliales comportent également quelques spécificités, qui seront décrites ci-dessous.

c. Les jonctions intercellulaires endothéliales

Les jonctions des cellules endothéliales sont apparentées à celles présentes dans les cellules épithéliales, mais diffèrent de celles-ci sur certains points, que ce soit sur le plan biochimique ou organisationnel.

Tout d'abord, les desmosomes sont absents des endothéliums ; les jonctions adhérentes assurent seules l'interaction forte entre les cellules. Par ailleurs, alors que dans les cellules épithéliales la distribution spatiale des jonctions cellulaires est précise (jonctions serrées près du pôle apical et jonctions adhérentes en dessous), la situation est moins claire dans les cellules endothéliales : les jonctions serrées et adhérentes sont entremêlées (Bazzoni and Dejana, 2004). Dans cette section, les différences principales entre les jonctions des cellules endothéliales et celles des cellules épithéliales seront décrites.

i. Jonction serrées

La complexité des jonctions serrées des cellules endothéliales varie fortement selon la localisation des cellules dans le système vasculaire. Cette variabilité a un très fort impact sur la perméabilité vasculaire (Wallez and Huber, 2008).

Les jonctions serrées des cellules endothéliales diffèrent également sur le plan biochimique : elles expriment fortement une protéine de la famille des claudines qui leur est propre, la claudine-5. L'occludine n'est quant à elle exprimée qu'au niveau de la barrière hémato-encéphalique (Wallez and Huber, 2008).

ii. Jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes sont constituées d'une protéine transmembranaire spécifique des cellules endothéliales : la VE-cadhérine (Vascular Endothelial Cadherin). Elle possède les mêmes propriétés d'association homotypique et d'interaction au cytosquelette que la E-cadhérine (Harris and Nelson, 2010). La formation de la jonction adhérente est également requise pour la mise en place des autres types de structures jonctionnelles (Harris and Nelson, 2010). Les expériences d'ablation de gène chez la souris ou l'utilisation d'anticorps bloquant la VE-cadhérine ont démontré son rôle essentiel dans la construction du système vasculaire (angiogenèse) et le contrôle de la perméabilité des vaisseaux (Breviario et al., 1995; Corada et al., 2001). Enfin, il a été montré que le clivage de la VE-cadhérine par l'élastase et la cathepsine G sécrétées par les neutrophiles pouvait participer au mécanisme d'extravasation de ces cellules (Hermant et al., 2003). De nombreuses régulations de l'activité biologique de la VE-cadhérine ont été mises en évidence, sous l'action notamment de cytokines pro-inflammatoires ou angiogénique (Harris and Nelson, 2010). La VE-cadhérine est par conséquent une molécule dont l'activité est modulable, ce qui constitue en soi une différence importante avec la E-cadhérine.

iii. Jonctions de type gap

Il n'existe que peu de différences entre les jonctions de type gap des cellules endothéliales et épithéliales, si ce n'est qu'elles sont composées de connexines de nature différente.

Chapitre IV : Interaction entre *P. aeruginosa* et les cellules épithéliales et endothéliales

A. Interaction avec les cellules épithéliales

L'interaction entre *P. aeruginosa* et les cellules épithéliales assemblées en monocouche est un phénomène qui a été largement étudié au cours des quinze dernières années. Les mécanismes mis en œuvre par ce pathogène pour franchir l'épithélium ont été étudiés par de nombreux groupes, mais restent cependant sujet à débat. Ainsi, deux visions s'affrontent : certains groupes soutiennent que *P. aeruginosa* est un pathogène intracellulaire facultatif, c'est-à-dire qu'elle aurait la capacité de pénétrer dans les cellules épithéliales et d'y proliférer (« internalisation »). D'autres groupes, moins nombreux, soutiennent que *P. aeruginosa* n'utilise pas cette voie intracellulaire, mais qu'elle utilise au contraire une voie paracellulaire (*i.e.* entre les cellules) pour franchir l'épithélium. Un bilan de chacune de ces théories va être dressé dans cette section.

a. Internalisation de *P. aeruginosa*

i. De nombreux modèles cellulaires utilisés

L'internalisation de *P. aeruginosa* dans les cellules épithéliales est un mécanisme décrit depuis longtemps. Une des premières études rapportant des bactéries à l'intérieur de cellules épithéliales est celle menée par Chi et ses collaborateurs en 1991 (Chi et al., 1991). Deux méthodes ont été employées pour mettre en évidence la présence de bactéries à l'intérieur d'A549 (lignée cellulaire dérivée de pneumocytes de type 2). La première a été une observation directe par microscopie électronique. La seconde méthode a été d'utiliser une expérience de protection à la gentamycine (« gentamycin protection assay »), qui permet de dénombrer, *a posteriori*, le nombre de bactéries intracellulaires viables.

De nombreux groupes ont repris ces méthodologies et ont mis en évidence le même phénomène d'internalisation de *P. aeruginosa* dans des cellules épithéliales primaires ou dans des lignées cellulaires dérivées de cellules épithéliales (voir Tableau 3).

Nom et origine des cellules	Référence
16HBE, lignée cellulaire dérivée de cellules épithéliales de bronches humaines	(Plotkowski et al., 1999)
MDCK, lignée cellulaire dérivée du rein de chien	(Hauser et al., 1998)
Caco-2, lignée cellulaire dérivée de cellules épithéliales coloréctales humaines	(Pereira et al., 1997)
Chang, lignée cellulaire dérivée de cellules épithéliales de cornée humaine	(Esen et al., 2001)
HeLa, lignée cellulaire dérivée de cellules épithéliales d'utérus humain	(Ha and Jin, 2001)
CFBE41o-, lignée cellulaire dérivée de cellules épithéliales de bronches humaines de patient atteint de mucoviscidose	(Darling and Evans, 2003)
IB3, lignée cellulaire dérivée de cellules épithéliales de bronches humaines exprimant ou non la protéine CFTR	(Bajmoczy et al., 2009)
HMEEC, lignée cellulaire dérivée de cellules épithéliales de l'oreille moyenne humaine	(Mittal et al., 2014)
Cellules épithéliales primaires de cornée de lapin	(Fleiszig et al., 2001)
Cellules épithéliales primaires de bronches de patient atteint de mucoviscidose	(Darling et al., 2004)
AEC II, cellules épithéliales alvéolaires primaires humaines	(Kannan et al., 2006)

Tableau 3 : Lignées cellulaires et cellules épithéliales primaires utilisées pour l'observation de l'internalisation de *P. aeruginosa*

La capacité de *P. aeruginosa* à entrer dans des cellules épithéliales a également été montrée dans plusieurs modèles *in vivo* (Copreni et al., 2010; Fleiszig et al., 1996; Schroeder et al., 2001a; Zaas et al., 2009). Le modèle *in vivo* le plus avancé pour lequel l'internalisation a été mise en évidence est la kératite (Yamamoto et al., 2006; Yamamoto et al., 2005).

Plusieurs mécanismes de cette internalisation ont ensuite été décryptés, notamment le processus d'entrée de *P. aeruginosa* dans les cellules épithéliales et les mécanismes de survie des bactéries à l'intérieur des cellules.

ii. Mécanismes d'entrée de *P. aeruginosa* dans les cellules

Les contributeurs majeurs à la compréhension de l'entrée de *P. aeruginosa* dans les cellules épithéliales sont les groupes d'Engel et de Kierbel. En utilisant un modèle *in vitro* d'épithélium, ils ont montré que *P. aeruginosa* forme des agrégats en surface des cellules épithéliales. Dans ces agrégats, *P. aeruginosa* subvertit la phosphatidylinositol 3-kinase (PIP3K) pour transformer localement la membrane apicale de la cellule en membrane basale (Kierbel et al., 2007). Des protrusions riches en actine dont la polarité est inversée sont alors formées. Les agrégats bactériens ont alors deux effets : la génération d'une forte réponse immunitaire innée par l'activation locale de la voie de signalisation NF- κ B (Tran et al., 2014a) et l'internalisation de *P. aeruginosa* dans la cellule épithéliale par un mécanisme impliquant la tyrosine kinase Lyn (Lepanto et al., 2011) (voir Figure 20).

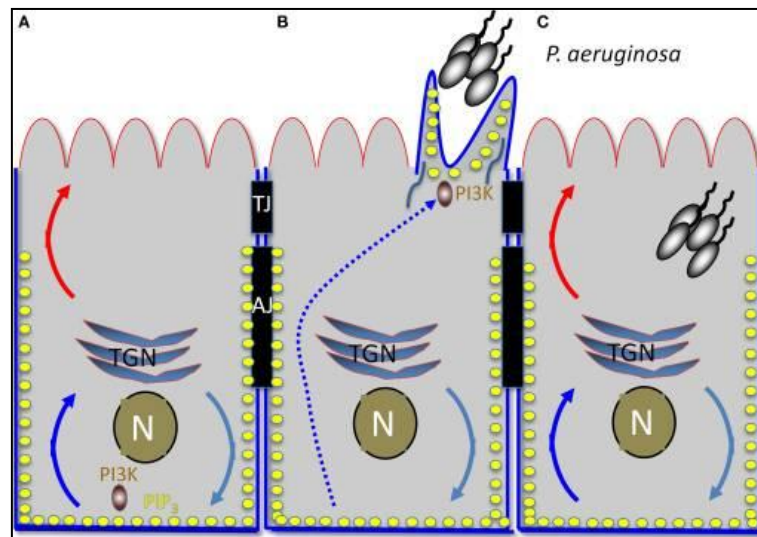


Figure 20 : Modèle proposé par Engel et ses collaborateurs pour l'entrée de *P. aeruginosa* dans les cellules épithéliales.

(A) les cellules épithéliales sont polarisées. (B) *P. aeruginosa* recrute la PI3K et transforme une partie du domaine apical en domaine basolatéral. (C) *P. aeruginosa* est internalisée (Engel and Eran, 2011)

Par ailleurs, plusieurs groupes ont étudié l'importance des facteurs de virulence de *P. aeruginosa* pour son internalisation dans les cellules épithéliales. Ainsi, il est rapporté que le SST3 inhibe l'internalisation de *P. aeruginosa* (Garrity-Ryan et al., 2000; Hauser et al., 1998; Kazmierczak et al., 2001). Cet effet d'inhibition dépend des domaines GAP des toxines ExoS et ExoT. La présence d'un flagelle (Fleiszig et al., 2001) ainsi que la phase de croissance des bactéries (Ha and Jin, 2001) ont également été décrits comme étant des facteurs importants dans le processus d'internalisation.

Le rôle joué par la protéine CFTR dans l'internalisation de *P. aeruginosa* a également été étudié. Il n'est pour l'instant pas clairement établi : certains groupes rapportent que la présence de la protéine CFTR favorise l'adhésion et l'internalisation des bactéries (Bajmoczy et al., 2009; Kowalski and Pier, 2004; Zaidi et al., 2004), tandis que d'autres groupes rapportent le phénomène inverse (Darling et al., 2004).

iii. Mécanismes de survie dans les cellules épithéliales

Il a été rapporté que le domaine ADPRT de la toxine ExoS est nécessaire pour la survie intracellulaire des bactéries, car il permet la formation de niches intracellulaires dans des proéminences de la membrane plasmique appelées « blebs » (Angus et al., 2010). La fonction supposée d'ExoS dans ce contexte serait de permettre à *P. aeruginosa* d'échapper aux vacuoles acides sensées la dégrader après son internalisation (Heimer et al., 2013).

b. Invasion de l'épithélium par une voie paracellulaire

D'autres groupes, peu nombreux, soutiennent le fait que *P. aeruginosa* exploite la voie paracellulaire pour envahir un épithélium.

Soong et ses collaborateurs ont montré par microscopie confocale qu'au cours de l'infection d'une monocouche de 16HBE (lignée cellulaire dérivée de cellules épithéliales bronchiques), *P. aeruginosa* franchit l'épithélium et reste à l'extérieur des cellules. Ils ont également démontré que le SST3, et notamment ExoS, est essentiel à cette activité. L'effet des toxines permettant l'invasion n'a en revanche pas été identifié, bien qu'une perturbation des jonctions serrées (et donc potentiellement de la perméabilité de la monocouche) ait été observée (Soong et al., 2008).

Le modèle le plus abouti pour étudier le franchissement d'un épithélium est celui proposé par Heiniger et ses collaborateurs à l'aide d'un modèle d'épithélium reconstitué à partir de cellules épithéliales primaires (voir Figure 21) (Heiniger et al., 2010).

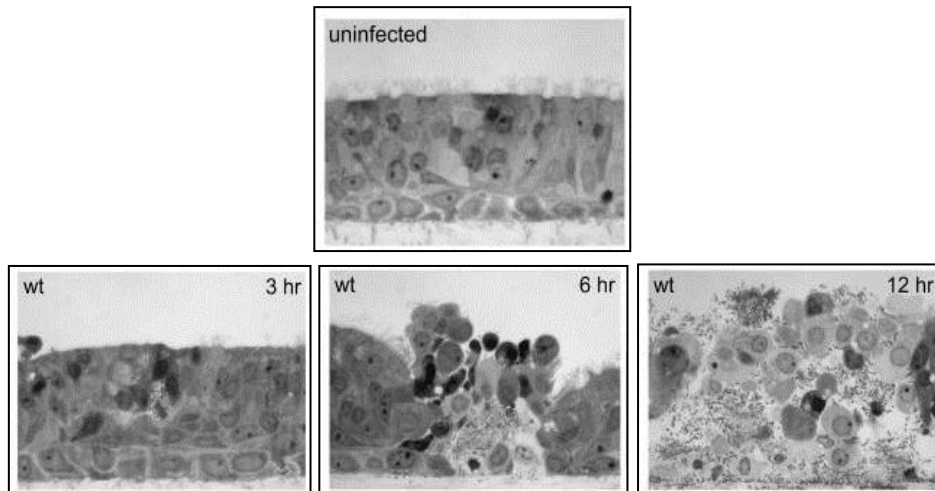


Figure 21 : Modèle d'infection d'épithélium développé par Heiniger et ses collaborateurs. (Haut) condition non infectée. (Bas) Infecté par *P. aeruginosa*, à 3h (gauche), 6h (milieu), 12h (droite) (Heiniger et al., 2010).

Ils ont observé que *P. aeruginosa* peut envahir un épithélium sans s'internaliser dans les cellules. Deux facteurs de virulence ont été identifiés comme nécessaires à ce phénomène : les pili et le SST3. Ils ont également constaté que les premiers événements d'adhésion de *P. aeruginosa* à l'épithélium se fait à des sites où des cellules sont extrudées de la monocouche, et ont proposé que l'invasion débute par ces sites (voir Figure 22).

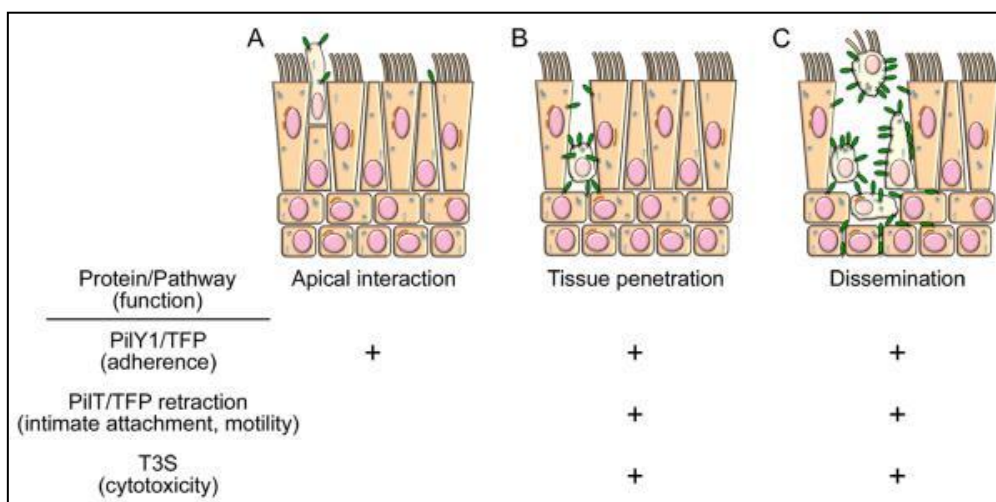


Figure 22 : Modèle d'invasion d'épithélium de muqueuse par *P. aeruginosa* proposé par Heiniger et ses collaborateurs.

La première étape d'adhésion dépend des pili, tandis que les étapes de pénétration et de dissémination dans l'épithélium dépendent des pili et du SST3 (Heiniger et al., 2010).

Le franchissement de l'épithélium a aussi été étudié par le groupe de Hayashi dans un modèle de monocouche de cellules épithéliales cultivées en chambre de Boyden (Transwell). Dans ce

système, les cellules sont cultivées sur une membrane poreuse séparant deux compartiments. Les bactéries sont inoculées du côté apical des cellules. Le franchissement de la monocouche est mesuré par comptage des bactéries dans le compartiment côté basal. L'importance des pili et du SST3 dans le franchissement de l'épithélium a été confirmée dans ce modèle (Hayashi et al., 2015). Cependant, cet essai se faisant à l'échelle macroscopique, il n'est pas possible de savoir si les bactéries utilisent une voie transcellulaire ou paracellulaire.

Une étude menée par Zulianello et collaborateurs à l'aide d'un modèle de monocouche de cellules épithéliales nasales a identifié les rhamnolipides sécrétés par *P. aeruginosa* comme étant importants pour l'invasion de l'épithélium (Zulianello et al., 2006). Dans ce modèle, *P. aeruginosa* n'est pas internalisé mais utilise une voie paracellulaire.

Plusieurs études rapportent que des molécules sécrétées par *P. aeruginosa* sont capables de modifier de manière transitoire les jonctions entre cellules épithéliales : LasB induit une ouverture transitoire des jonctions serrées (Nomura et al., 2014), et une molécule du quorum sensing, la 3O-C₁₂-HSL, peut perturber de façon transitoire les jonctions adhérentes (Vikstrom et al., 2009). Ces deux activités n'ont pour l'instant été étudiées qu'à partir de sécrétomes de *P. aeruginosa* ou de protéines purifiées, et des études supplémentaires sont nécessaires pour savoir si ces activités sont pertinentes au cours de l'infection.

B. Interaction avec les cellules endothéliales

L'interaction entre *P. aeruginosa* et les cellules endothéliales est un mécanisme bien moins décrit que pour les cellules épithéliales.

Au cours d'infections, *P. aeruginosa* pourra être confrontée à tous les types de vaisseaux sanguins dans la mesure où le sang peut lui servir de véhicule.

a. Internalisation de *P. aeruginosa*

En 1994 et 1997, des travaux portant sur l'internalisation de *P. aeruginosa* dans les cellules endothéliales ont été publiés (Plotkowski and Meirelles, 1997; Plotkowski et al., 1994). Ces travaux n'ont pas été repris par la suite.

b. Effet du SST3

La première étude portant sur l'effet du SST3 sur les cellules endothéliales a été publiée en 2002 (Saliba et al., 2002). Dans cette étude, l'effet des toxines du SST3 sur la morphologie des cellules endothéliales est décrit, sans qu'un mécanisme moléculaire soit donné. L'effet des toxines ExoS et ExoT sur le cytosquelette d'actine n'a été élucidé que récemment (Huber et al., 2014). L'effet de la toxine ExoY a également fait l'objet de plusieurs études, dont les résultats sont contradictoires : ExoY est décrit dans certaines études comme étant sans effet (Ganter et al., 2009; Huber et al., 2014) ou induisant une perte d'intégrité de l'endothélium par démantèlement des microtubules (Stevens et al., 2014).

L'étude *in vivo* de l'interaction entre *P. aeruginosa* et l'endothélium n'est pas chose aisée dans le contexte d'une infection externe. En effet, il n'existe pas de modèle animal permettant de n'observer que ce phénomène. Le modèle le plus communément utilisé pour l'étudier est la pneumonie aiguë, dans laquelle la perméabilité à un traceur (l'albumine) du poumon entier induite par *P. aeruginosa* est assimilée à celle de l'endothélium pulmonaire (on fait donc abstraction de l'épithélium pulmonaire). Une étude menée par Ganter et ses collaborateurs avec ce modèle a confirmé l'importance des toxines ExoS et ExoT dans la perméabilisation *in vivo* de l'endothélium pulmonaire (Ganter et al., 2009). Ils ont également mis en évidence le fait que la perméabilisation de l'endothélium peut être bloquée en inhibant l'intégrine $\alpha v \beta 5$.

c. Effet d'autres facteurs de virulence

L'effet d'autres facteurs de virulence sur les cellules endothéliales a également été documenté :

Le rôle de l'élastase LasB a été rapporté par plusieurs groupes. Cette protéase clive spécifiquement la VE-cadhérine (Beaufort et al., 2013; Golovkine et al., 2014) et l'occludine des cellules endothéliales encéphaliques. LasB dégrade également plusieurs protéines associées à la matrice extracellulaire : la fibronectine et le facteur de Von Willebrand (Beaufort et al., 2013). L'activité de l'élastase a été documentée dans un modèle *in vivo* par le groupe de Komori et ses collaborateurs. Les auteurs ont constaté que l'injection sous-cutanée ou intramusculaire d'élastase purifiée entraîne une forte hémorragie, associée à des modifications de la structure de la paroi des vaisseaux sanguins (Komori et al., 2001). Une étude *in vivo* menée par Pittet et ses collaborateurs indique quant à elle qu'une bactériémie à

une souche de *P. aeruginosa* sécrétant LasB fragilise les poumons et les rend plus susceptibles de développer une infection pulmonaire aiguë (Pittet et al., 1998).

Récemment, une shingomyélinase (hydrolase impliquée dans le métabolisme des sphingolipides, qui sont des lipides complexes présents entre autres dans les membranes plasmiques des cellules eucaryotes) sécrétée par *P. aeruginosa* a été identifiée comme étant spécifiquement cytotoxique envers les cellules endothéliales (Vasil et al., 2009).

Chapitre V : Mécanismes d'action d'autres pathogènes bactériens sur les barrières épithéliales et endothéliales

Les barrières tissulaires de l'organisme peuvent être franchies par de nombreux pathogènes. Ce phénomène peut avoir lieu dans deux contextes :

- La fonction de barrière d'un tissu peut être compromise par un moyen physique (blessure, chirurgie, pose de cathéter, etc.) ou dans certains contextes génétiques ou immunitaires (dysfonctionnement d'un gène impliqué dans le fonctionnement de la barrière, inflammation, etc.).
- Les barrières peuvent aussi être franchies activement par des pathogènes.

C'est cette dernière situation qui sera développée dans ce chapitre. De nombreux pathogènes sont capables de franchir activement les barrières de l'organisme pour coloniser les tissus sous-jacents comme nous le montrons pour *P. aeruginosa*.

Les pathogènes impliqués dans le franchissement des barrières tissulaires peuvent être des parasites, virus ou bactéries. Dans ce chapitre, seuls les mécanismes mis en œuvre par des pathogènes bactériens seront décrits. Deux barrières seront prises pour exemple : la barrière intestinale et la barrière hémato-encéphalique.

La principale barrière susceptible d'être franchie par des bactéries est la barrière intestinale, qui est une barrière épithéliale. La majorité des études d'interactions hôtes/pathogènes porte sur les mécanismes d'invasion de cette barrière. Les principaux pathogènes qui lui sont associés sont les bactéries du type *Salmonella*, *Shigella* ou *Listeria*. Ces bactéries utilisent une voie transcellulaire pour accéder aux tissus sous-jacents de l'épithélium.

Le franchissement de la barrière hémato-encéphalique a également été étudié. Cette barrière endothéliale est confrontée à des pathogènes au cours de bactériémies. Les mécanismes mis en œuvre par les pathogènes bactériens pour franchir cette barrière sont diverses : les voies

utilisées peuvent être transcellulaire, paracellulaire ou par des mécanismes dits de « cheval de Troie ». Dans ce chapitre, une bactérie en particulier sera prise pour exemple : *Neisseria meningitidis*.

La barrière pulmonaire, qui est celle prise pour cible par *P. aeruginosa* dans la majorité des infections, est beaucoup moins fréquemment franchie par des pathogènes bactériens que les deux barrières décrites ci-dessus. Néanmoins, certaines bactéries telles que *Streptococcus pneumoniae* ou *Staphylococcus aureus* emploient des mécanismes originaux qui seront détaillés ici.

A. La voie transcellulaire

La majorité des pathogènes bactériens emploient une voie transcellulaire pour franchir les barrières tissulaire chez l'être humain. Pour le franchissement de la barrière épithéliale, plusieurs mécanismes impliquant une internalisation des bactéries ont été rapportés. Les pathogènes peuvent exploiter le fait que certaines cellules de l'hôte (les cellules M ou les cellules dendritiques) échantillonnent le contenu de l'intestin. Alternativement, certains pathogènes sont capables de provoquer leur entrée dans les cellules épithéliales non phagocytaires. Les différents mécanismes de franchissement de la barrière intestinale sont représentés dans la Figure 25. Pour franchir l'endothélium, certains pathogènes tels que *S. aureus* ont développé une stratégie alternative : ils sont capables d'induire la formation de tunnels dans les cellules endothéliales, ce qui leur permet d'accéder à la matrice extracellulaire sous-jacente par une voie transcellulaire n'impliquant pas une internalisation dans la cellule (Boyer et al., 2006; Lemichez et al., 2010).

a. Phagocytose par des cellules spécialisées

On trouve dans l'intestin des agrégats de follicules appelés « plaques de Peyer ». Ces follicules sont composés de cellules dendritiques et de lymphocytes B et T. Ils sont séparés de l'intestin par des cellules M, dont le rôle est de capturer des antigènes dans la lumière de l'intestin, de leur faire franchir la barrière épithéliale par endocytose puis de les présenter aux cellules immunitaires de la plaque de Peyer (voir Figure 23).

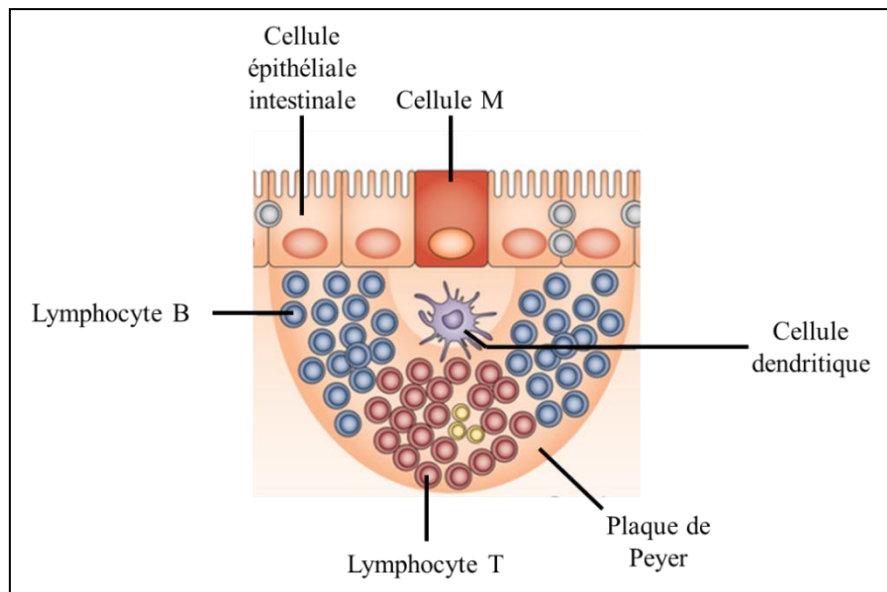


Figure 23 : Organisation des plaques de Peyer
Adapté de (Jain and Walker, 2015)

Plusieurs pathogènes bactériens tels que *Salmonella*, *Yersinia* ou *Shigella flexneri* peuvent exploiter le mécanisme d'endocytose des cellules M pour accéder aux tissus sous-jacents (Corr et al., 2008). Une fois dans les plaques de Peyer, ces pathogènes emploient différentes stratégies pour coloniser l'hôte : *Salmonella typhimurium* est phagocytée par les macrophages et les cellules dendritiques, à l'intérieur desquelles elle peut survivre et coloniser d'autres tissus (tactique du cheval de Troie, décrite ci-après). *Yersinia* reste extracellulaire en empêchant sa phagocytose par les macrophages. *S. flexneri* envahit les cellules épithéliales intestinales par leur côté basal et s'y développe, pouvant ensuite se déplacer de cellule en cellule par un mécanisme dépendant de l'actine (Corr et al., 2008).

Il est à noter que des cellules dendritiques peuvent également sonder directement la lumière de l'intestin (voir Figure 25). Ce mécanisme peut être exploité par *S. typhimurium* pour accéder aux tissus sous-jacents de l'épithélium (Ribet and Cossart, 2015).

b. Entrée dans les cellules non phagocytaires

Certains pathogènes bactériens sont également capables de traverser la barrière intestinale en provoquant leur internalisation dans des cellules épithéliales non phagocytaires. Deux mécanismes d'entrée dans les cellules sont documentés : le « trigger » et le « zipper » (voir Figure 24).

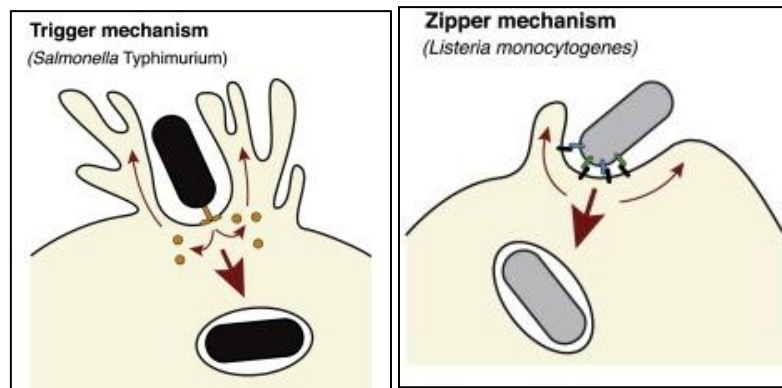


Figure 24 : Mécanismes d'entrée des bactéries dans les cellules épithéliales (Ribet and Cossart, 2015)

i. Mécanisme « trigger »

En plus de sa capacité à envahir les cellules M, *S. typhimurium* peut provoquer son internalisation dans des cellules non phagocytaires par le mécanisme « trigger ». Pour cela, *S. typhimurium* injecte des toxines via un premier SST3 (le SST3-1) dans le cytoplasme de la cellule hôte, ce qui entraîne des réarrangements du cytosquelette d'actine et la formation de protrusions membranaires conduisant à l'internalisation de la bactérie. *S. typhimurium* peut alors proliférer à l'intérieur de la cellule ou la traverser pour accéder à la lamina propria (tissu conjonctif sous l'épithélium intestinal). Chacune de ces deux activités dépend du SST3-2, le deuxième SST3 de *S. typhimurium* (Muller et al., 2012). *S. flexneri* est également capable d'être internalisée par des cellules épithéliales en induisant sa capture par des filopodes de la surface apicale des cellules (Carayol and Tran Van Nhieu, 2013).

ii. Mécanisme « zipper »

Listeria monocytogenes est une bactérie à Gram positif capable de franchir les barrières intestinale, hémato-encéphalique ou placentaire. Elle est capable de provoquer son internalisation dans les cellules épithéliales intestinales par le mécanisme « zipper », pour lequel l'interaction d'une adhésine bactérienne à une protéine de l'hôte déclenche l'internalisation de la bactérie.

Un des deux récepteurs utilisés par *L. monocytogenes* pour son entrée dans les cellules épithéliales est la E-cadhérine. Cette protéine est reconnue par une molécule de surface de la bactérie, InlA, qui fait partie de la famille des internalines. InlA interagit spécifiquement avec la E-cadhérine des cellules épithéliales, et induit le recrutement de facteurs d'endocytose ainsi

qu'un remodelage du cytosquelette d'actine, conduisant à l'entrée de la bactérie dans la cellule (Pizarro-Cerda et al., 2012).

De manière intéressante, *L. monocytogenes* cible des points précis de l'épithélium pour cette internalisation. En effet, la E-cadhérine ne lui est en temps normal pas accessible, car elle est protégée par les jonctions serrées. Ainsi, ce pathogène cible des sites d'irrégularités de l'épithélium intestinal où la E-cadhérine est exposée. Les sites identifiés sont les zones d'extrusion de cellules épithéliales aux extrémités de villosités intestinales, les cellules caliciformes sécrétrices de mucus (Goblet cells) (voir Figure 25), et les replis de villosités intestinales (Pizarro-Cerda et al., 2012).

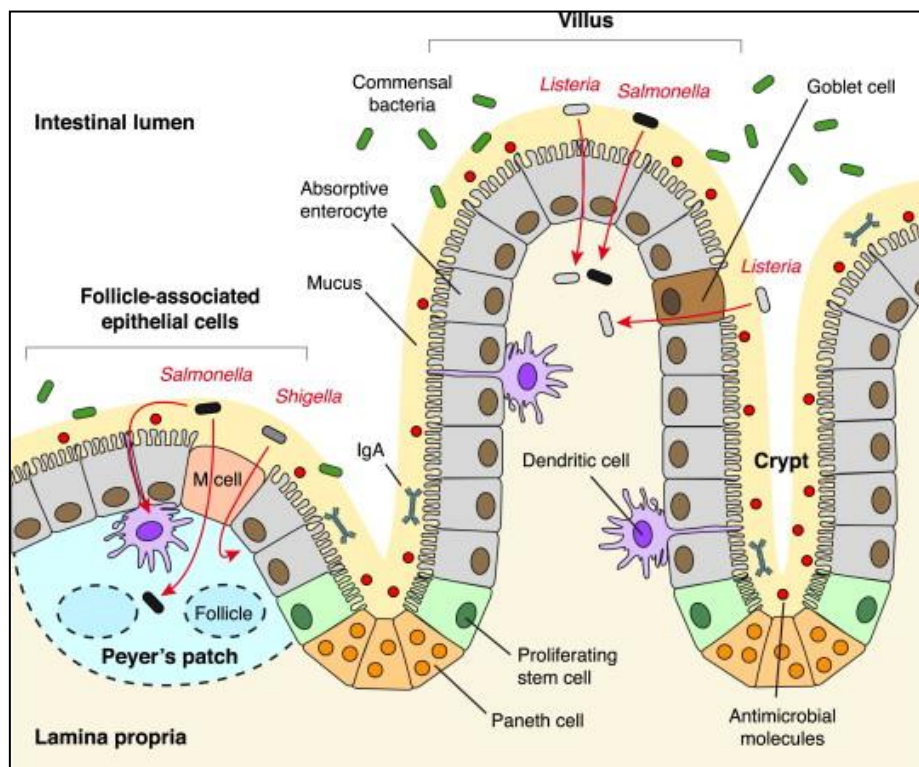


Figure 25 : Franchissement de la barrière intestinale par *Salmonella*, *Shigella* et *Listeria* (Ribet and Cossart, 2015)

c. Formation de tunnels transcellulaires

Certaines souches de *S. aureus* peuvent sécréter une exoenzyme, EDIN, qui induit la formation transitoire de larges tunnels transcellulaires appelés « macroapertures » dans des cellules endothéliales. La formation de ces tunnels, ayant un diamètre de l'ordre de la dizaine de micromètres, résulte d'une dissolution des filaments d'actine suite à une inactivation de la GTPase RhoA par EDIN. La formation de ces tunnels est associée à une augmentation de la

perméabilité de l'endothélium, et permet l'accès et l'adhésion des bactéries à la matrice extracellulaire sous-jacente (Lemichez et al., 2010).

L'induction de la formation de ces tunnels transcellulaires a également été observée pour *Bacillus anthracis* et *Bacillus pertussis*, indiquant que ce mécanisme peut être employé par différents pathogènes bactériens (Maddugoda et al., 2011).

La voie transcellulaire est le principal mécanisme utilisé par les pathogènes bactériens pour franchir les barrières tissulaires de l'organisme. La majorité des pathogènes responsables de méningites sont capables de franchir la barrière hémato-encéphalique par ce mécanisme. On retrouve parmi ceux-ci : *Escherichia coli*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* ou *L. monocytogenes*. Cependant, certains de ces pathogènes pourront utiliser également une voie paracellulaire (*N. meningitidis*) ou le mécanisme du « cheval de Troie » (*L. monocytogenes*) (Dando et al., 2014). Ces deux stratégies seront détaillées ci-après.

B. La voie paracellulaire

La voie paracellulaire de franchissement des barrières tissulaires n'est pas un mécanisme communément utilisé par les pathogènes bactériens, alors qu'il est fréquemment exploité par les parasites tels que *Toxoplasma gondii* (Doran et al., 2013).

Le franchissement des barrières tissulaires passe par une perturbation des jonctions cellulaires. Dans la majorité des cas, ce sont les jonctions serrées qui sont altérées par les pathogènes, car elles sont les structures jonctionnelles les plus accessibles. Cependant, certains pathogènes sont également capables d'interagir directement ou indirectement avec les jonctions adhérentes.

Parmi les cas d'interaction avec les jonctions adhérentes, celui de *N. meningitidis* sera décrit en détail car il concerne le franchissement d'une barrière endothéliale par un mécanisme présentant des similitudes avec celui décrit pour *P. aeruginosa* dans le Chapitre VI. En effet, *N. meningitidis* est capable de franchir la barrière hémato-encéphalique en agissant sur la VE-cadhérine.

a. Jonctions serrées

Certains pathogènes bactériens sont capables d'induire un remodelage ou une altération des jonctions serrées. Les mécanismes mis en œuvre peuvent être de différentes natures. Ils peuvent reposer sur la sécrétion de toxines dans le milieu extracellulaire, comme c'est le cas pour *Vibrio cholerae*, *Clostridium difficile* ou *Clostridium perfringens*. Alternativement, ils peuvent également dépendre de l'injection de toxines, comme c'est le cas pour *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* ou *Helicobacter pylori* (Bonazzi and Cossart, 2011; Guttman and Finlay, 2009).

La perturbation des jonctions serrées des cellules épithéliales intestinales entraîne une forte augmentation de la perméabilité de l'épithélium et peut localement induire des dégâts tissulaires pouvant conduire à une invasion de la lamina propria (Doran et al., 2013).

b. Jonctions adhérentes

La majorité des interactions entre des pathogènes bactériens et les jonctions adhérentes a été décrite pour les cellules épithéliales. Certains pathogènes bactériens sont capables de rompre les jonctions serrées pour accéder aux jonctions adhérentes. Différents mécanismes d'interaction avec ces jonctions ont été rapportés : les bactéries peuvent sécréter des molécules qui vont directement les dégrader ou induire indirectement leur dégradation.

i. *Clivage direct de la E-cadhérine*

Quelques bactéries sécrètent des protéases capables de dégrader la E-cadhérine. Parmi ces pathogènes, on retrouve *Bacteroides fragilis*, *Porphyromonas gingivalis* ou *Enterococcus faecalis* (Costa et al., 2013). Récemment, HtrA, une sérine protéase capable de dégrader la E-cadhérine, a été identifiée chez plusieurs bactéries à Gram négatif tels que *E. coli*, *S. flexneri* et *H. pylori* (Hoy et al., 2012). Les protéases sécrétées par ces bactéries clivent le domaine extracellulaire de la E-cadhérine.

ii. *Clivage indirect de la E-cadhérine*

Staphylococcus aureus, une bactérie à Gram positif pouvant provoquer des intoxications alimentaires, des infections localisées, voire des septicémies dans les cas les plus graves, peut sécréter des « pore-forming toxins » (un type d'exotoxines) pouvant induire un clivage de la

E-cadhérine par le biais de la protéase ADAM10 de l'hôte. ADAM10 est une métalloprotéase impliquée en temps normal dans le renouvellement des jonctions cellulaires. Elle est capable de cliver le domaine extracellulaire de la E-cadhérine. L'exotoxine sécrétée par *S. aureus*, l' α -hémolysine, est capable d'induire une suractivation d'ADAM10, entraînant une perturbation des jonctions cellulaires par clivage de la E-cadhérine. Ce processus participe fortement à la pathogénicité de cette bactérie (Inoshima et al., 2011). Un mécanisme équivalent a été observé pour *H. pylori*, mais le facteur de virulence responsable de cette activité n'a pas encore été identifié (Costa et al., 2013).

Il est à noter que *S. aureus* induit également une suractivation d'ADAM10 dans les cellules endothéliales, induisant un clivage de la VE-cadhérine et une augmentation des dommages au système vasculaire (Powers et al., 2012).

iii. Délocalisation des cadhérines des jonctions cellulaires

N. meningitidis est une bactérie à Gram négatif pouvant provoquer deux types de pathologies chez l'être humain : des méningites et des septicémies aiguës. Pour provoquer des méningites, *N. meningitidis* est capable de franchir la barrière hémato-encéphalique. L'invasion du liquide cérébro-spinal s'opère en trois étapes : les bactéries adhèrent à la surface des cellules endothéliales, se développent sous forme de microcolonies, puis franchissent la barrière endothéliale. Deux mécanismes de franchissement de cette barrière sont proposés : la voie transcellulaire et la voie paracellulaire. La capacité de *N. meningitidis* à entrer dans les cellules endothéliales ou à ouvrir les jonctions cellulaires a été démontrée *in vitro*, mais reste à prouver *in vivo* (Miller et al., 2013).

L'adhésion de *N. meningitidis* aux cellules endothéliales par le biais de ses pili de type IV induit le recrutement de l'adrénorécepteur β_2 , ce qui conduit à la formation d'une structure appelée « plaque corticale ». La formation de ces plaques corticales entraîne le recrutement de plusieurs molécules (Ezrine, β -arrestine etc.), qui provoquent une polymérisation de l'actine d'une part, et le recrutement des caténines et de la VE-cadhérine situées aux jonctions d'autre part. La délocalisation des protéines jonctionnelles entraîne l'ouverture d'une voie paracellulaire, qui peut être exploitée par *N. meningitidis* pour franchir la barrière endothéliale (Coureuil et al., 2013) (voir Figure 26).

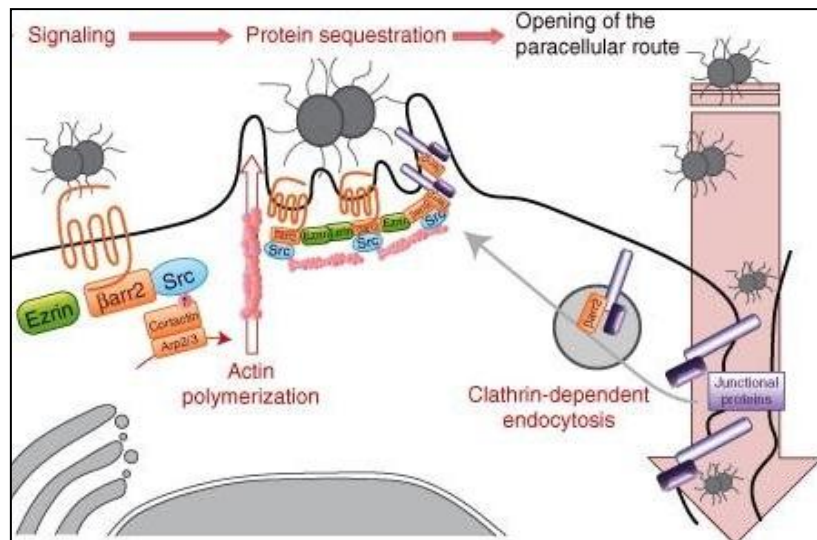


Figure 26 : Mécanisme d'ouverture des jonctions cellulaires au niveau de la barrière hémato-encéphalique par *N. meningitidis* (Coureuil et al., 2013)

E. coli K1 est capable d'utiliser un mécanisme similaire : sa protéine de surface OmpA est capable d'induire une dissociation de la β -caténine et de la VE-cadhérine, entraînant une ouverture des jonctions adhérentes et permettant un franchissement de la barrière hématoencéphalique par une voie paracellulaire (Dando et al., 2014).

C. Mécanisme du « cheval de Troie »

Le mécanisme du « cheval de Troie » est une tactique employée par certains parasites (tels que *Toxoplasma gondii*) ainsi que par des bactéries intracellulaires. Les principaux pathogènes bactériens utilisant ce mécanisme sont *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium et typhi*, *Shigella*, *Yersinia* etc.

Les principales cellules phagocytaires du système immunitaire sont les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques. Les particules ou bactéries phagocytées par ces cellules sont dégradées par le mécanisme suivant :

- La bactérie est incluse dans une vacuole appelée phagosome.
- Le phagosome mature en s'acidifiant.
- Il fusionne avec une autre vacuole appelée lysosome qui contient des enzymes (lipases, protéases, osidases) formant ainsi un phagolysosome.

La majorité des bactéries phagocytées par les macrophages et les neutrophiles ne résistent pas à l'acidification du phagosome et aux enzymes du phagolysosome. Cependant, les pathogènes mentionnés ci-dessus ont développé des mécanismes pour survivre à l'intérieur des cellules phagocytaires. Les principales stratégies recensées sont :

- Empêcher la fusion entre phagosome et lysosome, ou empêcher l'acidification de la vacuole contenant la bactérie (mécanisme employé par *L. pneumophila*, *M. tuberculosis* ou *Salmonella*)
- S'échapper du phagosome pour survivre dans le cytosol (*L. monocytogenes* ou *Shigella*) (Kumar and Valdivia, 2009).

Ces pathogènes exploitent alors les capacités de migration des cellules phagocytaires pour disséminer dans de nouveaux tissus ou pour franchir des barrières tissulaires. Par exemple, les cellules dendritiques sont exploitées par certains pathogènes pour franchir la barrière intestinale (Niedergang et al., 2004). Le mécanisme du « cheval de Troie » est également utilisé par *L. monocytogenes*, *M. tuberculosis*, *Brucella* ou *Salmonella* pour franchir la barrière hémato-encéphalique (Doran et al., 2013).

D. Induction de l'inflammation

Les pathogènes bactériens peuvent également exploiter les dégâts causés par la réponse inflammatoire de l'hôte pour franchir certaines barrières tissulaires.

L'inflammation est un processus biologique complexe activé en réponse à des stimuli de danger, notamment les pathogènes bactériens. L'inflammation en réponse à une infection est déclenchée par les cellules immunitaires (macrophages, cellules dendritiques, etc.) qui résident dans l'organe touché. En réponse à des pathogènes, ceux-ci vont sécréter des médiateurs inflammatoires, qui sont responsables des manifestations cliniques de l'inflammation (rougeur, raideur et gonflement) et du recrutement de leucocytes (principalement des neutrophiles et des macrophages) sur le site inflammatoire. La fonction des leucocytes est d'endiguer l'infection, soit par phagocytose soit par sécrétion d'enzymes.

L'inflammation est un phénomène d'importance capitale dans la lutte contre les pathogènes. Cependant, une réponse inflammatoire excessive peut engendrer des dommages tissulaires qui peuvent être exploités par certaines bactéries. Par exemple, certaines cytokines inflammatoires comme le TNF- α peuvent provoquer une perturbation des jonctions serrées et compromettre l'intégrité de la barrière intestinale, ce qui peut faciliter l'accès de certains pathogènes à la lamina propria (Ribet and Cossart, 2015). De même, il a été démontré que les dégâts tissulaires engendrés par les neutrophiles participent à l'invasion du système nerveux par certaines bactéries du genre *Streptococcus* (Doran et al., 2013).

E. Comparaison à *P. aeruginosa*

Les pathogènes bactériens ont développé des stratégies extrêmement complexes et diversifiées pour franchir les barrières tissulaires de leurs hôtes. Cependant, nous pouvons constater que ces stratégies répondent à un ou plusieurs des principes suivants :

- Les bactéries interagissent avec les cellules par le biais de toxines ou de molécules d'adhésion pour provoquer leur internalisation ou leur passage par une voie paracellulaire.
- Les bactéries exploitent généralement les faiblesses ou les particularités d'un tissu.
- Les jonctions cellulaires peuvent être perturbées par différents mécanismes.
- Le système immunitaire peut parfois être corrompu et servir de vecteur à la dissémination bactérienne.

Dans les deux études présentées ci-après dans ce manuscrit, nous montrons que *P. aeruginosa* n'échappe pas à ces principes généraux.

Dans le Chapitre VI, nous montrons que pour le franchissement de la barrière endothéliale, *P. aeruginosa* utilise une tactique fréquente chez les pathogènes bactériens : l'interaction avec les jonctions. Les bactéries ont développé des mécanismes extrêmement sophistiqués pour interagir avec les jonctions serrées ou adhérentes : sécrétion de protéases, corruption des mécanismes de signalisation de l'hôte, etc. Dans cette étude, nous montrons qu'une protéase de *P. aeruginosa* peut cliver spécifiquement la VE-cadhérine.

Pour le franchissement de la barrière épithéliale, nous montrons dans le Chapitre VII que *P. aeruginosa* est capable d'exploiter des propriétés spécifiques de l'épithélium (divisions cellulaires ou morts cellulaires). Cette tactique présente également des similitudes avec celles employées par d'autres pathogènes. En effet, pour franchir l'épithélium intestinal, la majorité des pathogènes ciblent des types cellulaires particuliers de l'épithélium (cellules M exploitées par *S. typhimurium* et *S. flexneri*) ou des points précis impliqués dans le renouvellement de l'épithélium (extrémités des villosités intestinales exploités par *L. monocytogenes*).

Résultats et Discussion

Chapitre VI : Franchissement de la barrière endothéliale par *P. aeruginosa*

A. Introduction

L'interaction entre *P. aeruginosa* et les cellules endothéliales est un phénomène qui a été peu étudié jusqu'à présent. Une des rares études portant sur ce sujet a été menée en 2002 par Saliba et ses collaborateurs (Saliba et al., 2002). Dans ces travaux, l'importance du SST3 dans l'infection de cellules endothéliales a été clairement démontrée. Toutefois, les mécanismes moléculaires d'action des toxines du SST3 n'ont pas été abordés dans cette étude.

A mon arrivée au sein de l'équipe Pathogénèse Bactérienne et Réponses Cellulaires, l'effet de ces toxines sur cellules endothéliales était en cours de caractérisation. Durant ces travaux, une diminution de la quantité de VE-cadhérine au cours de l'infection a été constatée. Cette diminution a été caractérisée comme indépendante du SST3 (voir Figure 27), mais les facteurs de virulence responsables n'avaient pas encore été identifiés.

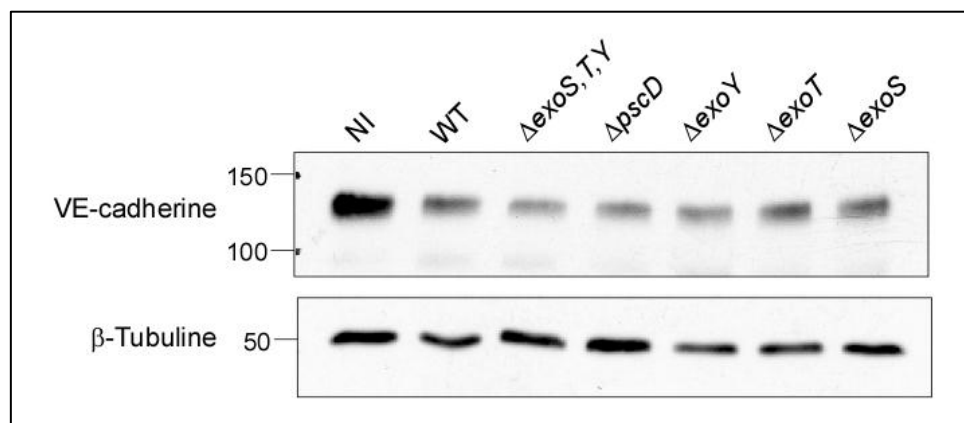


Figure 27 : Diminution de la quantité de VE-cadhérine au cours de l'infection, par un mécanisme indépendant du SST3 (données non publiées)

Mon rôle a été de caractériser ce phénomène. J'ai montré que cette diminution de la quantité de VE-cadhérine au cours de l'infection correspondait en réalité à un clivage du domaine

extracellulaire de la VE-cadhérine par la métalloprotéase LasB, sécrétée par le SST2 de *P. aeruginosa*.

Ce clivage, observé initialement sur cellules endothéliales, a été vérifié *in vitro* à l'aide protéines purifiées. Par séquençage N-terminal des fragments de dégradation de la VE-cadhérine, nous avons pu identifier deux sites de clivage de LasB dans la séquence de la VE-cadhérine. Nous avons également vérifié que ce clivage a bien lieu *in vivo*, dans un modèle murin de pneumonie aiguë dans lequel nous avons mesuré les quantités de VE-cadhérine pulmonaire après infection.

Cette dégradation de la VE-cadhérine entraîne une ouverture des jonctions et une rétraction modérée des cellules endothéliales, ce qui devrait permettre le franchissement de la barrière vasculaire par les bactéries.

La rétraction des cellules endothéliales au cours de l'infection par *P. aeruginosa* dépend essentiellement des toxines du SST3 (Huber et al., 2014). Plusieurs études sur cellules épithéliales ont démontré que l'injection des toxines du SST3 s'opère du côté basolatéral des cellules (Fleiszig et al., 1997; Lee et al., 1999). De manière intéressante, nous observons dans cette étude que le SST2 renforce la rétraction médiée par le SST3 sur cellules endothéliales confluentes. Cet effet synergique n'étant pas retrouvé sur cellules éparses ou sous-confluentes, nous proposons un nouveau modèle d'infection des cellules endothéliales. Selon ce modèle, l'injection des toxines du SST3 s'opère du côté basolatéral des cellules (comme pour les cellules épithéliales), et l'ouverture des jonctions médiée par LasB est un évènement permettant l'accès des bactéries à ce domaine. L'infection des cellules endothéliales dépend donc d'une coopération entre deux facteurs de virulence considérés généralement comme indépendants.

L'importance du SST2 dans la mortalité a déjà été évaluée par d'autres groupes dans un modèle d'infection pulmonaire aiguë chez la souris (Jyot et al., 2011). Dans notre étude, nous démontrons son importance pour la dissémination de *P. aeruginosa* dans l'organisme à l'aide d'un modèle murin d'infection pulmonaire aiguë.

Par ailleurs, nous avons cherché à déterminer si ce clivage est un mécanisme spécifique de l'endothélium, ou s'il peut être retrouvé dans d'autres types de tissus. Nous avons déterminé

que la E-cadhérine des cellules épithéliales est résistante à l'action protéolytique de LasB. Les mécanismes mis en place par *P. aeruginosa* pour franchir l'épithélium sont donc différents de ceux employés pour l'endothélium. Ce constat fournit la base de réflexion de l'étude détaillée dans le Chapitre VII.

B. Publication dans PLoS pathogens

VE-Cadherin Cleavage by LasB Protease from *Pseudomonas aeruginosa* Facilitates Type III Secretion System Toxicity in Endothelial Cells

Guillaume Golovkine^{1,2,3,4}, Eric Faudry^{1,2,3,4}, Stéphanie Bouillot^{1,2,3,4}, Romé Voulhoux⁵, Ina Attrée^{1,2,3,4}, Philippe Huber^{1,2,3,4*}

1 INSERM, U1036, Biology of Cancer and Infection, Grenoble, France, **2** CNRS, ERL 5261, Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses, Grenoble, France, **3** Université Joseph Fourier–Grenoble I, Grenoble, France, **4** CEA, DSV/iRTSV, Grenoble, France, **5** CNRS and Aix-Marseille Univ, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires (UMR7255), Marseille, France

Abstract

Infection of the vascular system by *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) occurs during bacterial dissemination in the body or in blood-borne infections. Type 3 secretion system (T3SS) toxins from *Pa* induce a massive retraction when injected into endothelial cells. Here, we addressed the role of type 2 secretion system (T2SS) effectors in this process. Mutants with an inactive T2SS were much less effective than wild-type strains at inducing cell retraction. Furthermore, secretomes from wild-types were sufficient to trigger cell-cell junction opening when applied to cells, while T2SS-inactivated mutants had minimal activity. Intoxication was associated with decreased levels of vascular endothelial (VE)-cadherin, a homophilic adhesive protein located at endothelial cell-cell junctions. During the process, the protein was cleaved in the middle of its extracellular domain (positions 335 and 349). VE-cadherin attrition was T3SS-independent but T2SS-dependent. Interestingly, the epithelial (E)-cadherin was unaffected by T2SS effectors, indicating that this mechanism is specific to endothelial cells. We showed that one of the T2SS effectors, the protease LasB, directly affected VE-cadherin proteolysis, hence promoting cell-cell junction disruption. Furthermore, mouse infection with *Pa* to induce acute pneumonia lead to significant decreases in lung VE-cadherin levels, whereas the decrease was minimal with T2SS-inactivated or LasB-deleted mutant strains. We conclude that the T2SS plays a pivotal role during *Pa* infection of the vascular system by breaching the endothelial barrier, and propose a model in which the T2SS and the T3SS cooperate to intoxicate endothelial cells.

Citation: Golovkine G, Faudry E, Bouillot S, Voulhoux R, Attrée I, et al. (2014) VE-Cadherin Cleavage by LasB Protease from *Pseudomonas aeruginosa* Facilitates Type III Secretion System Toxicity in Endothelial Cells. *PLoS Pathog* 10(3): e1003939. doi:10.1371/journal.ppat.1003939

Editor: Barbara I. Kazmierczak, Yale University, United States of America

Received: August 20, 2013; **Accepted:** January 6, 2014; **Published:** March 13, 2014

Copyright: © 2014 Golovkine et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Commissariat à l'Énergie Atomique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Centre National de la Recherche Scientifique and Joseph Fourier University. Part of this work was also supported by the Alliance pour les sciences de la Vie et de la Santé program in infectiology and FINOVI foundation. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: phuber@cea.fr

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic Gram-negative pathogen that is responsible for nosocomial infections. It can cause chronic infections, which especially afflict cystic fibrosis patients, and acute infections, which often occur in patients bearing internal medical devices like ventilators, blood and urine catheters, or injection locks. *P. aeruginosa*-infected patients are difficult to cure because clinical strains are often multiresistant to antibiotics. Mortality rate was estimated to be 20–75% in *P. aeruginosa*-infected patients depending on infection site and antibiotic treatments (see [1,2] and references therein).

Like most Gram-negative bacteria, *P. aeruginosa* utilizes several virulence factors during the infection process. The mortality of model animals was attributed to two major virulence determinants, the type 3 secretion system (T3SS) and the type 2 secretion system (T2SS) [3,4]. The T3SS consists of an injectisome that is synthesized and assembled on the bacterial surface once bacteria are in the vicinity of host cells [5–7]. This syringe-like system

injects toxins directly into the cytoplasm of target cells. Four T3 exotoxins have been identified in *P. aeruginosa* strains: ExoS, ExoT, ExoU and ExoY. ExoS and ExoT are highly homologous bifunctional toxins endowed with both GTPase-activating-protein (GAP) and ADP-ribosyl-transferase (ADPRT) activities. ExoS and ExoT target and inactivate various substrates, including GTPases and adaptor proteins. This ultimately produces cofilin activation, actin cytoskeleton dismantlement, focal adhesion loss and cell apoptosis [7,8]. ExoU has very efficient phospholipase activity that permeabilizes the plasma membrane and rapidly leads to necrotic cell death [7]. ExoY is an adenylate cyclase, whose toxicity remains elusive [8,9]. *P. aeruginosa* strains usually secrete a maximum of 3 exotoxins, ExoS and ExoU being mutually exclusive. The T3SS is required for toxicity and bacterial dissemination in mouse models of acute pneumonia [4]. Furthermore, the T3SS was shown to be necessary for bacterial survival in the blood in septicemic models [4].

Another secretion system contributing to *P. aeruginosa* virulence is the T2SS [10,11]. This system secretes several proteases into the

Author Summary

Pseudomonas aeruginosa (*Pa*) is a leading agent of nosocomial infections in humans, and clinical isolates are often multiresistant to antibiotics. As with most Gram-negative bacteria, *Pa* possesses a type III secretion system which consists of an injectisome through which the bacterium injects exotoxins inducing cytoskeleton collapse and apoptosis. *Pa* also delivers various toxins in the extracellular milieu by the type II secretion system, including the protease LasB. In order to disseminate throughout the body from the infection site and eventually reach the blood, the bacterium generally needs to cross the main barriers of the organism: the epithelium, the basal lamina and the vascular endothelium. Here we show that LasB specifically cleaves one main component of endothelial cell-to-cell junctions, the adhesive protein VE-cadherin, thus leading to junction disruption and endothelial barrier breakdown. VE-cadherin proteolysis also facilitates the action of type III exotoxins in endothelial cells. This cleavage mechanism is likely of major importance in *Pa* pathogenesis, as suggested by our bacterial dissemination experiments in mice.

extracellular milieu, including elastases LasA and LasB, protease IV (PrpL) and IMPa (PmpA), as well as phospholipases and a potent toxin named exotoxin A. Type 2 secretion is a two-step process: effectors first translocate in the periplasm using Sec or Tat export machinery and are subsequently ejected into the surrounding medium by a piston-like structure called the type 2 secretion [12]. LasB is the major extracellular protease that degrades matrix proteins such as elastin, fibronectin and vitronectin, as well as a restricted number of cell receptors [10,11]. The protease IMPa is an immunomodulating metalloprotease that prevents neutrophil extravasation and thereby protects *P. aeruginosa* from neutrophil attack [13]. Type 2 effectors are thought to be major agents of basal lamina destruction and immunomodulation. T2SS toxicity was recently examined using a mouse acute pneumonia model [3]. In absence of the T3SS, the T2SS-positive strain induced mouse death, albeit delayed compared to the T3SS-positive strain. Bacteria lacking both secretion systems were avirulent. This result tends to demonstrate that the T2SS contributes to bacterial pathogenicity, although to a lesser extent than T3SS effectors.

In this work we explored the effects of the T2SS of *P. aeruginosa* on endothelial cells. These cells are exposed to bacteria either

through blood-borne infections or when bacteria disseminate from mucosa infection primary sites. In the latter situation, systemic infection is achieved when bacteria cross the epithelial or mesothelial barrier, the basal lamina and the endothelium.

In endothelial cells, we recently reported that the T3SS induces striking cell retraction that parallels increased paracellular permeability [8]. Here, we show that T2SS inactivation delayed T3SS-induced cell retraction. *P. aeruginosa*'s secretomes induced gap formation between cells only when strains were T2SS competent. We show that LasB is required for this activity by directly cleaving VE (vascular endothelial)-cadherin, an essential adhesive component of endothelial adherens junctions, but LasB has no effect on epithelial (E)-cadherin. VE-cadherin proteolysis was also observed in mouse models of infection with *P. aeruginosa*. LasB-mediated cleavage releases the adhesive domain of VE-cadherin, rendering the protein unable to maintain cell-cell junctions. Based on these findings, a cooperation model is proposed between the T2SS and T3SS.

Results

***P. aeruginosa*'s T2SS contributes to rapid T3SS-dependent cell intoxication**

As we previously reported, endothelial cell retraction by *P. aeruginosa* is dependent upon its T3SS [8]. Only small amounts of retraction were observed in absence of all T3SS effectors or the injectisome. Here, we wondered whether the T2SS contributes to T3SS-induced cell retraction. To this end, we used two *P. aeruginosa* strains, PAO1Δ*xcpR* and CHAΔ*xcpR*, both possessing a fully active T3SS (Fig. S1A), but lacking XcpR, a protein essential for secretion through the T2S pathway (Table 1) [14]. Infections were performed on HUVECs, which are primary cells derived from human umbilical cord veins (Fig. 1A,B). The lack of a functional T2SS in CHA and PAO1 resulted in significantly lower retraction when compared to the cognate wild-type strains at all times post-infection (p.i.). As controls, we used mutant strains lacking a functional T3SS (PAO1Δ*pseD* and CHAΔ*pseF*). Both T3SS-inactive strains induced minimal but significant cell retractions at 4.5 h.p.i. (Fig. 1A,B), thus confirming that the T3SS had the major toxic effect. The fact that T3SS-inactive strains still induced a low but significant retraction at 3 (for CHA) and 4.5 (for PAO1) h.p.i. compared to uninfected cells indicates that other factors, possibly those secreted by the T2SS, induced retraction. The extent of cell retraction induced by wild-type strains was higher than the sum of the retractions induced by the mutants lacking the

Table 1. *P. aeruginosa* strains used in this work.

Strains	Description	Refs
PAO1	Wild-type PAO1	ATCC 15692
PAO1Δ <i>xcpR</i>	Deletion of the ATPase gene of Xcp secretion system (T2SS)	This study
PAO1Δ <i>lasB</i>	Deletion of elastase (LasB) gene	[40]
PAO1F (RP1831)	Subclone of PAO1	[41]
PAO1FΔ <i>pseD</i> (RP1871)	Deletion of inner membrane component of T3SS	[41]
PAO1FΔ3 <i>Tox</i> (RP1949)	Deletion of <i>exoS</i> , <i>exoT</i> , <i>exoY</i> genes	[41]
CHA	Cystic fibrosis clinical isolate	[21]
CHAΔ <i>xcpR</i>	Deletion of the ATPase gene of Xcp secretion system (T2SS)	This study
CHAΔ <i>pseF</i>	Absence of the needle protein PscF	[42]

doi:10.1371/journal.ppat.1003939.t001

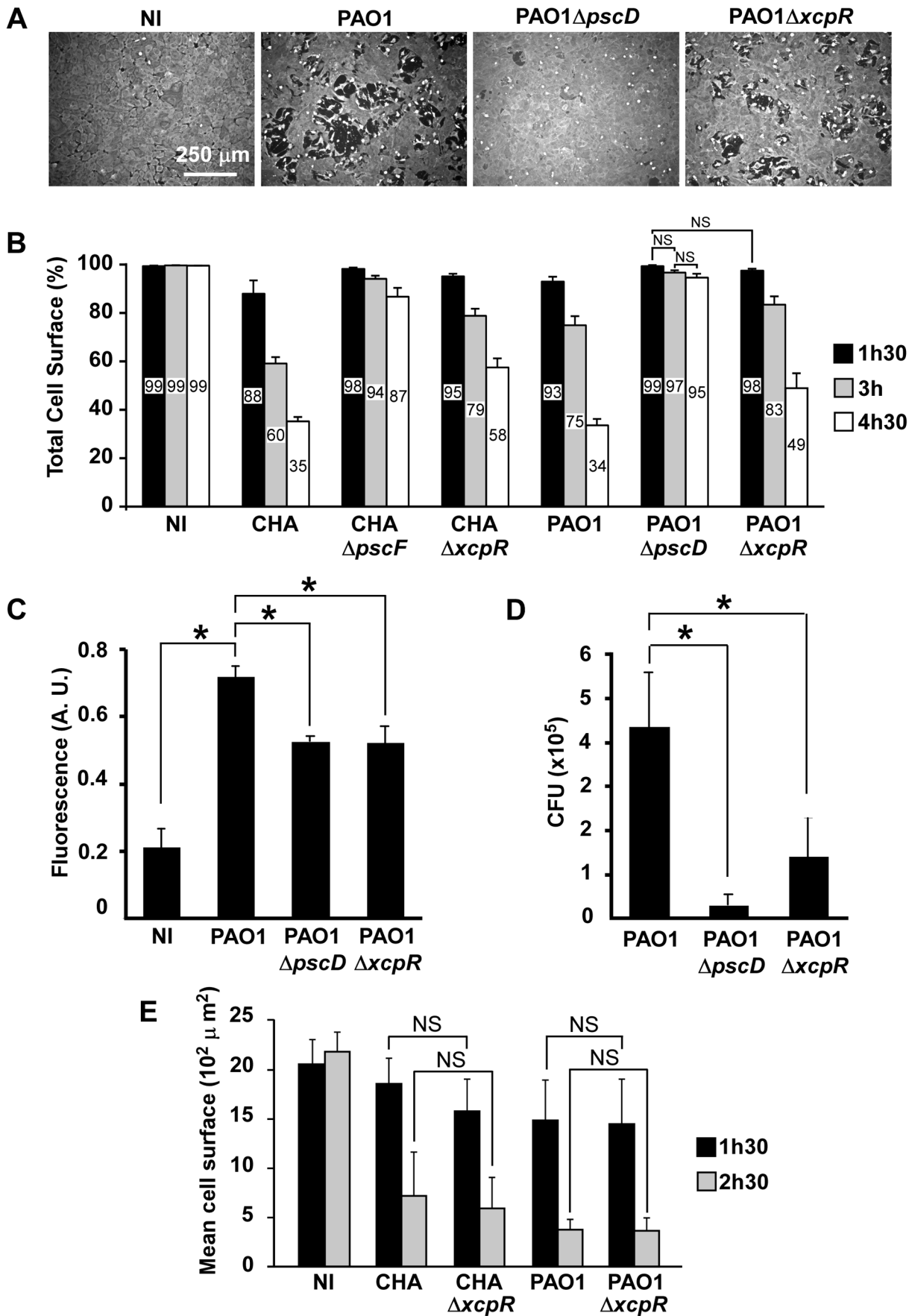


Figure 1. T3SS-induced cell retraction is influenced by T2SS. (A) Confluent HUVECs were treated for 3 h with PAO1, PAO1 Δ *pscD* or PAO1 Δ *xcpR* at MOI=10. Control was non-infected cells (NI). Cells were fixed, actin labeled to stain the entire cell body and observed at low magnification. Images show major area of cell retraction when infected with PAO1, whereas only little retraction was observed with PAO1 Δ *xcpR* and minimal retraction with PAO1 Δ *pscD*. (B) Analogous experiment with strains CHA, CHA Δ *pscF*, CHA Δ *xcpR*, PAO1, PAO1 Δ *pscD* and PAO1 Δ *xcpR*. Cells were fixed at 1.5 h, 3 h and 4.5 h p.i.. For each image, the surface percentage occupied by cells in the field was measured by ImageJ software and presented as the mean percentage+SD (n = 10). The exact mean percentage is also indicated in the bars. Statistical analysis was performed using 2-way ANOVA for CHA and PAO1 data independently: p<0.001 for differences between wild-type/mutants and between times. Holm-Sidak's pairwise post-hoc test indicates that differences between wild-type/mutants at a given time, and between times for a given strain, are all significant, unless indicated (NS). (C) Confluent HUVECs cultured on porous membranes were infected at MOI of 10 with either PAO1, PAO1 Δ *xcpR* or PAO1 Δ *pscD*. Controls were uninfected cells (NI). Albumin-TRITC was simultaneously loaded in the upper compartments and TRITC fluorescence was measured at 7 hours p.i. Data are presented as mean fluorescent units (n = 3)+SD. Statistical differences were established with 1-way ANOVA (p<0.001), followed by Dunnett's test: all differences were significant when compared to PAO1 (*). (D) In the same experiment, bacterial transmigration was evaluated by CFU counts in the lower compartment at 7 hours p.i.. Data are presented as mean total CFU (n = 3)+SEM. Statistical differences were established as in (C): 1-way ANOVA: p = 0.019. (E) Cell retraction test on sparse HUVECs infected by bacterial strains. Data represent the total cell surface divided by the cell number in the field. Data are the mean percentage (n = 10)+SD. Statistical analysis: 2-way ANOVA for CHA and PAO1 independently (p<0.001, for differences between times and between wild-type/mutants). Holm-Sidak's pairwise post-hoc test indicates that differences between wild-type/mutants at a given time is not significant (NS).
doi:10.1371/journal.ppat.1003939.g001

T2SS and the T3SS at all times p.i. for the two strains, which is consistent with a synergistic rather than additive effect of the two secretion systems.

To further establish the effect of the T2SS on cell retraction, we analyzed endothelial cell monolayer integrity during infection in a permeability assay using Transwell plates and albumin-TRITC as a tracer (Fig. 1C). Bacteria lacking either the T2SS or the T3SS induced smaller increases in tracer translocation than the wild-type strain bacteria. In the same experiments, bacterial transmigration across the monolayer was investigated by counting colony forming units (CFU) in the lower compartment of the Transwell plate (Fig. 1D). Again, bacteria lacking either the T2SS or the T3SS transmigrated less than the wild-type, although this difference was only significant for the strain devoid of its T3SS because of data dispersion. Taken together, these results indicate that the T2SS contributes to the cell retraction phenomenon and may be a helper in T3SS action and toxicity. Interestingly, the monolayer permeability assay was more sensitive to the effect of the T2SS than the cell retraction assay, suggesting that a small retraction is sufficient to disrupt the endothelial barrier for small tracers or even bacteria.

From the above data we hypothesized that T2SS effectors facilitate the action of the T3SS by provoking a disruption of the intercellular junctions, thus enabling the bacteria to access the basolateral domain of the endothelial cells. Indeed, several reports indicate that *P. aeruginosa* interacts preferentially with basolateral rather than apical domains of target cells [15]. We reasoned that this “priming” by the T2SS should not be effective if cells are sparse at the beginning of infection. Indeed, as shown in Fig. 1E, *P. aeruginosa* action was much faster in these conditions than on confluent cells and there were no significant differences between the cell retraction extents induced by the wild-type or the T2SS-inactive strains at all times p.i. for CHA and PAO1. These features are consistent with a facilitation role of the T2SS, hence promoting the action of the T3SS.

Endothelial cell-cell junction disruption by *P. aeruginosa*'s secretomes

To further characterize the role of T2SS effectors on HUVECs, we incubated cells with PAO1 or CHA secretomes collected in the early stationary growth phase ($A_{600} = 1.5$) in order to obtain high T2 secretion and low cell lysis. Secretomes tested by zymography yielded expected results in wild-type strains: bands of the main T2S effectors, LasA and LasB, and of AprA, a T1S protease (Fig. S1B) (see [16] for similar zymograms). As anticipated, LasA and LasB activities were minimal in Δ *xcpR* strains (the very faint bands

observed for LasA/B in Δ *xcpR* mutants are probably caused by enzyme release from lytic cells). When HUVECs were exposed for 1.5 h to secretomes from wild-type strains we observed a significant cell retraction compared to untreated cells, while this phenomenon was minimal in the presence of secretomes from Δ *xcpR* strains (Fig. 2A). This result was confirmed by data from a permeability assay using albumin-TRITC (Fig. 2B). Thus, T2SS effectors are capable of affecting cell morphology independently of the T3SS.

We then addressed the action of secretomes on two important cell morphology components: cell-cell junctions and the actin cytoskeleton. Cells were observed post-incubation with secretomes, after labeling for VE-cadherin, an adhesive protein located at endothelial adherens junctions, and for filamentous (F)-actin (Fig. 2C for PAO1 and Fig. S2A for CHA). Contrary to the known ExoS/ExoT action, the actin cytoskeleton was not disrupted by PAO1 secretomes. However, there were fewer actin fibers and the onset of condensed actin foci at cell cortex, which is consistent with cell retraction. Secretomes from PAO1 or CHA induced gap formation between cells together with loss or attenuation of VE-cadherin labeling at cell edges. In contrast, cell-cell junctions were maintained when these cells were incubated with secretomes from Δ *xcpR* strains. The length of VE-cadherin lining along cell edges was measured and it was indeed lower in the wild-types compared to the T2SS-inactive strains (Fig. 2D and Fig. S2B), further demonstrating that the T2SS effectors decreased VE-cadherin localization at cell edges. Interestingly, *P. aeruginosa* secretomes similarly interfered with ZO-1 labeling, a component of tight junctions (Fig. S3), suggesting that both adherens (VE-cadherin) and tight (ZO-1) junctions are disrupted by T2SS effectors.

LasB protease is required for VE-cadherin degradation

As VE-cadherin is a major determinant of cell-cell junction integrity [17], we examined thereafter the action of bacterial infection on VE-cadherin using various antibodies (Fig. 3A). We first examined VE-cadherin levels in infected HUVECs (Fig. 3B). The data showed decreases in amounts of VE-cadherin in cells when they were infected with PAO1, hence indicating that VE-cadherin is a target of *P. aeruginosa*. Analogous experiments with strains lacking the three T3 toxins (Δ 3T) or the T3 apparatus (Δ *pscD*) similarly resulted in decreased VE-cadherin levels, thus indicating that this phenomena is independent of the T3SS. To determine whether VE-cadherin was degraded by *P. aeruginosa*-released proteases, HUVECs were incubated with secretomes from wild-type and Δ *xcpR* mutants of PAO1 or CHA strains. Incubation of HUVECs with secretomes from wild-type strains

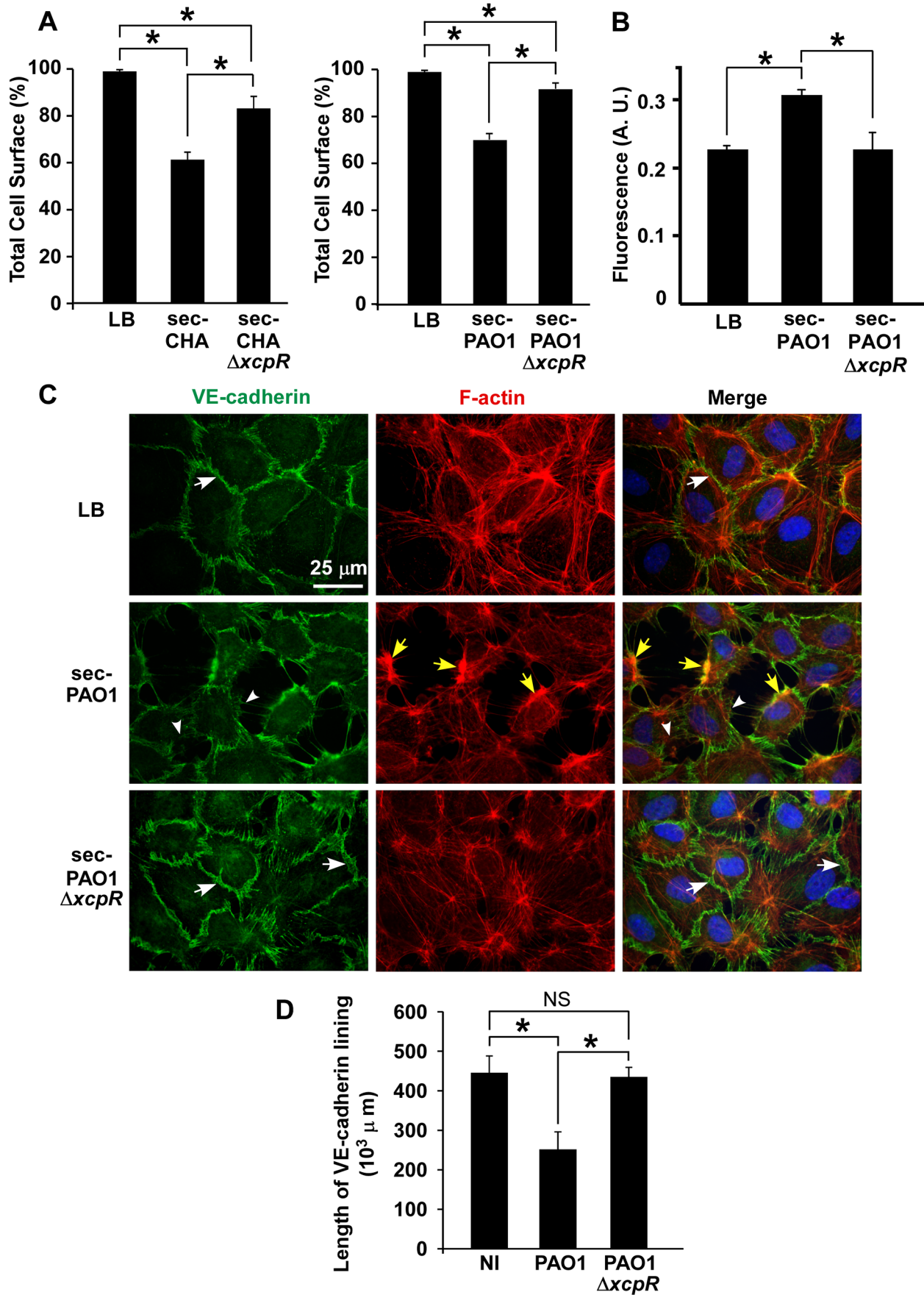


Figure 2. *P. aeruginosa* type 2 effectors provoke gap formation in endothelial cell monolayer. (A) Retraction assay with cells incubated for 1.5 h with 10% volume of secretomes (sec) of CHA (left) and PAO1 (right) strains, in the culture medium. Cell surface was calculated as in Fig. 1A and data represent the mean percentage of cell surface in the field (n = 10)+SD. Statistics: Kruskal-Wallis' test, p<0.001 for each data set; Bonferroni's pairwise post-hoc test showed significant differences in all conditions (*). (B) Monolayer permeability assay with secretomes (10% v/v). LB was used as control. Data are presented as mean fluorescent units (n = 3)+SD. Statistics: 1-way ANOVA, p<0.001; Dunnett's post-hoc test showed significant differences when compared to sec-PAO1 (*). (C) Confluent HUVECs were treated with 10% volume of PAO1 or PAO1Δ*xcpR* secretomes (sec) or LB in the cell culture medium. Cells were fixed 2 h later and labeled for VE-cadherin (green) and F-actin (red). In the merged images, nuclei are also shown in blue. The actin cytoskeleton is present in all 3 conditions. There is however fewer stress fibers and the onset of condensed cortical actin foci (yellow arrows) in retracted cells (sec-PAO1). VE-cadherin antibody decorates cell-cell junctions in LB or in sec-PAO1Δ*xcpR* conditions (arrows), while labeling is attenuated or absent in presence of sec-PAO1 (arrowheads). This alteration parallels gap formation between cells. A similar experiment was performed with CHA secretomes with identical results (Fig. S2). (D) Length of VE-cadherin lining at cell edges was quantified as described in Materials and Methods. Data represent the mean (n = 10)+SD of VE-cadherin lining length. Statistics: 1-way-ANOVA, p<0.001; Bonferroni's pairwise post-hoc test showed significant differences when compared to PAO1 (*), but not between NI and PAO1Δ*xcpR* (NS). doi:10.1371/journal.ppat.1003939.g002

showed the emergence of a band at 85 kDa, as detected by the VE-cadherin antibody directed to the C-terminus (intracellular) part of the protein. This paralleled decreases in the amount of full length protein at 125 kDa (Fig. 3C,D). The 85-kDa band was absent when cells were treated with secretomes from Δ*xcpR* strains or with LB. These results strongly suggest that VE-cadherin is degraded by one or more T2 proteases. Interestingly, intensity of a second faint band at 30 kDa slightly increased with time (Fig. 3C,D). This band may represent a secondary or subsequent cleavage product of *P. aeruginosa* proteases.

To identify the protease(s) involved in VE-cadherin processing, an analogous experiment was performed in the presence of protease inhibitors targeting either (i) metalloproteases (GM6001), (ii) ADAM proteases expressed by endothelial cells that were previously shown to cleave VE-cadherin [18] (GW280264X) or (iii) serine- and cysteine-proteases (Complete cocktail from Roche). The only inhibitor that prevented VE-cadherin cleavage was GM6001 (Fig. 4A), indicating that metalloproteases are solely involved in VE-cadherin processing, and suggesting that *P. aeruginosa* does not operate through activation of endothelial ADAMs.

LasB is a major metalloprotease secreted by *P. aeruginosa*'s T2SS and thus represents a good candidate for induction of VE-cadherin proteolysis [10]. We thus tested a secretome from a PAO1 mutant lacking LasB in a VE-cadherin degradation assay. This secretome lacked both LasB and LasA activity (Fig. S1B), thus confirming that LasB is necessary to activate LasA [19]. The secretome from the PAO1Δ*lasB* strain was unable to degrade VE-cadherin and produce the 85-kDa band (Fig. 4B). We also tested the direct action of the PAO1Δ*lasB* strain on cellular VE-cadherin (Fig. 4C). The VE-cadherin signal after PAO1Δ*lasB* infection was higher than after PAO1 or PAO1Δ*3Tox* infection and comparable to the uninfected condition. Taken together, we conclude that LasB and/or LasA, are required for VE-cadherin degradation.

LasB specifically cleaves the VE-cadherin extracellular domain

To confirm that VE-cadherin is a substrate of *P. aeruginosa* secretomes, we produced and purified the glycosylated extracellular domain of VE-cadherin in eukaryotic cells (Fig. S4). This domain was indeed cleaved by wild-type *P. aeruginosa*'s secretomes in a time-dependent manner (Fig. 5). In contrast, only minimal degradation was observed with PAO1Δ*xcpR* and PAO1Δ*lasB* secretomes at a late incubation time (7 h post treatment). Moreover, purified VE-cadherin was unaffected by overnight incubation with LB. The size of the major degraded band (50 kDa) of the VE-cadherin extracellular domain (90 kDa) is consistent with the degraded band size (85 kDa) of the full length protein (125 kDa). In conclusion, T2 effectors, and more specifically LasB,

have a direct proteolytic effect on VE-cadherin that is independent of endothelial cell machinery.

We then aimed to determine whether VE-cadherin was directly cleaved by in vitro-purified LasB or by another protease that could be activated by LasB. We thus incubated HUVECs with purified LasB (Fig. S5) and observed a time-dependent increase of the 85 kDa band (Fig. 6A). Like secretomes, purified LasB also promoted gap formation between cells (Fig. 6B,C). Importantly, LasB cleaved purified VE-cadherin and yielded a degraded band at 50 kDa (Fig. 6D). Altogether, our data show that LasB is the protease responsible for direct VE-cadherin cleavage and suggest that this protease causes cell-cell junction disruption in HUVECs.

To further characterize the LasB proteolytic mechanism acting on VE-cadherin, N-terminal sequencing was performed on the 50-kDa fragment. Data showed that LasB cleaves VE-cadherin at two close positions, before amino-acids 335 and 349, in the middle of extracellular cadherin domain 3 (Fig. 7). Therefore, the cleaved protein still linked to endothelial cells by its transmembrane domain lacks the adhesive domain located in cadherin domain 1.

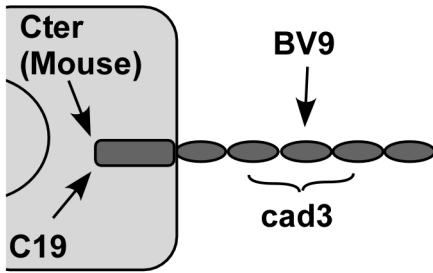
VE-cadherin is specific to endothelial cells and we wondered if T2SS proteases would act similarly on epithelial (E)-cadherin to disrupt epithelial barriers. Contrary to its effect on VE-cadherin, *P. aeruginosa*'s secretome did not degrade E-cadherin in epithelial A549 cells (Fig. 8). The effect of *P. aeruginosa*'s T2SS on cell-cell junction disruption is thus specific to endothelial cells.

VE-cadherin degradation in *P. aeruginosa*-induced pneumonia

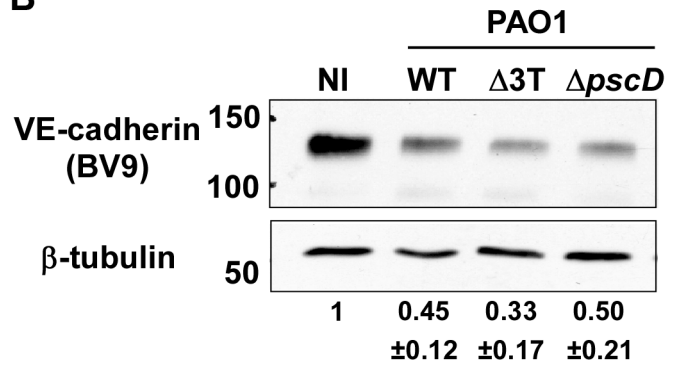
To study VE-cadherin stability during in vivo infection, we used a mouse model of acute pneumonia. To eliminate potential interference with neutrophil-released proteases known to cleave VE-cadherin [20], neutropenia was induced by injection of cyclophosphamide (100 mg/Kg IP) for 4 days prior to infection. Effectiveness of neutropenic treatment was verified on blood smears and on histological sections of infected lungs (data not shown).

A suspension of either PAO1, PAO1Δ*xcpR* or PAO1Δ*lasB* was instilled in mouse airways, and lungs were resected 16 h later. VE-cadherin levels were strikingly lower in wild-type-infected lungs compared to mock-infected lungs (Fig. 9A,B). Moreover, infection with PAO1Δ*xcpR* or PAO1Δ*lasB* induced a significantly smaller decrease in VE-cadherin levels, indicating that the *P. aeruginosa*'s T2SS, and more specifically LasB, promoted VE-cadherin degradation in vivo. This result was similar to what was observed in HUVECs. However, no degradation band was detected (not shown), suggesting that proteolytic mechanisms might be different in mice and humans. Alternatively it is possible that in vivo cleavage by T2SS effectors is rapidly followed by other proteolytic events acting on T2SS-induced degradation products.

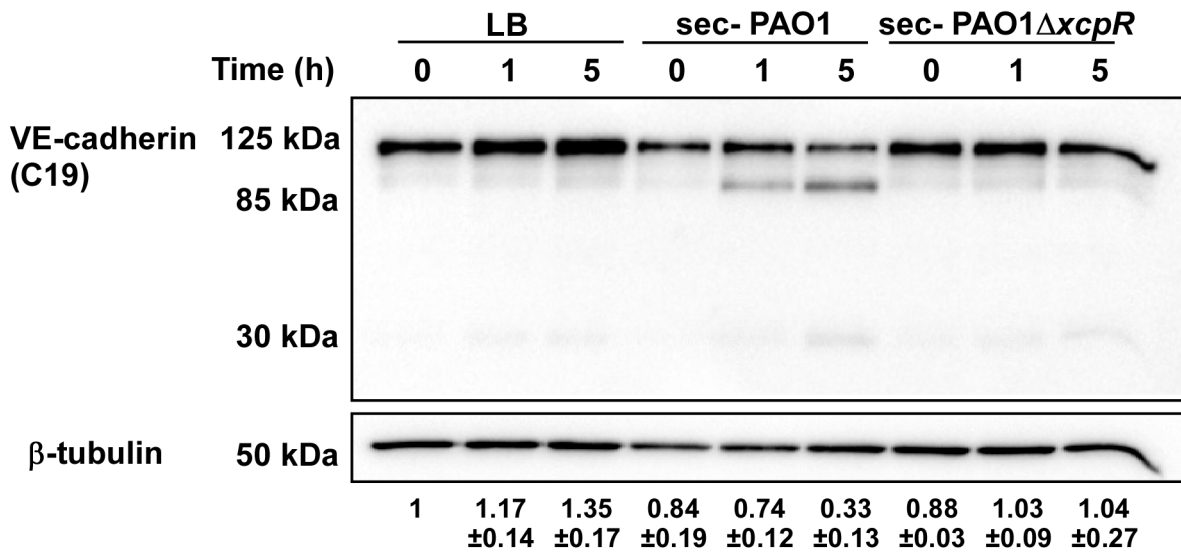
A



B



C



D

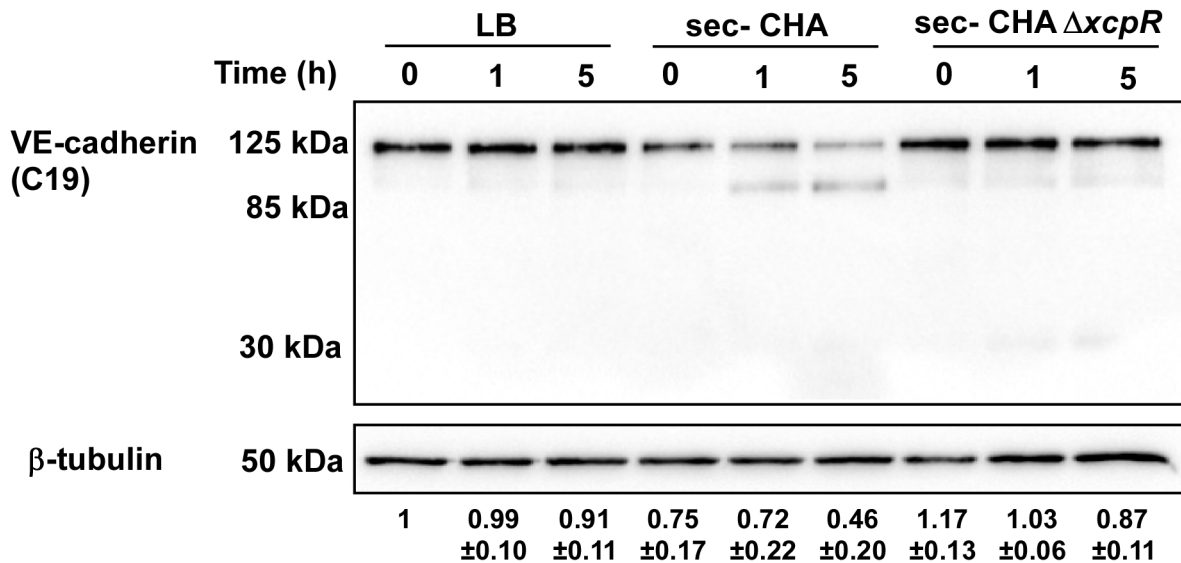


Figure 3. Induction of VE-cadherin proteolytic cleavage by *P. aeruginosa* T2SS. (A) Diagram showing the epitopes recognised by the various VE-cadherin antibodies used in this study. (B) Confluent HUVECs were infected for 4.5 h with PAO1 (WT), PAO1 Δ 3*Tox* (Δ 3T), or PAO1 Δ p*scD* (Δ p*scD*) at MOI = 10. Control was non-infected (NI) cells. Protein extracts were analyzed by Western blotting with VE-cadherin (BV9) and β -tubulin antibodies. Data show a decrease in VE-cadherin levels, occurring in infected cells even in absence of the T3 effectors. (C, D) HUVECs were incubated with secretomes from PAO1, PAO1 Δ x*cpR*, CHA, CHA Δ x*cpR* or LB. Protein extracts were prepared at different time points as indicated and analyzed by Western blot with anti-VE-cadherin C-terminus (C19) and β -tubulin (β -tub) antibodies. The full-length VE-cadherin band (125 kDa) decreased with time when incubated with wild-type strain secretomes. This was correlated with the appearance of a band at 85 kDa, as well as a faint band at 30 kDa. VE-cadherin cleavage did not occur with Δ x*cpR* strain secretomes or LB. (B–D) The averaged signal ratios ($n=3$) \pm SD of VE-cadherin (125 kDa) over β -tubulin are indicated below each lane.
doi:10.1371/journal.ppat.1003939.g003

We then reasoned that if *P. aeruginosa*'s T2SS promoted VE-cadherin cleavage in such a dramatic manner, it should probably induce endothelial cell-cell junction disruption and thus have an impact on bacterial dissemination throughout the body. Therefore, we compared *P. aeruginosa* colony forming units (CFU) in blood and spleen 16 hours post-infection (Fig. 9C,D). In both locations, we found less CFU when mice were infected with PAO1 Δ x*cpR* or PAO1 Δ l*asB* compared to the wild-type strain, although this difference was not statistically significant in the blood for PAO1 Δ x*cpR*.

In conclusion, *P. aeruginosa*'s T2SS influenced bacterial dissemination in the mouse via a mechanism that may involve VE-cadherin degradation by T2SS proteases, thereby affecting endothelium barrier properties.

Discussion

Rupture of the endothelial barrier by *P. aeruginosa* requires the joint action of several virulence factors [8]. Here we show that a T2SS effector, the protease LasB, might be one of the primary weapons in this arsenal required for disruption of endothelium integrity.

We found that T2SS-competent bacteria induced faster cell retraction than bacteria lacking a T2SS. Dislocation of the actin cytoskeleton and subsequent cell retraction are known to be T3SS-mediated. We thus wondered how secreted toxins (T2 effectors) could cooperate with internal exotoxins (T3 effectors) to promote cytoskeleton collapse. As *P. aeruginosa*'s secretomes could induce gap formation between cells, but not cytoskeleton disruption, we hypothesized that secreted toxins could directly act on adhesive proteins located at cell-cell junctions. Indeed, we showed that LasB protease cleaves VE-cadherin, a major adhesive protein of interendothelial junctions. This was demonstrated by the use of a LasB deletion mutant and confirmed by purified LasB. Importantly, most of these experiments were performed with two strains of different origins: one (PAO1, ATCC 15692) isolated from a wound and the other (CHA) from the lungs of a cystic fibrosis-patient [21]. Their actions on VE-cadherin were comparable, thereby suggesting that this is a common feature among *P. aeruginosa* subtypes.

VE-cadherin is required to maintain cell interaction in the mature endothelium, as demonstrated by numerous *in vitro* and *in vivo* experiments, including low-calcium switch (VE-cadherin adhesive activity is calcium-dependent) and the addition/administration of VE-cadherin adhesion-blocking antibodies to cells or mice [22–24]. The rupture of cell-cell junctions by LasB-induced VE-cadherin cleavage is consistent with these data.

Interestingly, VE-cadherin cleavage disrupted endothelial adherens junctions but also induced little but significant cell retraction with minor modifications to the actin cytoskeleton architecture (Fig. 1A,B and 2C). The T2SS-dependent disruption of monolayer integrity was confirmed by analysis of albumin-TRITC diffusion and bacterial transmigration across the monolayer (Fig. 1C,D and 2B). The intercellular junctions are subjected to two opposite forces:

one centrifugal mediated by homophilic adhesive proteins and the other centripetal resulting from acto-myosin contraction [25]. Thus, rupture of intercellular junctions may induce acto-myosin-dependent retraction without any further action from the bacteria.

Our findings with the acute pneumonia model indicate that mouse VE-cadherin is also proteolysed in infected lungs by a LasB-dependent mechanism (Fig. 9A,B). Bacteria lacking a functional T2SS or LasB are less prone to dissemination (Fig. 9C,D); it is therefore likely that LasB-dependent VE-cadherin cleavage participates in bacteria dissemination. Mechanisms of mouse VE-cadherin degradation deserve further investigation. In particular, it will be of interest to know in which vessel type LasB acts on VE-cadherin and how this phenomenon correlates with increased vascular permeability.

As far as we know, this is the first time that a *P. aeruginosa* T2SS mutant has been assayed for dissemination in a mouse pneumonia model. However, it was previously reported that co-injection of LasB with a non-lethal inocula of strain PA103 in mouse muscles induced mortality and increased dissemination in the liver [26], suggesting that LasB contributes to the invasiveness of the organism. Conversely, LasB did not play any role in a burn infection mouse model [27].

The tight junction protein ZO-1 also vanished from cell-cell junctions in a T2SS-dependent manner. Tight junctions are known to be dismantled once VE-cadherin-dependent adherens junctions are cleared [28]. It is thus likely that tight junction disruption is subsequent to VE-cadherin proteolysis. However, one cannot exclude that tight junction adhesive proteins be also cleaved or downregulated by T2 effectors. Indeed, LasB was shown to increase monolayer permeability and to induce depletion of ZO-1 and ZO-2, both required for tight junction assembly, in MDCK epithelial cells [29].

VE-cadherin loss by LasB-mediated cleavage may be exacerbated by the release by the T2SS of exotoxin A, an ADP-ribosyl transferase that inhibits protein synthesis by targeting elongation factor-2 [10]. Hence, exotoxin A may prevent VE-cadherin resynthesis and thus preclude reconstruction of the junctions.

Integrity of the main barriers in mammalian bodies is dependent upon E-cadherin in epithelia and VE-cadherin in endothelia. Here we show that LasB-dependent cadherin cleavage is specific to VE-cadherin; E-cadherin was resistant to LasB, thus indicating that *P. aeruginosa*-induced epithelial barrier breakdown does not proceed by an analogous mechanism. Recently, it has been reported that a quorum sensing molecule, 30-C₁₂-HSL, can disrupt epithelial barrier integrity, in addition to its role in virulence factor regulation in bacteria [30]. 30-C₁₂-HSL increased phosphorylation of major components of tight and adherens junctions, a process known to augment paracellular permeability [31]. Bacterial secretion of this molecule may thus provide a supplementary mechanism for junction opening.

LasB is known to proteolyse several extracellular proteins including elastin, fibronectin, vitronectin, surfactant proteins and serum complement components [10,11,32–36]. Extracellular matrix protein degradation by LasB was shown to induce anoikis of

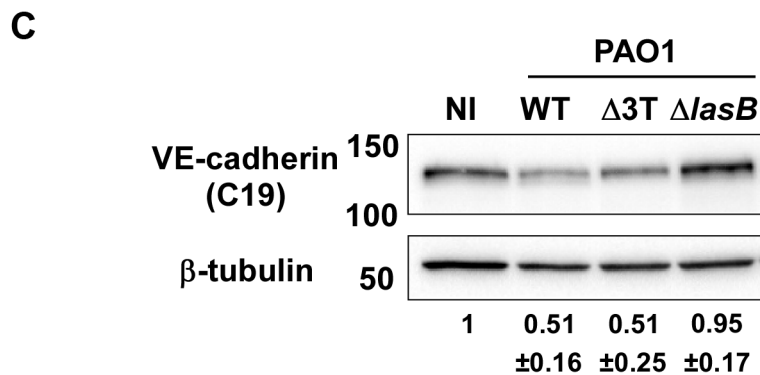
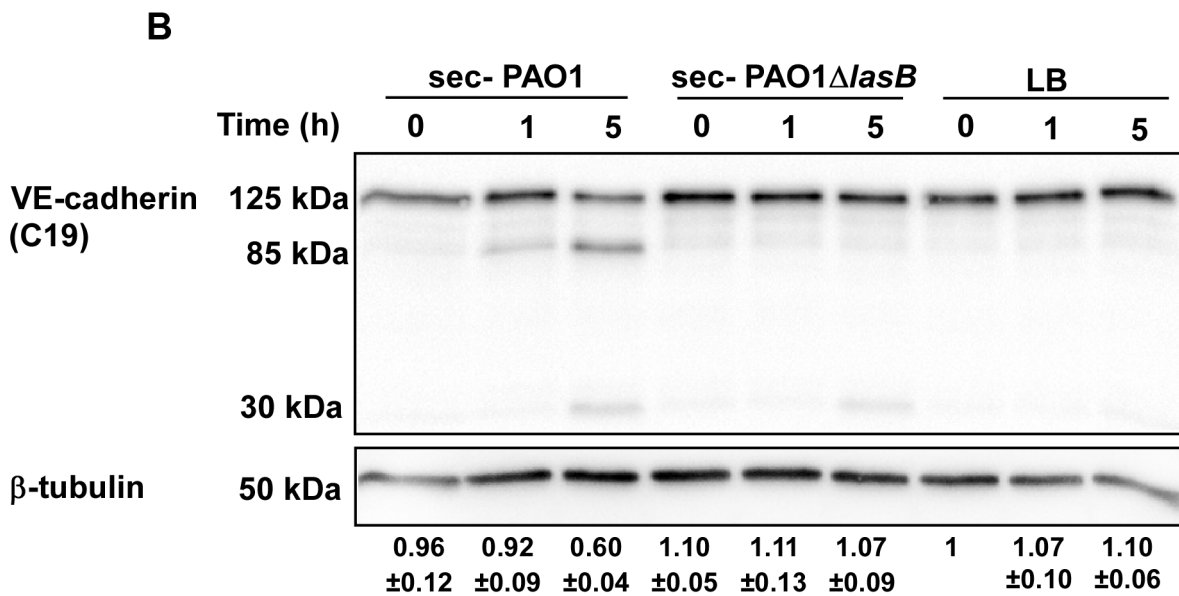
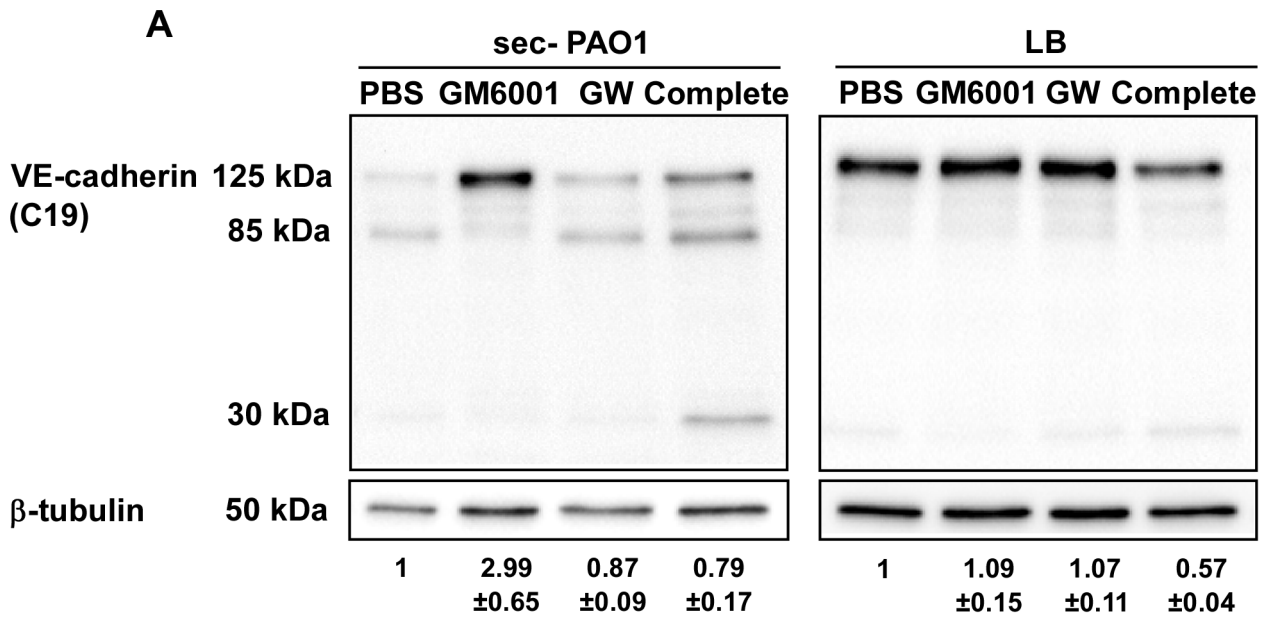


Figure 4. LasB protease is required for VE-cadherin cleavage. (A) PAO1 secretome action on VE-cadherin was tested at 5 hours post-treatment in presence of protease inhibitors: GM6001 for metalloproteases, GW280264X (GW) for ADAMs and the Complete cocktail for serine- and cysteine-proteases. LB was used as control. Conditions are as in Fig. 3. Western blots show that GM6001 was solely capable to prevent VE-cadherin degradation. (B) HUVECs were treated for indicated times with secretomes from PAO1 and PAO1 Δ lasB strains. Western blot analysis shows that the PAO1 Δ lasB secretome did not proteolyse VE-cadherin unlike the PAO1 secretome. (C) The direct action of bacterial strains on VE-cadherin was tested at 4 h.p.i. by Western blot as above. The PAO1 Δ lasB strain induced no degradation compared to the wild type or the Δ 3Tox strains. (A–C) The averaged signal ratios ($n=3$) \pm SD of VE-cadherin (125 kDa) over β -tubulin are indicated below each lane. doi:10.1371/journal.ppat.1003939.g004

aortic valve myofibroblasts [36]. In contrast, LasB was shown to cleave a limited number of surface receptors: proteinase activated receptor-2 in respiratory epithelial cells and urokinase plasminogen activator receptor in monocytic and respiratory epithelial cells [37,38]. Conversely, integrins are resistant to LasB proteolysis [36]. Altogether, these data indicate that LasB is not a multisubstrate proteolytic enzyme for cellular proteins, but instead targets specific receptors. Limitation of action of bacterial virulence factors as opposed to killing bacteria is now recognized as a promising antimicrobial strategy. Inhibition of LasB activity using a peptide based on the LasB cleavage site in the VE-cadherin sequence may thus be of clinical interest to abate bacterial propagation.

We noticed that HUVEC intoxication either by CHA or PAO1 was more delayed in confluent cells than in sparse cells (Fig. 1B,E), indicating that cells in a reconstituted endothelium have more resistance to *P. aeruginosa* infection than sparse cells. The retraction effect of the T2SS and the T3SS were not simply additive, but synergistic (Fig. 1B), suggesting a real cooperation between the two systems. Furthermore, cell retraction was not synchronized in the confluent monolayer, but began and propagated from specific points (Fig. S6). This occurred even with high amounts of bacteria (MOI of 10 or above) and thus with the capacity to infect all cells

simultaneously. Recently, Kierbel *et al.* [15] showed that the apical domain of epithelial cells was not a favorable bacteria landing surface compared to the basolateral domain. A similar phenomenon may occur with endothelial cells, as suggested by the unsynchronized infection process. Following this hypothesis, LasB-dependent junction breaches may allow bacteria access to the basolateral domain at specific points. We thus propose a 2-step model of endothelial infection, in which (i) LasB is secreted in the vicinity of cell-cell junctions leading to gap formation and (ii) the bacteria gain access to the cell basolateral domain at interrupted junctions, thus allowing host-pathogen interaction and T3SS-dependent intoxication (Fig. 10). In this context, T2SS-dependent junction opening may be a limiting step of endothelial infection and vascular barrier breakdown. In fact, the roles of *P. aeruginosa*'s T2SS and T3SS are usually studied separately and their secreted virulence factors are often considered to work independently even though these two secretion systems were shown to have a cumulative toxic effect in mouse models of infection [3]. Here, we provide a molecular mechanism that accounts for cooperation between these two types of virulence factors.

In conclusion, we identified a novel substrate for *P. aeruginosa*'s LasB protease and a mechanism of action that may be of major

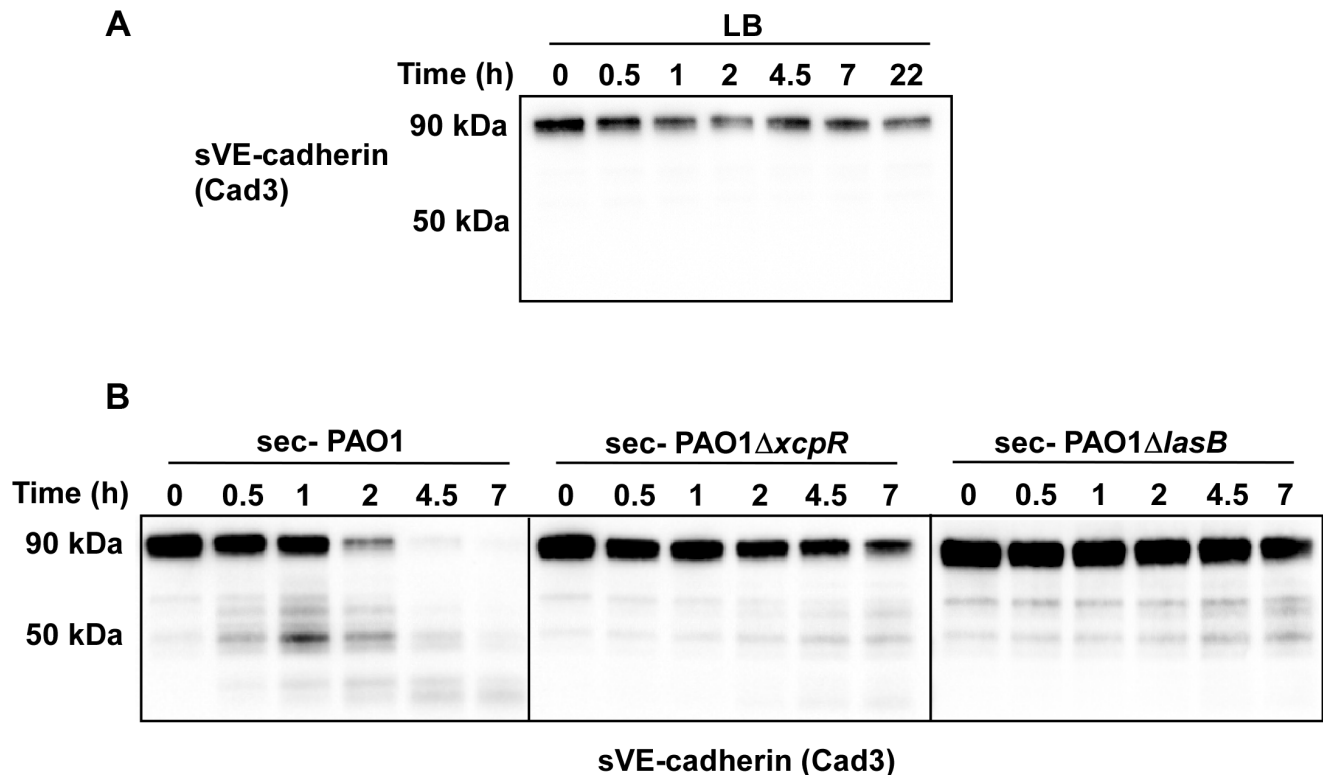


Figure 5. *P. aeruginosa*'s secretomes cleave VE-cadherin extracellular domain. Recombinant soluble VE-cadherin (sVE-cadherin) was incubated at 37°C in presence of LB (A), PAO1, PAO1 Δ xcpR or PAO1 Δ lasB (B) secretomes. VE-cadherin was analyzed by Western blot at different time points using Cad3 antibody directed against VE-cadherin extracellular domain. Data show a LasB-dependent VE-cadherin proteolysis. doi:10.1371/journal.ppat.1003939.g005

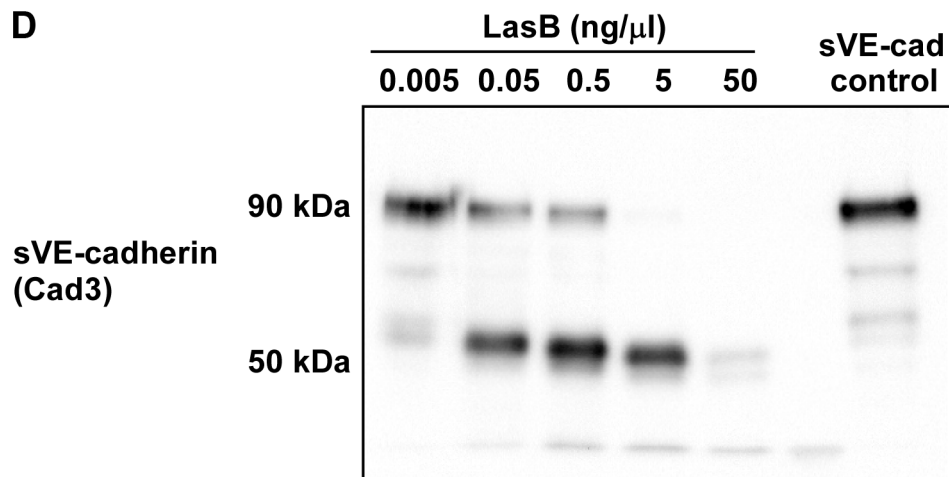
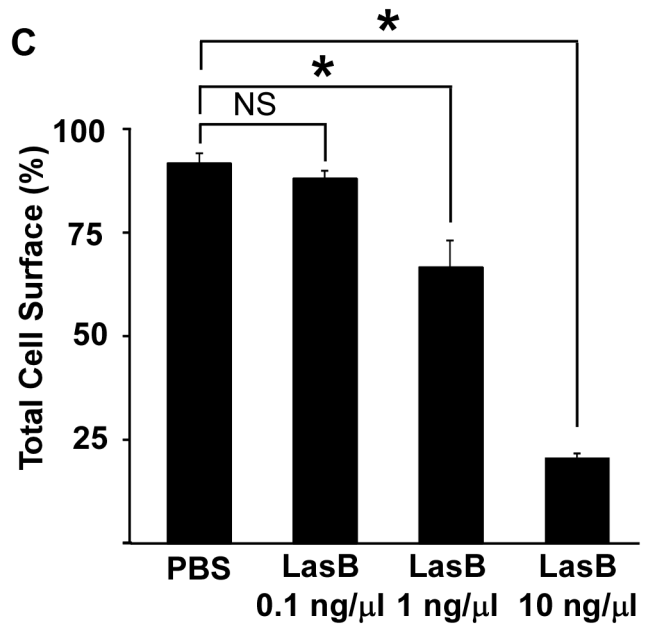
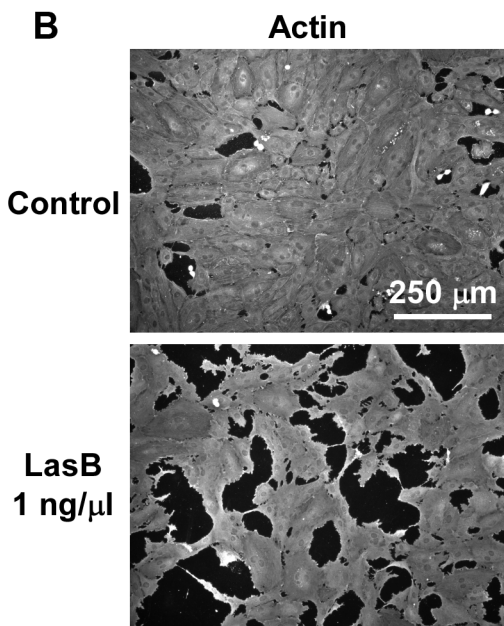
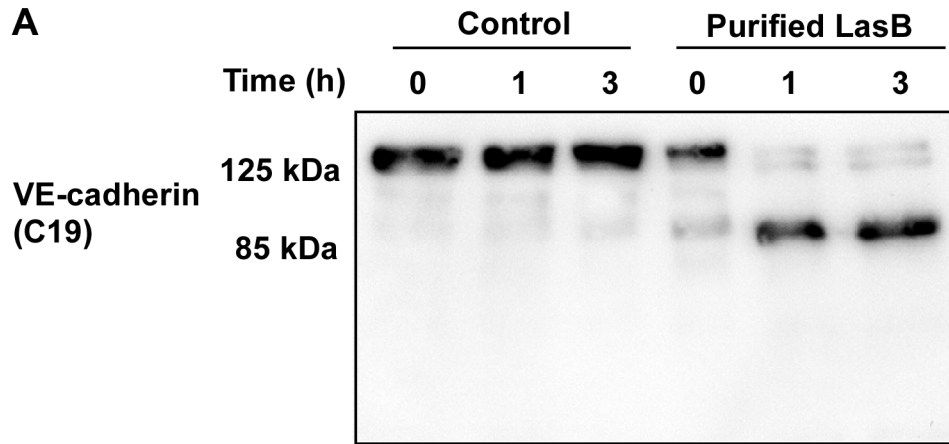


Figure 6. LasB cleaves cellular and soluble VE-cadherin. (A) LasB was added to HUVEC media at 1 ng/μL; protein extracts were prepared at indicated times and analyzed by Western blot with VE-cadherin antibody C19. LasB yielded a cleavage product of similar size (85 kDa) as secretomes. (B) Actin immunofluorescent images of confluent HUVECs treated with LasB (1 ng/μL in culture medium) or untreated (control). LasB induced cell retraction. (C) Quantification of cell spreading using increasing concentrations of LasB. Statistics: 1-way ANOVA: $p < 0.001$; Dunnett's post-hoc test showed significant differences with PBS (*). (D) Purified VE-cadherin extracellular domain (sVE-cadherin) was incubated with various concentrations of LasB and analyzed by Western blot using VE-cadherin antibody Cad3. VE-cadherin cleavage product by LasB is of identical size (50 kDa) as secretomes.
doi:10.1371/journal.ppat.1003939.g006

importance for bacterial dissemination and generation of septicemia. As VE-cadherin has a pivotal role in endothelial barrier integrity, its degradation during the infection process probably leads to dramatic endothelial dysfunction, comparable to that reported after injection of VE-cadherin-blocking antibodies. Furthermore, it facilitates T3SS-dependent cell intoxication and thus significant endothelium damage. In this context, T2-dependent junction opening may be a limiting and critical step of endothelial infection and vascular barrier breakdown.

Materials and Methods

Ethics statement

All animal protocols in this study were conducted in strict accordance with the French guidelines for the care and use of laboratory animals (Charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale, January 20, 2009). The protocol for mouse infection was approved (project license number 12-051) by the animal research committee of the institute (CETEA).

Reagents

The Complete protease inhibitor cocktail was from Roche and the metalloprotease inhibitor GM6001 from Santa Cruz. The ADAM inhibitor GW280264X was a generous gift from Pr

Andreas Ludwig (Aachen, Germany). Antibodies against human VE-cadherin extracellular domain (Cad3 and BV9) were gifts from Danielle Gulino-Debrac (Grenoble, France) and Annunciata Vecchi (Milan, Italy), respectively. Antibody against human VE-cadherin C-terminal domain was purchased from Santa-Cruz (C-19) and that against the mouse C-terminal domain was produced against the peptide CSDPQEEELI. β-tubulin and β-actin antibodies were from Sigma and E-cadherin antibodies from Life Technologies. Phalloidin-TRITC was from Sigma-Aldrich. Peroxidase-conjugated antibodies were purchased from Biorad laboratories. The secondary antibodies coupled with Alexa 488 were purchased from Invitrogen. Purified *P. aeruginosa* LasB was purchased from Nagase ChemteX Corp. (Kyoto, Japan) and purity was evaluated by electrophoresis and Coomassie staining (Fig. S5).

Bacterial culture and strains

The non-polar chromosomal gene deletion of *xcpR* in *P. aeruginosa* strains PAO1 and CHA was obtained by double cross over events and pKNG101 suicide vector properties as previously described [39]. Briefly, 500-bp upstream and downstream regions of *xcpR* gene were PCR amplified, and tandemly cloned into pKNG101 vector. The resulting construct, pKN-Δ*R* was transferred by conjugation into wild type *P. aeruginosa* PAO1 and CHA strains in order to

A

	Amino-acid sequence	N-ter position
Fragment 1	F I V E A T D P	335
Fragment 2	M S P P A G N R	349

B

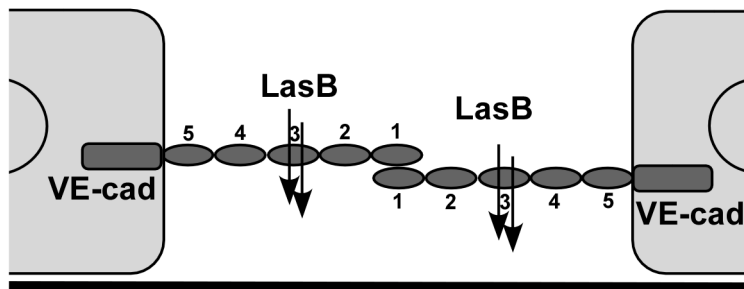


Figure 7. LasB cleavage sites in VE-cadherin extracellular domain. (A) Purified VE-cadherin extracellular domain was incubated with LasB as in Fig. 6 and the N-terminal sequences of protein present in the 50 kDa band were determined. Two sequences were obtained as indicated, both belonging to VE-cadherin sequence. N-terminal positions in VE-cadherin sequence are indicated. (B) Representation of LasB cleavage sites on 2 VE-cadherin molecules located on 2 adjacent endothelial cells. VE-cadherin extracellular domain is constituted by 5 cadherin domains numbered 1-5 from the N-terminus. VE-cadherin homotypic adhesion is promoted by domain 1. LasB cleaves at 2 close positions in the middle of domain 3, precluding endothelial homophilic adhesion.
doi:10.1371/journal.ppat.1003939.g007

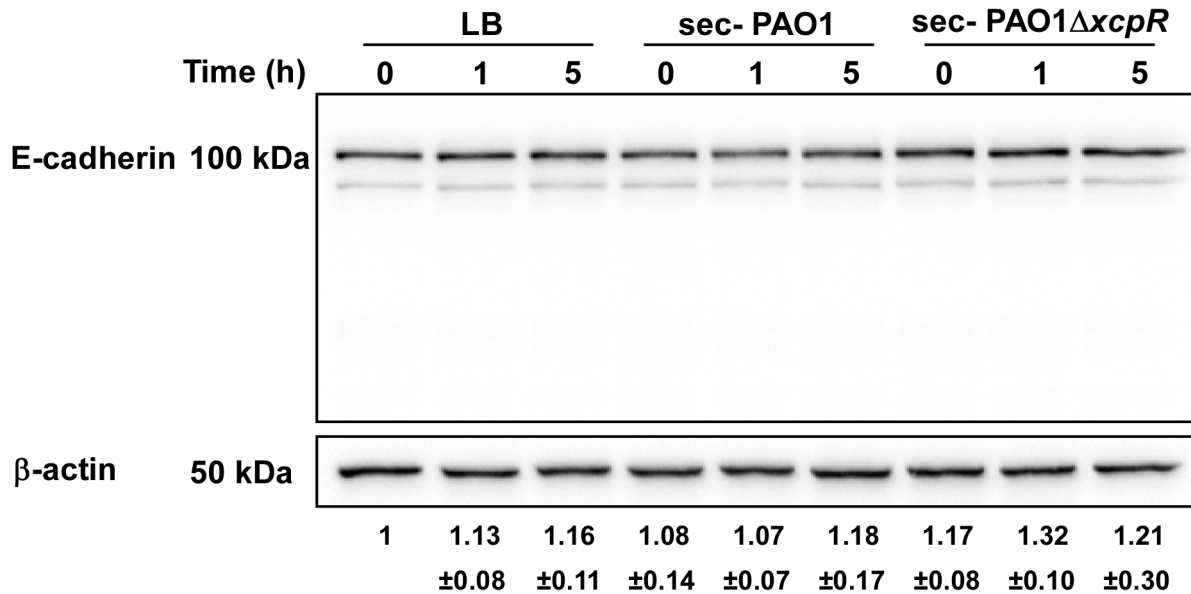


Figure 8. E-cadherin is resistant to LasB proteolysis. Epithelial A549 cells were treated with PAO1 or PAO1ΔxcpR secretomes (10% v/v in culture medium). LB was used as control. Proteins were extracted at different time points p.i., as indicated, and analyzed by Western blot with anti-E-cadherin and anti-β-actin antibodies. E-cadherin was stable and no degradation products were observed. The averaged signal ratios (n = 3) ± SD of E-cadherin (125 kDa) over β-tubulin are indicated below each lane. doi:10.1371/journal.ppat.1003939.g008

generate the *xcpR* mutants. The strain in which the chromosomal integration event occurred was selected on *Pseudomonas* isolation agar plates containing 2 mg of streptomycin per mL. Excision of the plasmid, resulting in the deletion of the chromosomal target gene, was performed after selection on LB plates containing 5% sucrose. Colonies that became sucrose resistant and streptomycin sensitive were confirmed to contain the gene deletion by PCR analysis. Deletion of *lasB* in PAO1 and *pscF* in CHA were described previously (see Table 1). PAO1F, PAO1Δ3Tox and PAO1ΔpscD were generous gifts from Arne Rietsch. *P. aeruginosa* was grown in liquid Luria Broth (LB) medium at 37°C with agitation or on *Pseudomonas* Isolation Agar plates (PIA; Difco). Incubation was performed at 37°C with agitation until the cultures reached *A*₆₀₀ values of 1.0 for bacterial infection or 1.5 for secretome production. Secretomes were aliquoted and stored at -80°C after centrifugation and filtration on 0.22 μm filters.

Zymography

Zymography was performed using standard procedures. Briefly, protein electrophoresis was performed in non-reducing SDS-PAGE containing 0.2% gelatin (calf skin type IV from Sigma-Aldrich). Gel was first incubated in 2.5% Triton-X100 for 1 h and then in 0.2 M Tris pH 7.8, 5 mM CaCl₂ for 18 h at 37°C. Presence of protein was revealed by Coomassie staining.

Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated according to previously described protocols [8]. HUVECs were cultured in Endothelial-Basal-Medium (EBM-2, Lonza) supplemented as recommended by the manufacturer. The epithelial lung carcinoma cell line A549 was grown in RPMI medium with 10% fetal calf serum. Serum was omitted in all infection experiments. In all experiments, cells were cultured for 3 days at confluency; conditions which are sufficient to induce mature adherens and tight junctions (hallmarks of polarized cells), i.e. continuous junctional labeling of VE-cadherin/E-cadherin and ZO-1, respectively.

Immunofluorescence staining and cell retraction assay

For VE-cadherin and F-actin stainings, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min and permeabilized by 0.5% triton X-100 for 5 min. Cells were then stained using standard procedure with appropriate primary and secondary antibodies or phalloidin-TRITC. Stained cells were observed with a Zeiss epifluorescence microscope (Axioplan).

For the cell retraction assay, cells were fixed in methanol at -20°C for 10 min and labeled for actin and with Hoechst for cell count. Images were captured with low magnification objective (16×) and treated with ImageJ software [8]. Briefly, images of actin staining were binarized and the total cell surface was calculated for each image (n = 10). For experiments with sparse cells, the total cell surface was divided by the cell number in the field. The total length of VE-cadherin lining along cell edges was measured with ImageJ software. Briefly, images of VE-cadherin labeling were binarized and skeletonized. The total length of the skeleton was then measured.

Western blots

Cells and tissues were lysed in Triton X-100 and protein concentration of the lysates was determined with a Micro-BCA kit (Pierce, Rockford, IL) using BSA as standard. Protein extracts were then separated by SDS-PAGE, transferred onto Hybond ECL membrane (Amersham Biosciences, Saclay, France) and revealed with the appropriate antibody using standard procedures. Signals were revealed with a ChemiDoc system (BioRad). Band intensities were quantified on non-saturated images using imageJ software.

Transendothelial albumin flux and bacterial transmigration

For albumin flux, measurement was done using established procedures. Briefly, HUVECs were seeded onto tissue culture inserts containing porous membranes (Greiner Thincert 0.4 μm).

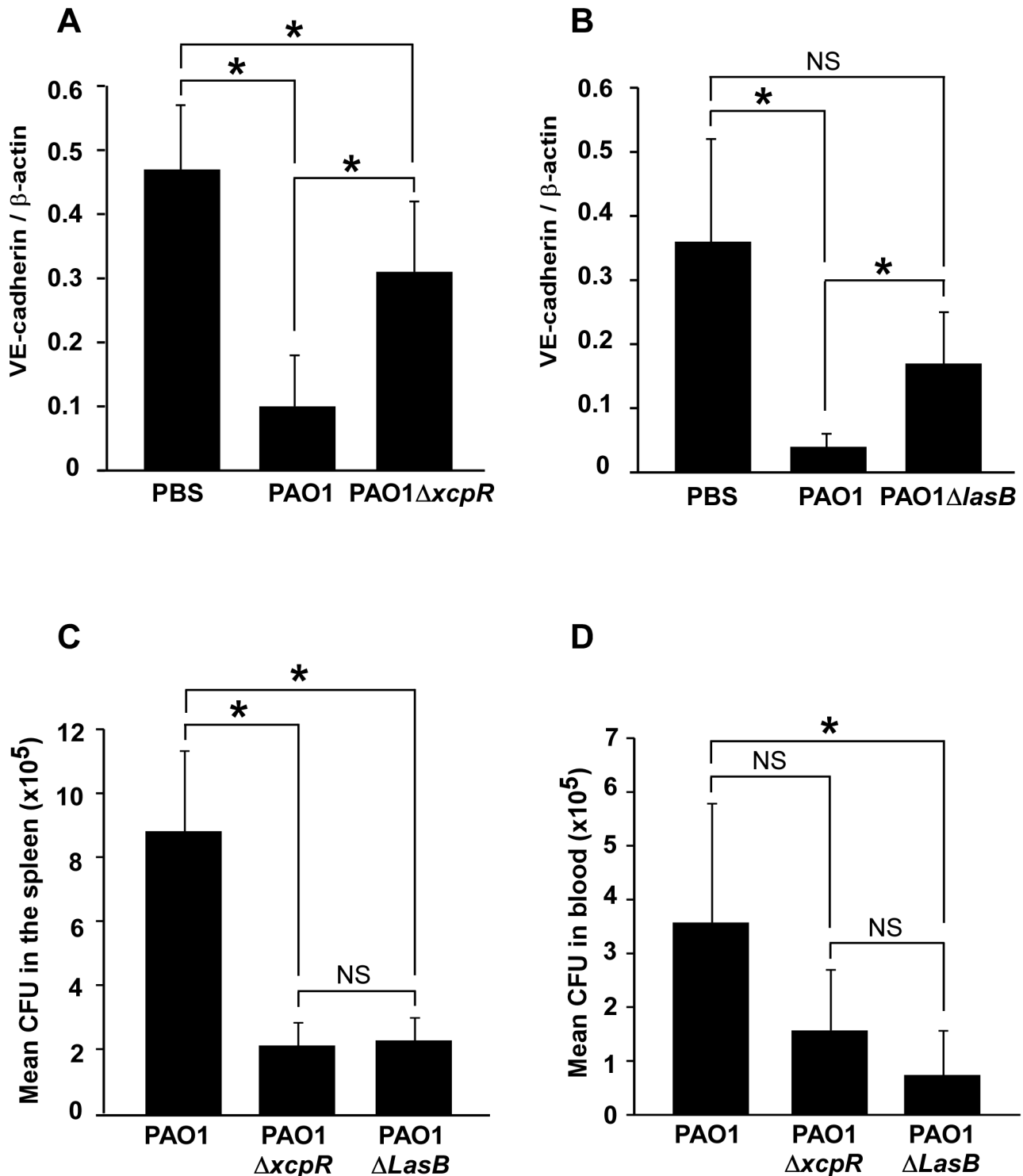


Figure 9. Decreased VE-cadherin levels in mouse acute pneumonia correlated with increased dissemination. (A) Mice were infected by airway instillation of a suspension (2.5×10^6) of PAO1, PAO1 $\Delta xcpR$ or mock-infected with PBS. (B) Similar experiment with PAO1 $\Delta LasB$ mutant strain. Lungs were resected 16 hours later and proteins were analyzed by Western blot using antibodies against mouse VE-cadherin C-terminus (VE-cad Cter) and β -actin (β -act). Signals were quantified and data are presented as mean ($n=5$) VE-cadherin/ β -actin signal ratios+SD. VE-cadherin levels were strikingly diminished in PAO1-infected lungs, while those infected with PAO1 $\Delta xcpR$ or PAO1 $\Delta LasB$ only displayed a moderate decrease. Statistics for (A): 1-way ANOVA, $p < 0.001$, for (B): Kruskal-Wallis, $p = 0.004$. Pairwise significance (*) was determined by Bonferroni's test. (C, D) Mice were infected by airway instillation of a suspension of PAO1, PAO1 $\Delta xcpR$ or PAO1 $\Delta LasB$ (2.5×10^6). Blood samples and spleen were withdrawn 16 hours later. *P. aeruginosa* colony forming units (CFU) were evaluated in both locations by conventional techniques. Data are presented as the mean CFU ($n=5$)+SEM, calculated for total spleens (C) or total mouse blood (D). Statistics for (C): Kruskal-Wallis, $p = 0.008$, for (D): 1-way ANOVA, $p = 0.032$. Pairwise significance (*) was determined by Bonferroni's test. Data are representative of 3 independent experiments. doi:10.1371/journal.ppat.1003939.g009

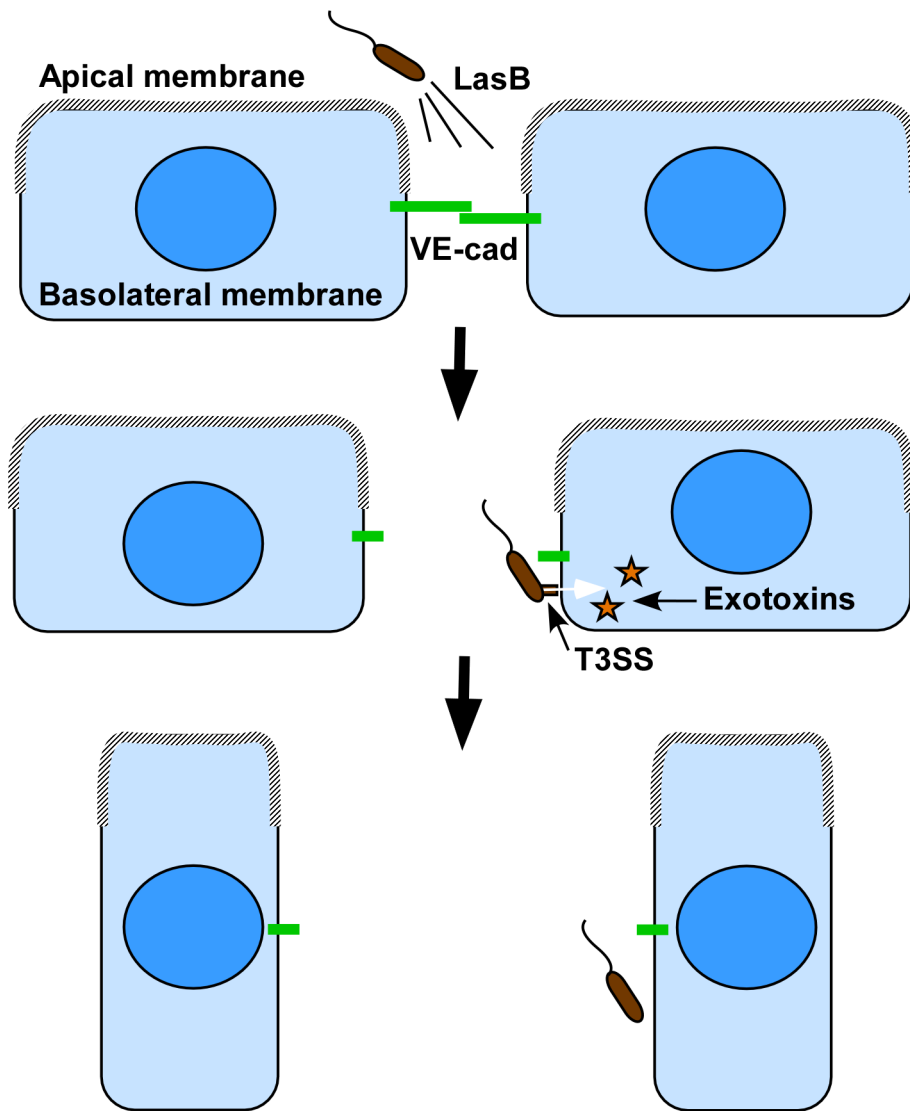


Figure 10. Proposed cooperation model between *P. aeruginosa*'s T2SS and T3SS. As previously reported in epithelial cells, the apical membrane may not be permissive to bacterial interaction with endothelial cells, thus preventing T3SS-dependent intoxication. Our model proposes that bacteria spray T2SS proteases, including LasB, in close vicinity of cell-cell junctions, leading to VE-cadherin cleavage and junction opening. In addition to the induced rupture in endothelium barrier integrity, cell-cell junction disruption gives bacterium access to the basolateral membrane, a more favorable domain for bacterial landing and exotoxin injection. Injection of T3 effectors leads to cell retraction and a complete loss of the endothelial barrier.

doi:10.1371/journal.ppat.1003939.g010

Once confluent, cells were infected as described above by addition of bacteria or secretomes in the upper compartment. Five micrograms of bovine serum albumin coupled to TRITC (Nordic Immunological) were added together with bacteria or secretomes in the upper compartment. Fluorescence in the lower compartment was measured at 7 hours p.i. in a fluorescence plate reader (ThermoScientific). In case of bacterial infection, bacteria transmigration was examined by plating of serial dilutions of the lower compartment medium on PIA plates and CFU counting. Results shown were calculated for the total volume of the lower compartment.

Production of VE-cadherin extracellular domain

HEK-293-EBNA cells producing soluble VE-cadherin were kindly provided by Danielle Gulino-Debrac (Grenoble, France). The recombinant protein consists of human VE-cadherin extra-

cellular domain (amino-acids 1-593) fused at its C-terminus to 6 histidines for chromatography purification on Ni-column. Briefly, the cell conditioned medium was harvested, dialyzed against Tris 50 mM pH 8.0 and subjected to ion exchange chromatography on HiTrap Q HP (Akta purifier). The elution fractions were further purified by chromatography on Ni-columns. The eluted protein was evaluated for purity by coomassie staining (Fig. S4) and Western blotting (not shown).

N-terminal sequencing of VE-cadherin cleavage products

Recombinant VE-cadherin was exposed to purified LasB and reaction products were electrophoresed, transferred on PVDF membrane and stained with Coomassie. The 50 kDa band was excised and subjected to N-terminal sequencing. Amino acid sequence determination based on Edman degradation was performed using an Applied Biosystems gas-phase sequencer

model 492. Phenylthiohydantoinamino acid derivatives generated at each sequence cycle were identified and quantitated on-line with an Applied Biosystems Model 140C HPLC system using the data analysis system for protein sequencing from Applied Biosystems Model 610A. Chromatography was used to identify and quantify the derivatized amino acid removed at each sequence cycle. Retention times and integration values of peaks were compared to the chromatographic profile obtained for a standard mixture of derivatized amino acids

P. aeruginosa-induced lung injury

Pathogen-free Balbc male mice (8–10 weeks) were obtained from Harlan Laboratories and housed in the CEA animal care facility. Neutropenia was induced by cyclophosphamide administration (100 mg/Kg IP) for 4 days (days 1–4). At day 5, bacteria in exponential growth phase were centrifuged and resuspended in sterile PBS at $0.85 \cdot 10^8$ per mL as evaluated by spectroscopy. Mice were anesthetized by intraperitoneal administration of a mixture of xylazine (10 mg/Kg) and ketamine (50 mg/Kg). Then, 30 μ L of bacterial suspension (i.e. $2.5 \cdot 10^6$ bacteria) were deposited into mouse nostrils. Mice were euthanized by CO₂ inhalation 16 hours later. Lungs were resected and lysed for protein extraction. Blood samples and spleen were withdrawn and spleen was homogenized in 2 mL PBS in a Polytron. Serial dilutions of blood and spleen homogenate were spread onto PIA plates for CFU determination.

Statistics

Multiple comparison tests (either ANOVA or Kruskal-Wallis depending on data distribution) and post-hoc tests (either pairwise or relative to control) were performed as indicated in the legends, using SigmaPlot software.

Accession numbers of genes and proteins mentioned in this study

Human proteins: VE-cadherin (CAA56306), E-cadherin (CAA84586), ZO-1 (Q07157). *P. aeruginosa* proteins: AprA (AFX88325), LasA (AAC12656), LasB (AEM45937), PscD (AAC44775), PscF (AAC44777), XcpR (AAB27772).

Supporting Information

Figure S1 Type 2 and type 3 secretions of *P. aeruginosa* strains. (A) Secretomes (at $A_{600} = 1.0$) were produced in LB (Non induced) or in LB supplemented with 5 mM EGTA to induce T3 effector secretion (Induced). The secretomes (16 μ L) were analyzed by Western blot using ExoS antibodies. ExoS was secreted by all analyzed strains in induced conditions. (B) Secretomes (10 μ L) collected at $A_{600} = 1.5$ were analyzed by electrophoresis in gelatin-containing SDS-PAGE. After overnight incubation, in-gel protein degradation was assayed by coomassie staining. Protease electrophoretic pattern was as previously reported [16]. LasA and LasB activities were minimal in $\Delta xcpR$ strains, but also in the LasB-deficient strain because of the required LasB activation of LasA [19]. Remaining LasA/LasB activities observed in $\Delta xcpR$ strains probably originate from lysed bacteria. Activity of AprA, a T1SS protease, was present in all secretomes. (PDF)

Figure S2 *P. aeruginosa*'s type 2 effectors provoke gap formation in endothelial cell monolayer. (A) Confluent HUVECs were treated with a 10% volume of CHA or CHA $\Delta xcpR$ secretomes (sec) or LB in the cell culture medium. Cells were fixed

1.5 hours later and labeled for VE-cadherin (green) and filamentous (F)-actin (red). In the merged images, nuclei are also shown in blue. The actin cytoskeleton is present in all 3 conditions, however, as for PAO1, there were fewer actin fibers and the onset of condensed cortical actin foci (yellow arrows) in retracted cells (sec-CHA). The VE-cadherin antibody decorates cell-cell junctions in LB or in sec-CHA $\Delta xcpR$ conditions (arrows), while labeling is attenuated or absent in presence of sec-CHA (arrowheads). This alteration parallels gap formation between cells. A similar experiment was performed with PAO1 secretomes with identical results (Fig. 2). (B) Length of VE-cadherin lining at cell edges was quantified on 10 images for each condition. Data represent the mean+SD of VE-cadherin lining length. Statistics: 1-way ANOVA, $p < 0.001$; Significance was determined using pairwise Bonferroni's test (*).

(PDF)

Figure S3 Secretomes from *P. aeruginosa* disrupt tight junctions. Confluent HUVECs were treated for 3 hours with PAO1 or CHA secretomes either wild type or $\Delta xcpR$ as indicated. Controls were noninfected cells (NI). Cells were fixed and labeled for F-actin (red) or ZO-1 (green), an essential tight junction component. ZO-1 antibody produced a very thin staining at cell-cell junctions (arrows); in presence of secretomes from wild-type strains, labeling disappeared (arrowheads).

(PDF)

Figure S4 Electrophoretic analysis of purified soluble VE-cadherin. VE-cadherin extracellular domain fused to 6-histidine tag (sVE-cad) was produced in HEK-293 cells. Recombinant protein was purified from conditioned medium by ion exchange and nickel-histidine affinity chromatographies successively. Purified protein was electrophoresed and gel was Coomassie stained. Data shows a major band at 90 kDa and a very faint band at 25 kDa.

(PDF)

Figure S5 Electrophoretic analysis of purified LasB. Electrophoretic analysis and silver staining of purified LasB shows one band at 35 kDa.

(PDF)

Figure S6 Propagation of cell retraction in HUVEC monolayer. Confluent HUVECs were infected for 2 hours with PAO1 at MOI=10. Cells were fixed and labeled with actin antibody (green). Endothelial cell retraction was not synchronized, but started in specific points and propagated from these sites (arrows).

(PDF)

Acknowledgments

We are grateful to Danielle Gulino-Debrac for Cad3 antibody and VE-cadherin expressing cells, to Andreas Ludwig for ADAM inhibitor, to Jean-Pierre Andrieu for VE-cadherin N-terminal sequencing, to Michel Ragno for his help in chromatography and to Eric Durand for PAO1 $\Delta xcpR$ construct. We thank Jack Larsen for careful proofreading of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PH EF IA. Performed the experiments: GG PH SB. Analyzed the data: PH EF IA RV. Contributed reagents/materials/analysis tools: IA EF RV. Wrote the paper: PH RV.

References

1. El Solh AA, Alhajhusain A (2009) Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 64: 229–238
2. El-Solh AA, Hattemer A, Hauser AR, Alhajhusain A, Vora H (2012) Clinical outcomes of type III *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Critical care medicine* 40: 1157–1163
3. Jyot J, Balloy V, Jouvion G, Verma A, Touqui L, et al. (2011) Type II secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: in vivo evidence of a significant role in death due to lung infection. *The Journal of infectious diseases* 203: 1369–1377
4. 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. *Infection and immunity* 73: 1706–1713
5. Deng Q, Barbieri JT (2008) Molecular mechanisms of the cytotoxicity of ADP-ribosylating toxins. *Annual review of microbiology* 62: 271–288
6. Engel J, Balachandran P (2009) Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Current opinion in microbiology* 12: 61–66
7. Hauser AR (2009) The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nature reviews* 7: 654–665
8. Huber P, Bouillot S, Elsen S, Attrée I (2013) Sequential inactivation of Rho GTPases and Lim kinase by *Pseudomonas aeruginosa* toxins ExoS and ExoT leads to endothelial monolayer breakdown. *Cell Mol Life Sci* [epub ahead of print]
9. Sayner SL, Frank DW, King J, Chen H, VandeWaa J, et al. (2004) Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. *Circulation research* 95: 196–203
10. Blevess 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
11. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J (2006) Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Medecine et maladies infectieuses* 36: 78–91
12. Douzi B, Ball G, Cambillau C, Tegoni M, Voulhoux R (2012) Deciphering the Xcp *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion machinery through multiple interactions with substrates. *The Journal of biological chemistry* 286: 40792–40801
13. Bardeel BW, Hartsink D, Vughs MM, de Haas CJ, van Strijp JA, et al. (2012) Identification of an immunomodulating metalloprotease of *Pseudomonas aeruginosa* (IMPa). *Cellular microbiology* 14: 902–913
14. Ball G, Chapon-Herve V, Blevess S, Michel G, Bally M (1999) Assembly of XcpR in the cytoplasmic membrane is required for extracellular protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 181: 382–388
15. Kierbel A, Gassama-Diagne A, Rocha C, Radoshevich L, Olson J, et al. (2007) *Pseudomonas aeruginosa* exploits a PIP3-dependent pathway to transform apical into basolateral membrane. *The Journal of cell biology* 177: 21–27
16. Tingpej P, Smith L, Rose B, Zhu H, Conibear T, et al. (2007) Phenotypic characterization of clonal and nonclonal *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lungs of adults with cystic fibrosis. *Journal of clinical microbiology* 45: 1697–1704
17. Wallez Y, Huber P (2008) Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 1778: 794–809
18. Schulz B, Pruessmeyer J, Maretzky T, Ludwig A, Blobel CP, et al. (2008) ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circulation research* 102: 1192–1201
19. Braun P, de Groot A, Bitter W, Tommassen J (1998) Secretion of elastinolytic enzymes and their propeptides by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 180: 3467–3469
20. Hermant B, Bibert S, Concord E, Dublet B, Weidenhaupt M, et al. (2003) Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during neutrophil transmigration. *The Journal of biological chemistry* 278: 14002–14012
21. Toussaint B, Delic-Attrée I, Vignais PM (1993) *Pseudomonas aeruginosa* contains an IHF-like protein that binds to the algD promoter. *Biochemical and biophysical research communications* 196: 416–421
22. Breviaro F, Cavada L, Corada M, Martin-Padura I, Navarro P, et al. (1995) Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 15: 1229–1239
23. Corada M, Liao F, Lindgren M, Lampugnani MG, Breviaro F, et al. (2001) Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability. *Blood* 97: 1679–1684
24. Corada M, Zanetta L, Orsenigo F, Breviaro F, Lampugnani MG, et al. (2002) A monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin inhibits tumor angiogenesis without side effects on endothelial permeability. *Blood* 100: 905–911
25. Prasain N, Stevens T (2009) The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvascular research* 77: 53–63
26. Tamura Y, Suzuki S, Sawada T (1992) Role of elastase as a virulence factor in experimental *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *Microbial pathogenesis* 12: 237–244
27. Wretling B, Bjorklind A, Pavlovskis OR (1987) Role of exotoxin A and elastase in the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO experimental mouse burn infection. *Microbial pathogenesis* 2: 397–404
28. Gavard J (2009) Breaking the VE-cadherin bonds. *FEBS letters* 583: 1–6
29. Azghani AO (1996) *Pseudomonas aeruginosa* and epithelial permeability: role of virulence factors elastase and exotoxin A. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 15: 132–140
30. Vikstrom E, Tafazoli F, Magnusson KE (2006) *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone disrupts epithelial barrier integrity of Caco-2 cells. *FEBS letters* 580: 6921–6928
31. Vikstrom E, Bui L, Konradsson P, Magnusson KE (2009) The junctional integrity of epithelial cells is modulated by *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule through phosphorylation-dependent mechanisms. *Experimental cell research* 315: 313–326
32. Schmidtchen A, Holst E, Tapper H, Bjorck L (2003) Elastase-producing *Pseudomonas aeruginosa* degrade plasma proteins and extracellular products of human skin and fibroblasts, and inhibit fibroblast growth. *Microbial pathogenesis* 34: 47–55
33. Hong YQ, Ghebrehwet B (1992) Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. *Clinical immunology and immunopathology* 62: 133–138
34. Kuang Z, Hao Y, Walling BE, Jeffries JL, Ohman DE, et al. (2011) *Pseudomonas aeruginosa* elastase provides an escape from phagocytosis by degrading the pulmonary surfactant protein-A. *PLoS one* 6: e27091
35. Mariencheck WI, Alcorn JF, Palmer SM, Wright JR (2003) *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 28: 528–537
36. Beaufort N, Corvazier E, Hervieu A, Choqueux C, Dussiot M, et al. (2011) The thermolysin-like metalloproteinase and virulence factor LasB from pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* induces anoikis of human vascular cells. *Cellular microbiology* 13: 1149–1167
37. Dulon S, Leduc D, Cottrell GS, D’Alayer J, Hansen KK, et al. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* elastase disables proteinase-activated receptor 2 in respiratory epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 32: 411–419
38. Leduc D, Beaufort N, de Bentzmann S, Rousselle JC, Namane A, et al. (2007) The *Pseudomonas aeruginosa* LasB metalloproteinase regulates the human urokinase-type plasminogen activator receptor through domain-specific endoproteolysis. *Infection and immunity* 75: 3848–3858
39. Durand E, Michel G, Voulhoux R, Kurner J, Bernadac A, et al. (2005) XcpX controls biogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* XcpT-containing pseudopilus. *The Journal of biological chemistry* 280: 31378–31389
40. McIver KS, Kessler E, Olson JC, Ohman DE (1995) The elastase propeptide functions as an intramolecular chaperone required for elastase activity and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology* 18: 877–889
41. Cisz M, Lec PC, Rietsch A (2008) ExoS controls the cell contact-mediated switch to effector secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 190: 2726–2738
42. Pastor A, Chabert J, Louwagie M, Garin J, Attrée I (2005) PscF is a major component of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion needle. *FEMS microbiology letters* 253: 95–101

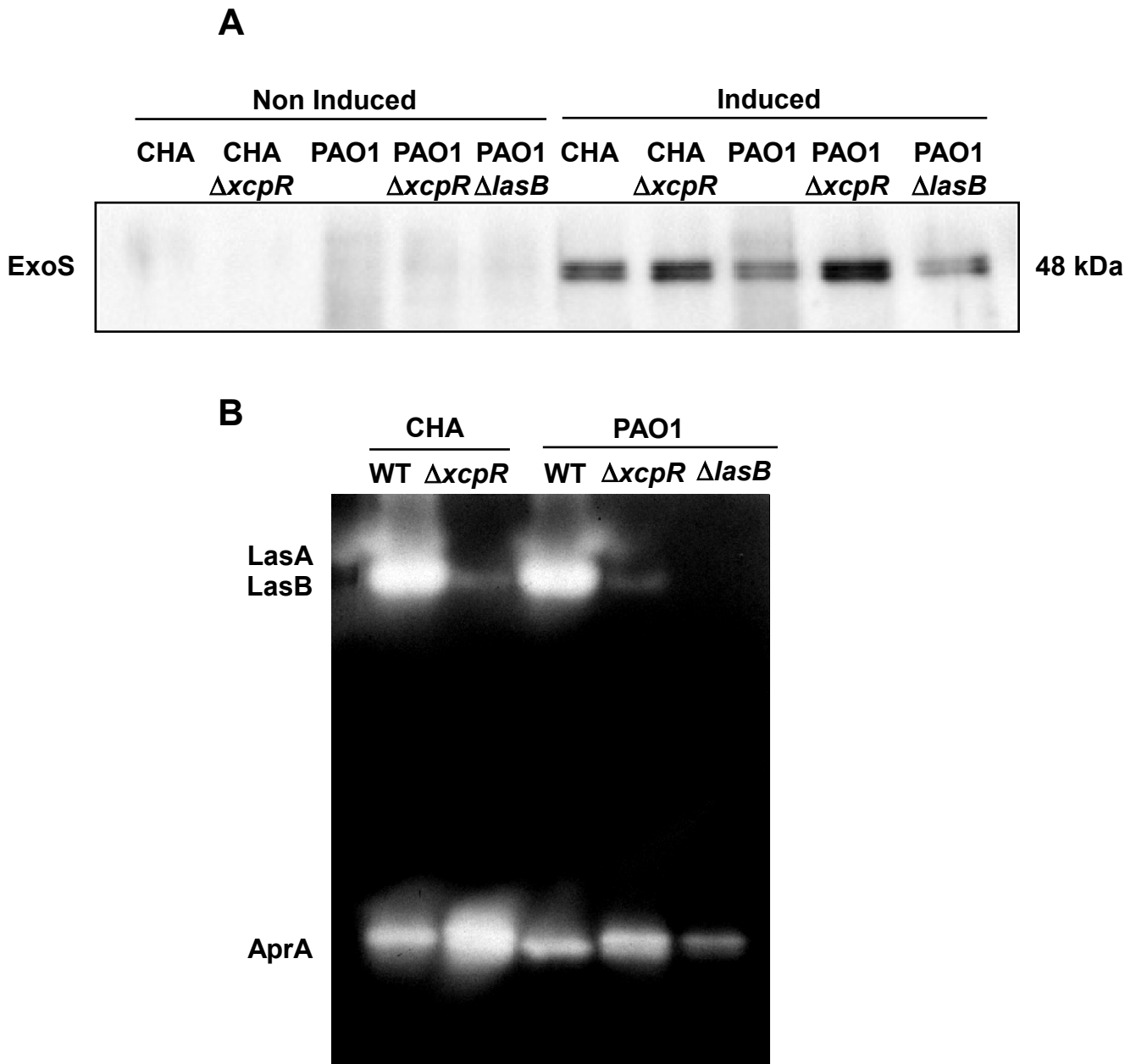


Figure S1

Figure S1. Type 2 and type 3 secretions of *P. aeruginosa* strains. (A) Secretomes (at $A_{600} = 1.0$) were produced in LB (Non induced) or in LB supplemented with 5 mM EGTA to induce T3 effector secretion (Induced). The secretomes (16 μ L) were analyzed by Western blot using ExoS antibodies. ExoS was secreted by all analyzed strains in induced conditions. (B) Secretomes (10 μ L) collected at $A_{600} = 1.5$ were analyzed by electrophoresis in gelatin-containing SDS-PAGE. After overnight incubation, in-gel protein degradation was assayed by coomassie staining. Protease electrophoretic pattern was as previously reported [16]. LasA and LasB activities were minimal in $\Delta xcpR$ strains, but also in the LasB-deficient strain because of the required LasB activation of LasA [19]. Remaining LasA/LasB activities observed in $\Delta xcpR$ strains probably originate from lysed bacteria. Activity of AprA, a T1SS protease, was present in all secretomes.

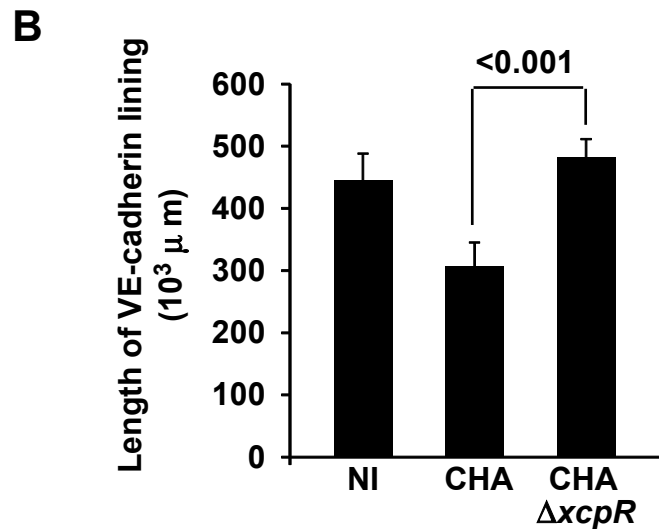
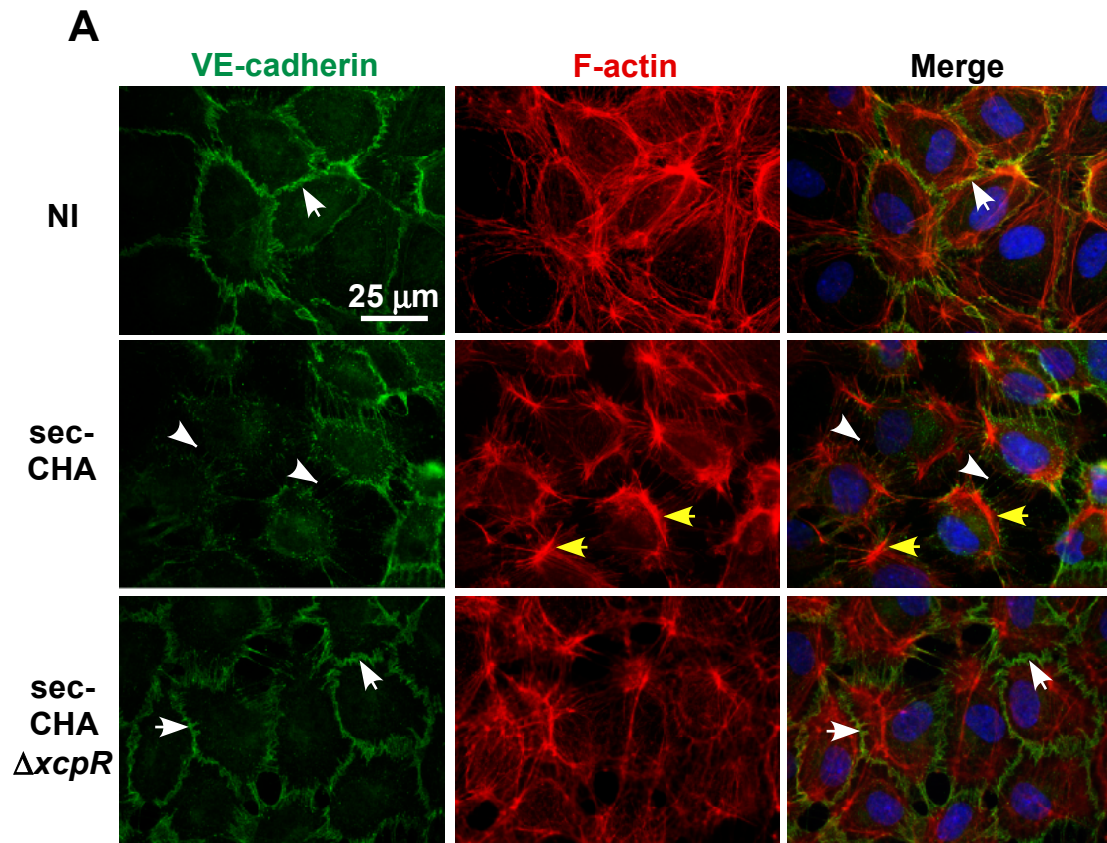


Figure S2

Figure S2. *P. aeruginosa*'s type 2 effectors provoke gap formation in endothelial cell monolayer. (A) Confluent HUVECs were treated with a 10% volume of CHA or CHAΔxcpR secretomes (sec) or LB in the cell culture medium. Cells were fixed 1.5 hours later and labeled for VE-cadherin (green) and filamentous (F)-actin (red). In the merged images, nuclei are also shown in blue. The actin cytoskeleton is present in all 3 conditions, however, as for PAO1, there were fewer actin fibers and the onset of condensed cortical actin foci (yellow arrows) in retracted cells (sec-CHA). The VE-cadherin antibody decorates cell-cell junctions in LB or in sec-CHAΔxcpR conditions (arrows), while labeling is attenuated or absent in presence of sec-CHA (arrowheads). This alteration parallels gap formation between cells. A similar experiment was performed with PAO1 secretomes with identical results (Fig. 2). (B) Length of VE-cadherin lining at cell edges was quantified on 10 images for each condition. Data represent the mean+SD of VE-cadherin lining length. Statistics: 1-way ANOVA, $p < 0.001$; Significance was determined using pairwise Bonferroni's test (*).

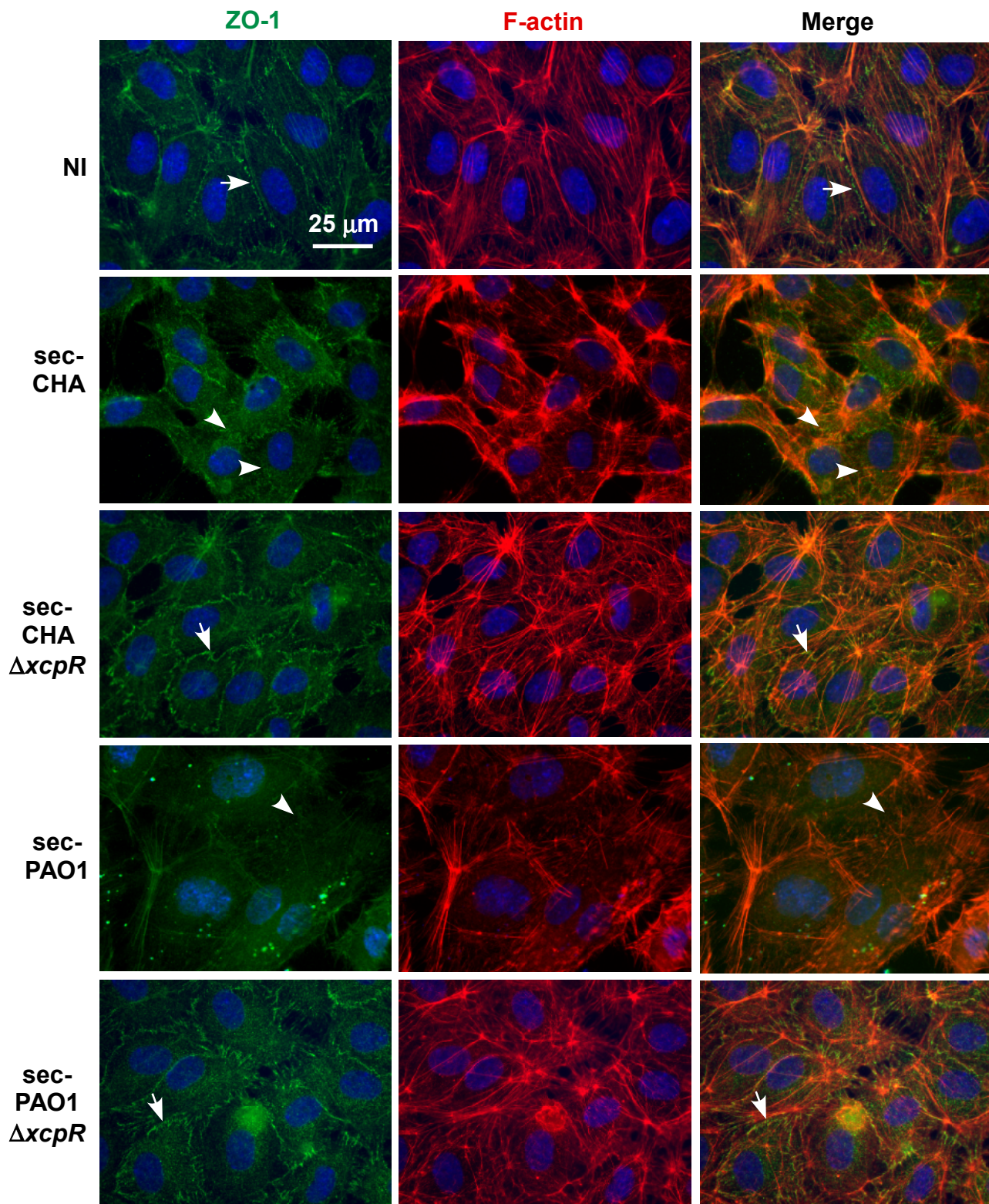


Figure S3

Figure S3. Secretomes from *P. aeruginosa* disrupt tight junctions. Confluent HUVECs were treated for 3 hours with PAO1 or CHA secretomes either wild type or $\Delta xcpR$ as indicated. Controls were noninfected cells (NI). Cells were fixed and labeled for F-actin (red) or ZO-1 (green), an essential tight junction component. ZO-1 antibody produced a very thin staining at cell-cell junctions (arrows); in presence of secretomes from wild-type strains, labeling disappeared (arrowheads).

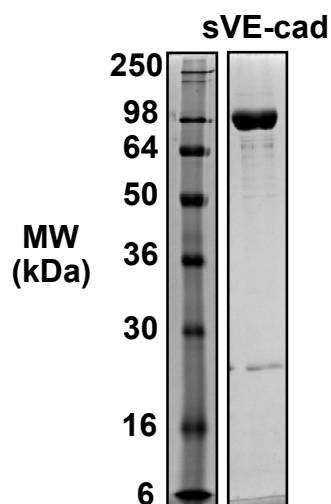


Figure S4

Figure S4. Electrophoretic analysis of purified soluble VE-cadherin. VE-cadherin extracellular domain fused to 6-histidine tag (sVE-cad) was produced in HEK-293 cells. Recombinant protein was purified from conditioned medium by ion exchange and nickel-histidine affinity chromatographies successively. Purified protein was electrophoresed and gel was Coomassie stained. Data shows a major band at 90 kDa and a very faint band at 25 kDa.

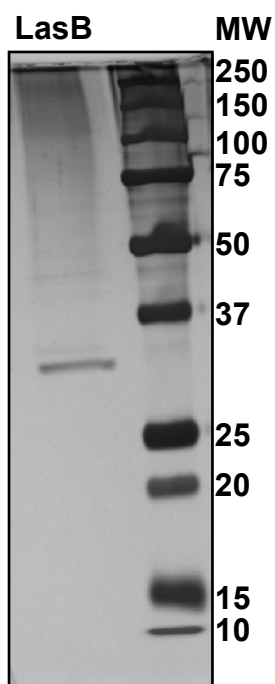


Figure S5

Figure S5. Electrophoretic analysis of purified LasB. Electrophoretic analysis and silver staining of purified LasB shows one band at 35 kDa

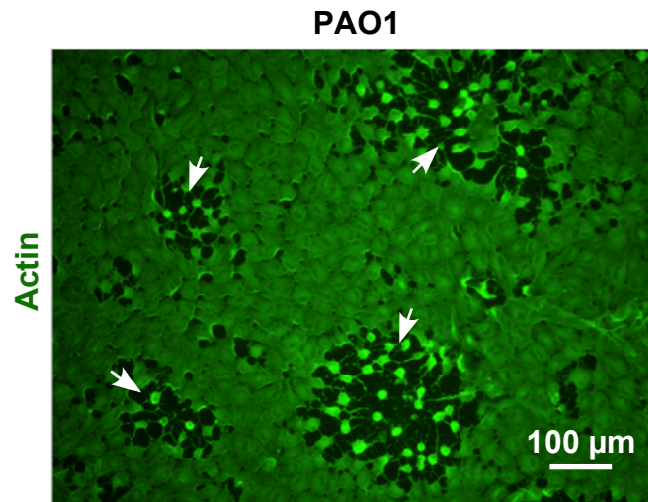


Figure S6

Figure S6. Propagation of cell retraction in HUVEC monolayer. Confluent HUVECs were infected for 2 hours with PAO1 at MOI = 10. Cells were fixed and labeled with actin antibody (green). Endothelial cell retraction was not synchronized, but started in specific points and propagated from these sites (arrows).

C. Discussion

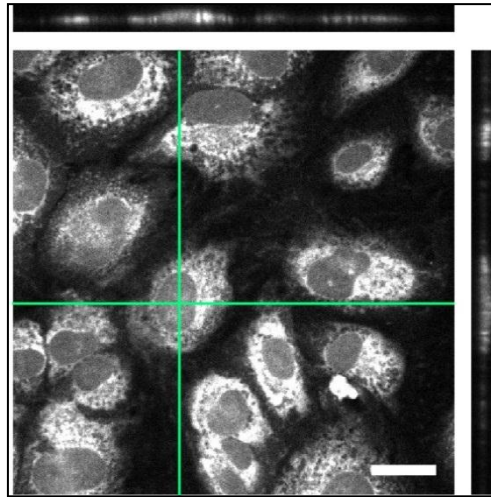
Dans cet article, nous décrivons une propriété de la protéase LasB sécrétée par *P. aeruginosa*. En plus de son implication dans la dégradation de la matrice extracellulaire, LasB est en effet capable de cliver spécifiquement la VE-cadhérine, une protéine essentielle des jonctions intercellulaires endothéliales. Nous démontrons l'importance de ce phénomène à la fois *in vitro* et *in vivo*.

Dans cette discussion, nous aborderons un certain nombre de points supplémentaires à ceux abordés dans l'article.

a. Injection des toxines et polarité des cellules

Plusieurs études démontrent que l'injection des toxines du SST3 de *P. aeruginosa* est impossible du côté apical des cellules épithéliales (Fleiszig et al., 1997; Lee et al., 1999). Ce résultat est en adéquation avec les résultats de l'étude présentée dans le Chapitre VII, dans laquelle nous observons par microscopie confocale l'interaction entre *P. aeruginosa* et une monocouche de cellules épithéliales.

Pour les cellules endothéliales, cette impossibilité d'injection du côté apical des cellules n'est pour l'instant pas démontrée, bien que l'effet synergique observé entre le SST2 et le SST3 sur cellules confluentes prêche à penser que le même phénomène a lieu pour ce type cellulaire. La technique de visualisation de l'infection par microscopie confocale présentée dans le Chapitre VII pourrait être utilisée pour les cellules endothéliales. Cette étude n'a pour l'instant pas été réalisée à cause de la morphologie des HUVEC : celles-ci étant extrêmement plates, il n'est pas sûr que l'on puisse observer correctement la transmigration bactérienne (voir Figure 28).



*Figure 28 : Image en microscopie confocale d'HUVEC
Marquage des cellule au CMRA, échelle 25 μm . Les traits verts indiquent la position des
sections en Z présentées en haut et à droite (données non publiées)*

Pour pouvoir observer clairement ce phénomène, un modèle cellulaire ayant une morphologie plus haute devrait être utilisé. Il existe plusieurs lignées cellulaires dérivées de cellules endothéliales (Bouis et al., 2001). Certaines d'entre elles ont peut-être une morphologie plus adaptée à cette étude de microscopie.

b. Cibles de LasB

Plusieurs substrats de LasB ont été identifiés. Parmi eux figurent des composants de la matrice extracellulaire (fibronectine, vitronectine, etc.) et des protéines de surface des cellules endothéliales (VE-cadhérine, uPAR), suggérant que LasB participe à l'induction de la mort des cellules endothéliales par anoïkose, une forme spécifique d'apoptose liée à une perte d'interaction de la cellule à la matrice extracellulaire (Beaufort et al., 2013). Cependant, LasB n'a pas d'activité de dégradation des intégrines, qui sont les principales protéines transmembranaires impliquées dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire.

De nombreux pathogènes (y compris des pathogènes pulmonaires tels que *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* ou *Mycobacterium tuberculosis*) exploitent les intégrines des cellules épithéliales pour envahir l'épithélium et les tissus sous-jacents (Ulanova et al., 2009). Ces bactéries expriment des adhésines capables de reconnaître directement ou indirectement (par le biais de protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine ou la vitronectine) les intégrines des cellules épithéliales (voir Figure 29).

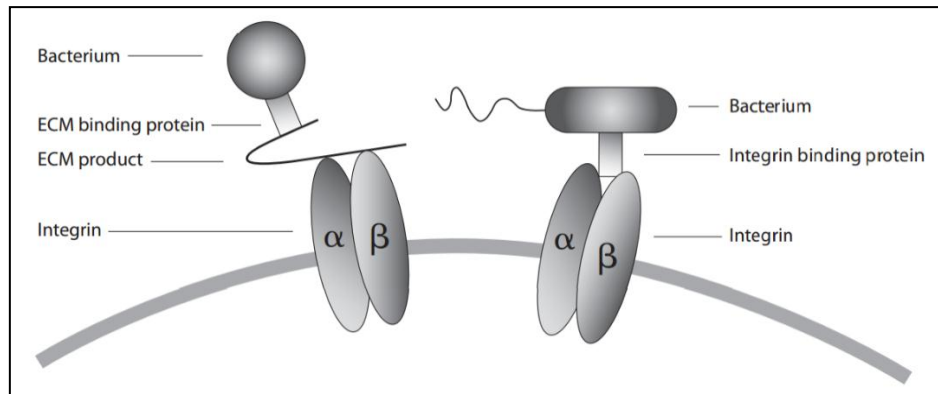


Figure 29 : Mécanismes d'interaction des pathogènes bactériens avec les intégrines (Ulanova et al., 2009)

Dans le cas de *P. aeruginosa*, certaines intégrines servent de récepteurs aux pili, qui sont eux-mêmes nécessaires à l'injection des toxines du SST3 (Johnson et al., 2011; Roger et al., 1999). Etant donné l'importance de l'injection des toxines pour sa virulence, il est envisageable de penser que *P. aeruginosa* préserve les intégrines afin de s'ancrer à la cellule.

L'absence de clivage des intégrines par LasB pourrait donc être un reflet de la coopération entre SST2 et SST3 pour infecter des cellules endothéliales.

c. Conservation de l'activité de LasB chez différentes souches de *P. aeruginosa*

Récemment, Emeline Reboud, doctorante au sein de notre laboratoire, a mené une étude phénotypique sur plusieurs souches de *P. aeruginosa*, incluant l'activité protéasique sécrétée. Ses travaux mettent en évidence le fait que LasB n'est pas exprimée par toutes les souches de *P. aeruginosa*. Sur les 19 souches testées, seules 7 ont une activité de LasB détectable par zymographie. Il serait intéressant d'élargir cette étude à un plus grand nombre de souches, afin de déterminer si certaines catégories de souches de *P. aeruginosa*, notamment les souches issues de bactériémies, expriment plus fortement LasB que les autres.

Par ailleurs, l'étude menée par Emeline Reboud indique qu'il existe plusieurs versions de la protéase LasB (en zymographie, les protéases de différentes souches migrent à des tailles différentes). Ses résultats montrent que chacune de ces versions de la protéase est capable de cliver la VE-cadhérine (Reboud et al., manuscrit en préparation). Il est à noter que son étude comporte notamment PAO1 (la souche que nous avons utilisée dans notre étude) et des

souches de type « PA7 », une famille de souche de *P. aeruginosa* considérées comme marginales, car très éloignées génétiquement de PAO1 (Kos et al., 2015; Roy et al., 2010). Ces résultats indiquent que l'activité de protéolyse de la VE-cadhérine a été conservée parmi les souches de *P. aeruginosa* sécrétant LasB, et que cette capacité a été maintenue au cours de l'évolution génétique de la bactérie.

d. Clivage de la VE-cadhérine et types de vaisseaux

Les cellules endothéliales utilisées dans cette étude sont des HUVEC, des cellules endothéliales primaires isolées à partir de cordons ombilicaux. Ces cellules ont pour propriété de se déspecialiser au fur et à mesure de leurs passages successifs en culture. Ainsi, elle acquièrent un phénotype « moyen » de cellules endothéliales (Leach et al., 2012).

Au cours de l'infection, *P. aeruginosa* pourra être confrontée à des cellules endothéliales aux phénotypes très variés. Il est à noter que des cas d'infections du système nerveux central par *P. aeruginosa* ont été rapportés. Ces infections sont généralement issues d'un traumatisme crânien ou d'une intervention neurochirurgicale. Cependant, elles peuvent également résulter d'une bactériémie. Dans ce dernier cas, les bactéries n'ont pas directement accès au système nerveux mais y accèdent en franchissant la barrière hémato-encéphalique. Cette barrière endothéliale est l'une des barrières les plus étanches de l'organisme, grâce aux jonctions serrées très robustes qui y sont exprimées.

Les jonctions serrées exprimées dans les cellules endothéliales et épithéliales ont pour fonction d'assurer l'étanchéité du tissu en empêchant le passage de molécules entre les cellules. Les jonctions serrées devraient donc, en théorie, protéger la VE-cadhérine de l'activité de LasB. Le mécanisme permettant à LasB de franchir les jonctions serrées n'a pas été recherché dans notre étude.

Il a été montré que LasB peut perturber de façon transitoire les jonctions serrées de cellules épithéliales (Nomura et al., 2014). Le même phénomène a peut-être lieu envers les cellules endothéliales. De fait, Beaufort et ses collaborateurs ont démontré que LasB peut dégrader l'occludine, présente dans la barrière hémato-encéphalique (Beaufort et al., 2013).

e. Etude *in vivo*

Le modèle le plus judicieux pour étudier l'interaction entre *P. aeruginosa* et l'endothélium est le modèle de bactériémie. En injectant directement les bactéries dans le système sanguin, celles-ci se retrouvent en contact avec l'endothélium sans avoir à franchir en premier lieu une autre barrière tissulaire. De plus, les bactéries se retrouvent du côté apical des cellules endothéliales, ce qui est important pour le modèle de coopération entre SST2 et SST3 que nous proposons. Nous avons tenté de mettre en place un modèle murin de bactériémie, mais ces expériences ont échoué, principalement pour des raisons techniques.

Le modèle de pneumonie aiguë que nous avons finalement sélectionné est également un bon modèle *in vivo* pour étudier les infections à *P. aeruginosa*. Les infections pulmonaires sont parmi les infections les plus fréquentes à *P. aeruginosa*, c'est pourquoi ce type de modèle a largement été utilisé par d'autres groupes (Jyot et al., 2011; Le Berre et al., 2011).

Ce type de modèle est aussi très pertinent pour étudier l'interaction entre *P. aeruginosa* et l'endothélium car les poumons sont des organes fortement vascularisés et ils contiennent de grandes quantités de VE-cadhérine (voir Figure 30).

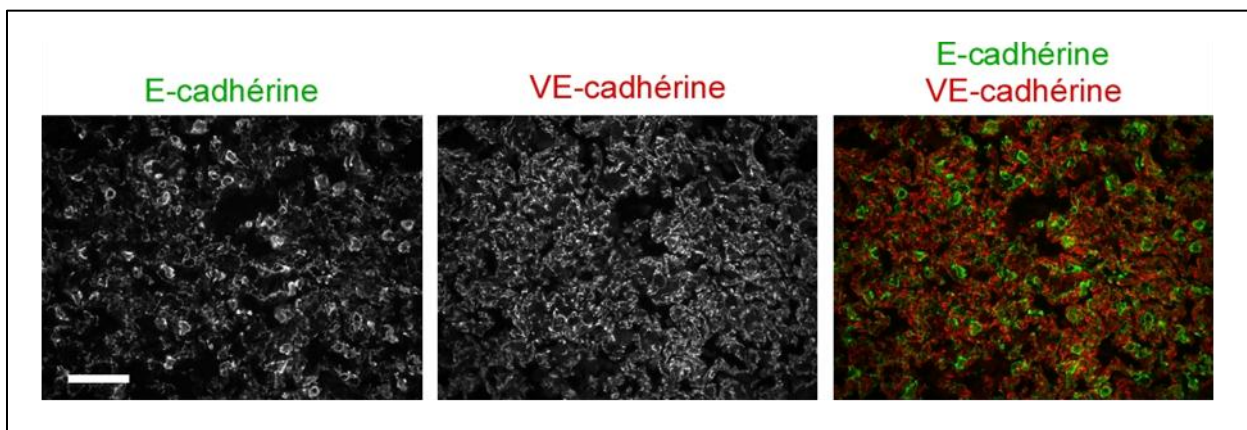


Figure 30 : Marquages E-cadhérine (vert) et VE-cadhérine (rouge) de poumons de souris (données non publiées)

Une remarque importante à faire sur ce type de modèle est que, après avoir franchi la barrière épithéliale pulmonaire, le premier contact entre bactéries et cellules endothéliales se fait par leur côté basal. L'injection des toxines du SST3 est donc directement possible. Il est probable que, dans ce contexte, l'activité de clivage de la VE-cadhérine par LasB ne soit pas nécessaire

à l'entrée dans le système sanguin. En revanche, ce clivage est sans doute un mécanisme important de la dissémination bactérienne, notamment pour l'invasion de nouveaux organes.

f. Détection de la septicémie à *P. aeruginosa*

Une étude menée par Zhang et ses collaborateurs a démontré que les fragments de l'ectodomaine de la VE-cadhérine qui sont libérés dans le système sanguin peuvent être utilisés comme marqueurs de septicémies graves (Zhang et al., 2010). Différents mécanismes permettent d'expliquer le clivage de la VE-cadhérine au cours de différentes pathologies. Une des causes principales de ce clivage est liée à l'activité des neutrophiles au cours de l'inflammation. En effet, ceux-ci sont capables de transmigrer à travers la paroi des vaisseaux sanguins en réponse à une infection ou à un endommagement des tissus (voir Figure 31). Ce processus d'extravasation peut s'opérer par une voie transcellulaire ou par une voie paracellulaire. Dans ce dernier cas, les neutrophiles franchissent la barrière endothéliale au niveau des jonctions intercellulaires. Certaines études ont montré un effacement transitoire par déplacement latéral de la VE-cadhérine lors de la diapédèse (Shaw et al., 2001; Su et al., 2002). Une autre étude a montré le clivage de la VE-cadhérine, dont le fragment extracellulaire est libéré dans le système sanguin. Ce clivage est opéré par l'élastase et la cathepsine G sécrétées par les neutrophiles (Hermant et al., 2003).

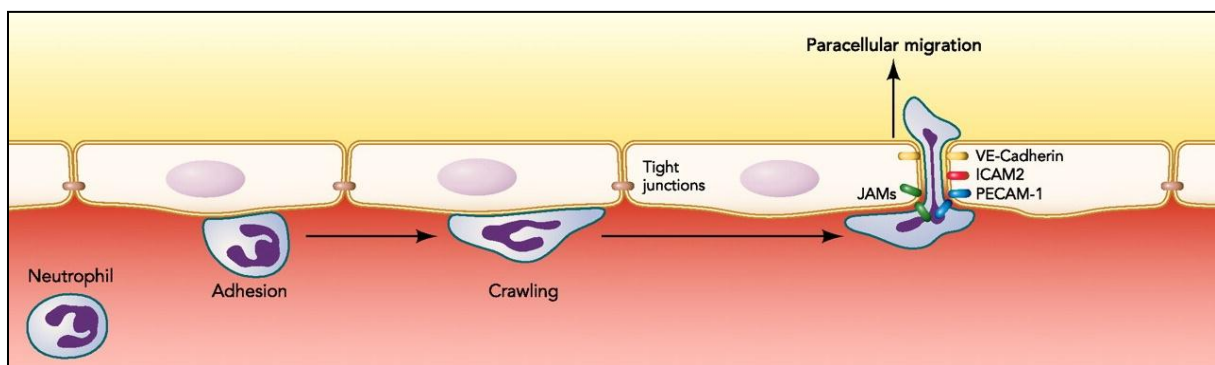


Figure 31 : Extravasation d'un neutrophile par voie paracellulaire (Schmidt et al., APS 2011).

Nous avons cherché à savoir si le fragment de VE-cadhérine résultant du clivage par LasB pouvait être utilisé comme un marqueur de l'infection à *P. aeruginosa*. Des expériences préliminaires sur souris ont été menées par Yoann Gioria au sein de notre équipe. Des prélèvements sanguins et de lavages broncho-alvéolaires (LBA) de souris non-infectées et infectées par *P. aeruginosa* (modèle de pneumonie aiguë) ont été comparés. Aucun fragment

de dégradation de la VE-cadhérine n'a pu être détecté dans les échantillons sanguins. En revanche, des fragments ont pu être détectés dans les LBA (données non publiées). Cependant, ces fragments de clivage sont détectés en très petites quantités, rendant ces échantillons difficilement exploitables. Une explication plausible est qu'il existe sans doute des sites de clivage secondaires de la VE-cadhérine par LasB, ou d'autres protéases tissulaires, entraînant la dégradation du fragment extracellulaire (voir Figure 6D de l'article).

Il est à noter que seul l'un des deux sites de clivage de LasB dans la VE-cadhérine humaine est retrouvé dans la séquence de la VE-cadhérine murine. Bien que ces deux protéines soient clivées par LasB, il est possible que les divergences de séquences entre ces deux protéines aient des répercussions sur la réponse de l'hôte au cours de l'infection.

g. Différence entre la E- et la VE-cadhérine

Le fait que la VE-cadhérine soit clivée par LasB, alors que la E-cadhérine y soit résistante, est un phénomène intéressant, qui s'explique par le fait que les sites de clivage de LasB dans la VE-cadhérine ne sont pas conservés dans la séquence de la E-cadhérine (voir Figure 32).

VE-cadherin	302	YQDAFTIETNPAHNEGI IKPMKPLDYEYIQQYSFIVEATDPT---IDLRY	348
	:. . . .: : : .:. . : .:.:. .:. :.. :.	
E_cadherin	420	-GGQFVVTTNPVNNDGILKTAKGLDFEAKQQYILHVAVTNVVPFEVSL--	466
VE-cadherin	349	MSPPAGNRAQVIINITDVDEPPIFQQPFYHFQLKEN----QKKPLIGTVL	394
	:. .: : : .:. . : .:. . .:. :.. : : .:.	
E-cadherin	467	----TTSTATVTVDVLDVNEAPIFVPPEKRVEVSEDFGVGQE---ITSYT	509

Figure 32 : Extraits de l'alignement des séquences de la VE-cadhérine humaine et de la E-cadhérine humaine (données non publiées).

Les zones surlignées en jaune indiquent les sites de clivage de LasB dans la séquence de la VE-cadhérine.

De manière plus générale, les séquences de ces deux protéines sont très différentes. En effet, elles ne partagent que 28% d'identité et 40% de similarité (données non publiées).

La VE-cadhérine est une protéine beaucoup plus labile (*i.e.* instable, plus facilement détachable) que la E-cadhérine. Cette propriété est exploitée par les neutrophiles au cours de l'inflammation. Il est possible que *P. aeruginosa* ait évolué pour exploiter elle aussi cette propriété de la VE-cadhérine.

Il est envisageable de penser que le clivage de la VE-cadhérine soit le résultat d'une coévolution entre l'être humain et *P. aeruginosa*. Le sang est probablement un environnement stressant pour la bactérie, notamment en raison de la présence de cellules de l'immunité innée et adaptative. Le clivage de la VE-cadhérine est peut-être le résultat d'une adaptation évolutive des bactéries pour s'évader du système sanguin. En revanche, le clivage de la E-cadhérine pourrait ne pas représenter un avantage évolutif aussi important. Si l'on prend l'exemple des infections pulmonaires à *P. aeruginosa*, l'intérieur des alvéoles pulmonaires représente un terrain propice à la prolifération bactérienne sous forme de biofilm (notamment chez les patients atteints de mucoviscidose). Les bactéries pouvant perdurer sur de longues périodes dans cet environnement, il est possible qu'elles n'aient pas eu besoin de développer de mécanismes performants leur permettant de s'en évader.

h. Dégradation des jonctions par d'autres pathogènes bactériens

Comme il a été décrit dans le Chapitre V, de nombreux pathogènes prennent pour cible les jonctions cellulaires au cours de l'infection. Dans la majorité des cas, ce sont les jonctions serrées qui sont prises pour cible, que ce soit par des toxines sécrétées dans le milieu extracellulaire, ou des toxines injectées dans les cellules eucaryotes. L'interaction avec les jonctions peut également être liée à l'internalisation de la bactérie : les jonctions peuvent soit servir de récepteurs permettant l'entrée de la bactérie dans la cellule, soit être ciblées une fois que les bactéries sont à l'intérieur de la cellule (Bonazzi and Cossart, 2011).

Certains pathogènes ont également la capacité de prendre pour cible les jonctions adhérentes des cellules eucaryotes. La plupart de ces pathogènes sont des pathogènes intestinaux, qui peuvent induire un clivage direct ou indirect de la E-cadhérine des cellules épithéliales (voir Chapitre V.B.b).

En revanche, le ciblage de la VE-cadhérine des cellules endothéliales est un phénomène peu documenté. Certains pathogènes, tels que *S. aureus*, peuvent induire un clivage de la VE-cadhérine par suractivation de la protéase de l'hôte ADAM10, mais ce clivage n'est pas spécifique des cellules endothéliales, puisqu'il est aussi retrouvé pour la E-cadhérine des cellules épithéliales.

Très peu de pathogènes sont donc capables de cibler spécifiquement la VE-cadhérine. Une exception notable à cette situation est le pathogène *N. meningitidis*, une bactérie pouvant provoquer des méningites. *N. meningitidis* est capable de franchir la barrière hémato-encéphalique au cours de l'infection. Pour cela, elle utilise une voie paracellulaire par ouverture des jonctions cellulaires, en induisant une délocalisation de certaines protéines des jonctions, parmi lesquelles la VE-cadhérine (voir Figure 33) (Coureuil et al., 2013).

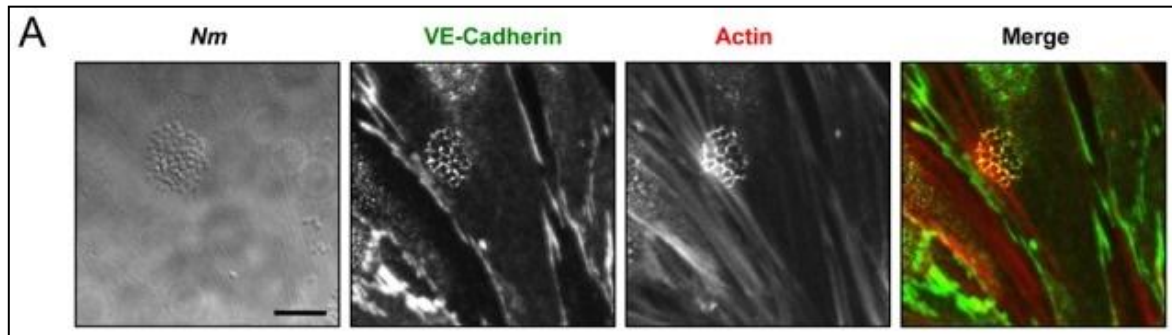


Figure 33 : Recrutement de la VE-cadhérine et de l'actine par *N. meningitidis*. La VE-cadhérine est délocalisée des jonctions vers le site d'adhésion de *N. meningitidis* (Coureuil et al., 2009)

A l'heure actuelle, le clivage direct de la VE-cadhérine par une protéase bactérienne n'a été décrit que pour *P. aeruginosa*. Des études additionnelles sont nécessaires pour déterminer si ce mécanisme est employé par d'autres pathogènes bactériens. Les agents responsables de bactériémies constituent de bons candidats pour ces futures études.

Chapitre VII : Franchissement de la barrière épithéliale par *P. aeruginosa*

A. Introduction

Bien que les cellules épithéliales soient le modèle cellulaire classiquement utilisé pour étudier l'interaction entre *P. aeruginosa* et des cellules eucaryotes, nous ne disposons à l'heure actuelle que de peu de données sur la méthode employée par ce pathogène pour franchir l'épithélium au cours de l'infection aiguë. Pourtant, l'épithélium est la première barrière tissulaire à laquelle *P. aeruginosa* est confrontée dans la majorité des infections. De plus, il apparaît clairement que *P. aeruginosa* dispose de la capacité de franchir cette barrière, comme l'atteste la proportion élevée de bactériémies à *P. aeruginosa* non associées à des cathéters constatées en milieu hospitalier (voir Tableau 1 et Figure 5).

Plusieurs groupes ont démontré que l'injection des toxines du SST3 est impossible du côté apical des cellules épithéliales (Fleiszig et al., 1997; Lee et al., 1999). Par conséquent, il est très probable que *P. aeruginosa* ait développé des mécanismes pour accéder au domaine basolatéral des cellules. Nous avons montré dans le Chapitre VI que la protéase LasB de *P. aeruginosa* est capable d'induire une ouverture des jonctions intercellulaires endothéliales. Nos résultats suggèrent que cette ouverture des jonctions permet l'accès des bactéries au domaine basolatéral des cellules endothéliales. Il est important de noter que la E-cadhérine des cellules épithéliales est résistante à cette activité de protéolyse, suggérant que *P. aeruginosa* utilise un mécanisme différent pour franchir l'épithélium.

Alors que *P. aeruginosa* est considérée comme un pathogène extracellulaire, de nombreuses études mettent en évidence sa capacité à être internalisée dans les cellules épithéliales (voir Tableau 3). A l'heure actuelle, nous ne savons pas si le franchissement de la barrière épithéliale s'opère par une voie transcellulaire, comme pourraient le suggérer ces études, ou par une voie paracellulaire. Cette dernière théorie est soutenue par un nombre restreint d'études (Heiniger et al., 2010; Soong et al., 2008).

Afin d'étudier ce mécanisme de franchissement de la barrière épithéliale par *P. aeruginosa* au cours de l'infection aiguë, j'ai mis en place un modèle d'étude par microscopie confocale à fluorescence, me permettant d'étudier les différents processus et la cinétique de l'infection.

L'étude de la transmigration de *P. aeruginosa* à travers un modèle *in vitro* d'épithélium a été réalisée à l'aide de deux modèles cellulaires : des A549, qui sont des cellules non polarisées, et des MDCK, qui forment une monocouche de cellules polarisées.

Notre étude révèle que seul les pili sont nécessaires à l'invasion d'une monocouche de cellules épithéliales non polarisées (A549). En revanche, l'action coordonnée du flagelle, des pili et du SST3 est nécessaire pour la transmigration des cellules polarisées (MDCK). Pour ce type cellulaire, le franchissement de la monocouche de cellules est un événement rare, qui s'opère en quelques points précis correspondant à des sites de divisions ou de morts cellulaires. Ces résultats suggèrent que, comme d'autres pathogènes bactériens, *P. aeruginosa* est capable d'exploiter des hétérogénéités dans l'épithélium pour accéder aux tissus sous-jacents.

Il a été observé qu'après transmigration, les bactéries disséminent horizontalement au niveau de la lame basale. Les facteurs clés de virulence dans ce processus sont les pili, le flagelle et le SST3. Nous démontrons dans cette étude que l'injection des toxines du SST3 s'opère au fur et à mesure de la progression des bactéries sous les cellules, et que cette injection induit une disparition des contacts focaux et des filaments d'actine des cellules. Les toxines du SST3 auraient donc pour effet de détacher les cellules de la lame basale, facilitant ainsi la progression des bactéries.

En conclusion de cette étude, nous proposons un nouveau modèle d'infection de l'épithélium par *P. aeruginosa*, dans lequel la voie paracellulaire est favorisée au détriment de la voie transcellulaire.

B. Manuscrit soumis pour publication

***Pseudomonas aeruginosa* Transmigrates at Epithelial Cell-Cell Junctions, Exploiting Sites of Cell Division and Senescent Cell Extrusion**

Guillaume Golovkine^{1,2,3,4}, Eric Faudry^{1,2,3,4}, Stéphanie Bouillot^{1,2,3,4}, Sylvie Elsen^{1,2,3,4}, Ina Attrée^{1,2,3,4} and Philippe Huber^{1,2,3,4,*}

¹University Grenoble Alpes, Grenoble, France

²CNRS, ERL5261, Grenoble, France

³CEA, iRTSV-BCI, Grenoble, France,

⁴INSERM, U1036, Grenoble, France

*Corresponding author: E-mail: phuber@cea.fr

Short title: *P. aeruginosa* Transmigration at Cell-Cell Junctions

Abstract

Transmigration across epithelial barriers is a critical and challenging step for bacterial pathogens to achieve systemic infection. This is particularly true for opportunistic pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa*, a causing agent of nosocomial infections. Despite extensive study, the exact mechanisms used by this bacterium to transmigrate across epithelial tissues, as well as the entry sites it uses, remain speculative. Here, using real-time microscopy and a model epithelial barrier, we show that *P. aeruginosa* employs a paracellular route to transmigrate, taking advantage of altered cell-cell junctions at sites of cell division or when senescent cells are expelled from the cell layer. Once a bacterium transmigrates, it is followed by a cohort of bacteria that uses the same entry point. The basal compartment is then invaded radially from the initial penetration site. Effective transmigration and propagation require type 4 pili, the type 3 secretion system (T3SS) and a flagellum, although flagellum-deficient bacteria can occasionally invade the basal compartment from wounded areas. In the basal compartment, the bacteria inject the T3SS toxins into host cells, disrupting the cytoskeleton and focal contacts, and making their progression under the cells possible. Thus, *P. aeruginosa* exploits intrinsic host cell processes to breach the epithelium and invade the subcellular compartment.

Author Summary

In normal situations, the mucosae constitute efficient barriers against the invasion of opportunistic pathogens. The bacteria inducing nosocomial infections take advantage of pre-existing pathological situations to cross the epithelium and spread in deeper tissues. The conditions on the host side permitting transmigration and the combination of virulence factors used by the bacteria to transmigrate are mostly speculative. Here, we studied the transmigration process of *Pseudomonas aeruginosa*, a bacterium causing hospital-acquired acute and chronic infections. We found that bacteria exploits weakened cell-cell junctions of the epithelium, such as those generated at sites of cell division or when dying cells are extruded from the cell layer, to breach the cell layer, using specific virulence factors and motility appendages.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a major opportunistic bacterial pathogen associated with nosocomial infections. It is the principal agent responsible for mortality in cystic fibrosis patients and one of the main bacteria linked to hospital-acquired infections, particularly infections sustained after the placement of therapeutic devices such as ventilators, blood or urinary catheters. With acute infections, *P. aeruginosa* can disseminate from the initial site of infection across tissue barriers to induce bacteremia and systemic infection [1].

Healthy people are resistant to *P. aeruginosa* infection, even though this bacterium is present in the environment and in the human digestive and respiratory tracts, and despite its arsenal of virulence factors. This resistance suggests that the epithelial barriers together with the action of immune cells constitute efficient protection mechanisms. Indeed, several groups have shown that the apical domain of epithelial cells, when assembled in monolayers, is refractory to intoxication by *P. aeruginosa*, which could explain why people with uninjured tissues are resistant to infection [2-4].

In which conditions *P. aeruginosa* may use its virulence and motility capacities to breach the body barriers remains elusive. Internalization of *P. aeruginosa* in non-phagocytic cells is known to be facultative. In epithelial monolayers, it has been proposed that the transformation of a sub-domain of the apical cell surface into a basolateral-like domain allows bacterial uptake [5, 6], which is in favor of a transcellular route of transmigration. However, the whole transmigration process and the required conditions for its achievement have never been clearly characterized.

In this paper, we investigated *P. aeruginosa* transmigration across polarized epithelial monolayers using real-time 3-dimensional microscopy. Our results indicate that bacteria transmigrated using paracellular routes at very specific points: sites of cell division or cell death, where intercellular junctions are temporarily discontinuous. No internalization was observed, thus precluding a transcellular transmigration route. Time-course experiments showed that bacteria induced cell rounding only once they had gained access to the cells' basolateral domain. Bacterial progression below the cells was possible after disruption of the cytoskeleton and focal contacts upon toxin injection, and the entire process was shown to require functional pili, the T3SS and the flagellum.

Results

Spacio-temporal visualization of *P. aeruginosa* transmigration across epithelial monolayers.

In this paper, we investigated *P. aeruginosa* (strain CHA labeled with mCherry) transmigration across epithelial monolayers (EGFP-labeled confluent MDCK cells). MDCK monolayers are formed by polarized cells with continuous tight junctions (S1A Fig.). After infection, 3D confocal microscopy images of bacteria and MDCK cells were acquired for 7 hours at different locations on the cell monolayer. Bacteria were observed to transmigrate at specific sites and to propagate radially below the cell layer (Fig. 1A and S1 Movie). Transmigration was consistently seen to occur via a paracellular route (i.e. through cell-cell junctions), first by a single bacterium, then rapidly followed by a cohort of bacteria. Conversely, A549 cell layers, formed by non-polarized cells with discontinuous tight junctions (S1B Fig.), were penetrated at many different points, also via paracellular routes (Fig. 1B and S2 Movie). Thus, intercellular junctions appear to be the bottleneck restricting *P. aeruginosa* transmigration.

To determine the rate of penetration, the number of bacteria in the basal compartment was quantified at different time points, in 10 microscopy fields per condition, and was expressed as a function of hours-post-infection (hpi) (Fig. 1C,D). Transmigration across MDCK layers started at approximately 3.5 hpi and reached a peak at 6.5 hpi (Fig. 1C; selected images are shown in S2A Fig.). In contrast, transmigration across A549 cells started at 2 hpi and reached a peak at 4 hpi (Fig. 1D), confirming the permissiveness of A549 cell layers. After bacteria invasion, the cells detached from the coverglass and bacteria were released back into the supernatant, which explains why the number of bacteria decreased in the basal compartment at later time points (Fig. 1C,D). These results were confirmed with *P. aeruginosa* strain PAK applied to MDCK cells (S2B Fig.).

We next wished to determine which bacterial components were involved in the transmigration process. Recently, Heiniger et al. showed that type 4 pili (hereafter called pili) and its type 3 secretion system (T3SS) are required for this bacterium to cross an epithelial barrier by potentially interacting with exposed basolateral surfaces [3]. However, analysis of the infection process was observed on fixed samples and the sequence of events leading to initial barrier disruption and bacterial transmigration was lacking. We therefore examined by real-time microscopy whether isogenic mutants defective in the T3SS ($\Delta pscF$), the flagellum ($\Delta fliC$) or pili ($\Delta pilY1$) could transmigrate across epithelial layers. None of the mutants was able to transmigrate across MDCK layers (Fig. 1C). In contrast, while pili deficiency abolished transmigration across A549 cell layers, lack of the flagellum or the T3SS was less detrimental with this cell line (Fig. 1D), even though it greatly reduced the transmigration efficiency. Thus, only pili are absolutely required for transmigration with a permissive epithelium, whereas all three factors are required to cross a polarized epithelium.

These mutant strains were also used to study the link between bacterial transmigration and cell retraction, a typical effect of ExoS or ExoT injection [7-10]. MDCK cells exhibited

retraction upon infection with the wild-type strain, while the pili mutant did not induce cell retraction; a slight retraction could be observed with the T3SS and flagellum mutants at late time points (Fig. 1E and S2A Fig.). However, this faint effect was not characteristic of the T3SS-induced cell retraction, but was related to intercellular junction remodeling (arrowheads in S2A Fig.). A549 cells also retracted when infected with the wild type strain, and to a lesser extent when infected with the flagellum-deficient strain. The T3SS and the pili mutants did not induce any retraction (Fig. 1F), indicating that junction remodeling did not occur in this model.

Altogether, the results demonstrate that transmigration, when possible, consistently occurs at cell-cell junctions. In epithelium with sealed junctions, mimicking *in vivo* epithelia, the pili, the T3SS and the flagellum are all required to initiate transmigration.

Bacterial transmigration occurs at sites of host cell division or cell death.

We next wished to determine the initiating factors in this process. As MDCK monolayers are a good model of physiological epithelia, we therefore used these cells for further studies. By closely examining all the transmigration events occurring with MDCK monolayers, we observed that bacteria can use clefts formed between daughter cells upon cell division (Fig. 2A). Like in Fig. 1A, transmigration first involves a single bacterium penetrating the cleft, rapidly followed by a group of bacteria attracted to the transmigration site (Fig. 2A). Less frequently, bacteria were also observed to transmigrate at sites where senescent cells had been expelled from the monolayer (see below). Transmigration sites were observed for 5 hours on 48 microscopic fields, representing 28,000 cells, and were classed as sites of cell division, cell death or unknown - when the phenomenon was ambiguous (Fig. 2B). The results show that cell division and cell death are the major, probably only, permissive events allowing bacterial transmigration. Transmigration occurred mainly and more rapidly at cell division sites, and was less frequent and occurred later at cell extrusion sites (Fig. 2B).

Transmigration remained a rare event, and many sites of cell division or death were not exploited by bacteria for transmigration (Fig. 2C), suggesting that other, as yet undiscovered, parameters may contribute to the transmigration process. To determine whether the presence of bacteria alters cell division or cell senescence rates in the MDCK monolayer, we compared the number of dividing and dying cells in uninfected and infected conditions until 3 hpi, i.e., before massive intoxication with the T3SS toxins (Fig. 2D,E). In this time frame, the presence of bacteria neither affected cell division nor senescence rates, indicating that bacterial transmigration at specific sites is an opportunistic rather than an instrumental event.

The fact that specific cellular processes are linked to transmigration events suggests particularities of the intercellular junctions at these positions. To more precisely analyze the cell-cell junctions during cell division and cell death, we used MDCK cells expressing E-cadherin-EGFP. During cell division, these cells revealed minute interruptions in E-cadherin staining between dividing cells, which bacteria exploited to penetrate the epithelial layer (Fig. 2F,G and S3 Movie). In the case of cell death, senescent cells were extruded from the monolayer while adjacent cells formed new junctions below the cell being expelled, as

previously reported [11]. Like with cell division, gaps in E-cadherin-EGFP labeling were observed in the newly-formed junctions (Fig. 2H and S4 Movie) and bacteria availed of these to gain access to the sub-epithelium. Thus, *P. aeruginosa* exploits natural weaknesses in the epithelial monolayer to gain access to the basal domain.

T3SS-dependent intoxication allows bacterial progression under the cells.

To establish a sequence of events in the transmigration process, we observed T3SS-induced cell retraction together with bacterial accumulation in the basal compartment in time-lapse microscopy. The curve representing average cell retraction (Fig. 3A) is shifted to the right, or later time points, compared to the average transmigration curve. This shift was consistently observed for each location analyzed and in two additional independent experiments (data not shown). Thus, cell retraction appears to occur when bacteria have already gained access to the basal compartment.

To visualize toxin injection, we used a previously reported system [12], in which bacteria secrete an ExoS toxin- β -lactamase (Bla) fusion protein (ExoS-Bla), and MDCK cells are loaded with CCF2, a bifluorescent β -lactamase substrate. With this system, toxin injection is revealed by cleavage of CCF2 by ExoS-Bla, shifting cellular fluorescence from green to blue (Fig. 3B). Blue fluorescence was only detected at and around transmigration sites, and was particularly intense in cells close to the entry site (Fig. 3C and S5 Movie). The fluorescence shift was observed to expand radially, in line with bacterial propagation under the monolayer. The leading edges of bacterial migration were seen to consistently correlate with the positions of the outermost injected cells (Fig. 3C). The percentage of bacteria in the basal compartment within areas containing infected cells (i.e., blue cells) was 80%; this percentage increased to 93% when the areas were increased by 15 μm (Fig. 3D), confirming the correlation between bacterial progression under cells and toxin injection. These observations strongly suggest that cells were injected by bacteria located in the basal compartment to allow their progression. Bacterial aggregates were also noted close to the cell surface, but their positions did not correspond to transmigration sites (Fig. 3C).

To further examine the molecular events involved in bacterial propagation and how they correlate with toxin injection, we analyzed the biological effects of the toxins on the cytoskeleton and focal contacts in real-time. To do this, the actin cytoskeleton or the focal contacts were labeled by transfecting MDCK with either Lifeact-GFP or vinculin-GFP, respectively, and the basal compartment was observed by total internal reflectance fluorescence (TIRF) videomicroscopy. As previously reported [7, 8], toxin injection caused disruption of actin fibers and focal contacts (Fig. 4A,B and S6 and S7 Movies). Bacteria only progressed below the cells after these two cellular components had been eliminated, suggesting that toxin injection took place when bacteria were still located at cell edges rather than directly under cells. The disruption of the cytoskeleton and focal contacts then facilitated bacterial propagation, as indicated by the arrowheads in Fig. 4A,B.

Bacterial infiltration below the cells was also visible as a loss of fluorescence in the green channel (when cells are intracellularly labeled with EGFP) at the basal side of the cell (S3

Fig.), suggesting that bacteria raised the basal membrane. Fluorescence was restored once the bacteria had moved away (S3 Fig.), indicating that cells subsequently recovered their initial basal geometry, before the final event of cell rounding and detachment.

Bacterial migration under epithelial cells requires pili, T3SS and the flagellum. To analyze the effects of mutations of pili, the T3SS or the flagellum on bacterial migration under cells independently of transmigration across the epithelial layer, we generated an artificial wound in the MDCK layer prior to bacterial exposure and analyzed how bacteria progressed from this wound in real-time. Mutants lacking pili never gained access to the basal compartment, while the T3SS and the flagellum mutants had severely reduced invasion capacities (S4 and 5A Figs.). Thus, all three factors are required for motility below the cell layer. Interestingly, bacteria without a flagellum were present in the wound in much smaller numbers than the other strains (S4B Fig.), suggesting an altered capacity to reach the wound. Even when present in the wound, invasion by this mutant was highly variable (S4B Fig.), suggesting that it is a stochastic phenomenon. These observations hint that the flagellum plays an important role in migration to a point of weakness in the epithelial layer, and in its exploitation.

Bacterial migration under the cells is related to twitching motility. We next investigated which characteristics of *P. aeruginosa* were necessary for migration under the epithelium. Pili-dependent twitching movement has been described as a type of collective migration when *P. aeruginosa* motility is studied under agar [13]. Here, bacteria initially migrated individually below epithelial cells, rapidly followed by cohorts of bacteria migrating together as rafts (S8 Movie). The leading bacterium progressed below the cells or under intercellular junctions, while the trailing bacteria within rafts migrated essentially below intercellular junctions.

The instantaneous velocities of bacteria were measured on several trajectories at the initial stages of bacterial migration (4-5.5 hpi) and at later time points (beyond 7 hpi) (Fig. 5B). The median velocity values significantly progressed between these two time frames from 2.2 to 6.7 $\mu\text{m}/\text{min}$, and are consistent with the median velocity reported for twitching under agar: $\sim 3.5 \mu\text{m}/\text{min}$ [13]. Interestingly, the few flagellum-deficient bacteria that penetrated the basal compartment in transmigration experiments at late time points (7 hpi) (S9 Movie), or in the wound assay (data not shown), had a comparable median velocity to wild-type cells ($\sim 4 \mu\text{m}/\text{min}$) (Fig. 5C), but only progressed under the cells as individual bacteria. This observation suggests that migration in rafts requires the flagellum.

These results indicate that the motility of *P. aeruginosa* beneath the epithelial cell layer involves a pili-dependent twitching mechanism, but collective behavior, including the formation of rafts, requires the presence of the flagellum.

Discussion

To date, the precise mechanisms through which *P. aeruginosa* breaches the epithelial barrier remain unknown. The fact that *P. aeruginosa* infection occurs in already established pathological settings suggests that specific biological events are required to facilitate bacterial dissemination. The results presented in this paper, based on a model epithelial barrier, provide new clues as to how *P. aeruginosa* transmigrates across an epithelium, and new information on the characteristics of its behavior in the basal compartment.

One of the major results of this study was the demonstration that *P. aeruginosa* uses a paracellular route to transmigrate, without the need of internalization in the cells. In the tens of movies generated for this study, no bacterial internalization was observed, thus eliminating a transcellular route. The paracellular route across epithelia is not commonly employed by bacterial pathogens, which mainly use the transcellular route, but has also been described as the means *Neisseria meningitidis* uses to cross the blood-brain barrier [14].

P. aeruginosa internalization by epithelial cells has been described in several studies, most of which using an antibiotic protection assay [15-17]. However, the antibiotic protection assay may not be a relevant method to evaluate bacterial uptake by host cells as a recent report shows that bacterial aggregates forming at the apical surface of cells are resistant to antibiotic treatment [18]. Other groups reported electron microscopy images showing bacterial uptake in epithelial cells [19-21]. It is thus possible that cellular models other than MDCK or A549, or other infection conditions would be more appropriate to assess bacterial internalization.

Here, we showed that *P. aeruginosa* transmigration across MDCK layers takes place at sites of cell division and cell extrusion, but that bacteria exploit less than 5% of these occurrences. One explanation for this observation might be statistical: there may be a low probability that patrolling bacteria would encounter cell-cell junctions in the apposite temporal window. Alternatively, it is possible that not all division or extrusion sites are permissive to bacteria, but that this process is controlled by other host factors (see below). In the time-frame of our experiments, there was no specific induction of cell division or senescence by the pathogen, indicating that it is not a strategy initiated by *P. aeruginosa* to facilitate access to the sub-epithelium.

Although the entry site, once used by a leading bacterium, subsequently attracted many swimming bacteria, how bacteria are attracted so efficiently below the cells remains a major unsolved question and deserves further investigation. Conversely, the formation of immobile bacterial aggregates at the apical cell surface never triggered transmigration. Furthermore, bacterial aggregates did not specifically accumulate around transmigration sites. These two phenomena are therefore probably independent.

Interestingly, A549 monolayers, which establish immature cell-cell junctions, were highly permissive to bacterial penetration, indicating that adhesive proteins located at intercellular junctions constitute a main defense against bacterial dissemination. In agreement with these

findings, E-cadherin, the major adhesive protein of adherens junctions promoting cell-cell interaction is not affected by the proteases secreted by *P. aeruginosa* [22-24]. In contrast, vascular endothelial (VE)-cadherin, expressed in vascular endothelia, is a substrate of *P. aeruginosa*'s elastase, LasB, making the vascular barrier vulnerable to invasion [23].

In this study, we observed interrupted E-cadherin junctions between dividing MDCK cells which were exploited by bacteria for transmigration. Imperfect sealing following division may be a rare phenomenon, which would explain why transmigration occurs at such a low rate. Alternatively, given that T3SS-deficient bacteria were unable to transmigrate, the bacterium may take advantage of exposed lateral membranes to inject T3SS toxins, eventually leading to loss of cell-cell contacts.

In cell monolayers, senescent cells are apically extruded. E-cadherin and tight junctions are lost by the apoptotic cells [25-28], but the neighboring cells rapidly move in to seal the gap. In this location, active junction remodeling takes place and persists for hours [11]. Here, we noticed that E-cadherin labeling was interrupted in the newly-formed junction, allowing bacterial penetration. Further work will be needed to determine whether the gap exploited by bacteria for transmigration during cell division is pre-existing or triggered by the bacteria.

In systemic infections, *P. aeruginosa* mainly enters through the epithelium of lung alveoli. In normal situations, the alveolar epithelium is a slow proliferating cell population, while in situations of injury, a considerable raise in proliferation rate has been reported, following elimination of injured cells [29, 30]. Thus, opportunities of mucosal penetration by bacteria may exist in these situations. However, the precise mechanisms of cell extrusion and cell division in this organ, particularly at the level of cell junctions, are unknown and constitute a major hurdle to our understanding of *P. aeruginosa* dissemination.

Bacterial transmigration across MDCK layers requires the T3SS, the pili and the flagellum; propagation below the monolayer involves the T3SS and the pili, whereas the flagellum is only necessary for optimal invasion. As previously reported, *P. aeruginosa* does not inject T3SS toxins into the apical domain of epithelial cells, like most Gram-negative bacterial pathogens [31]. The cell's basolateral domain must be accessible for pili-dependent bacterium-host cell contact to allow T3SS toxin injection. Therefore, it is not surprising that the T3SS and the pili mutants exhibited similar transmigration- and propagation-defective phenotypes.

Bacterial propagation under cells is correlated with toxin injection and is followed by disruption of the cytoskeleton and focal contacts. The toxin effect may be a pre-requisite for bacterial propagation, as the absence of T3SS abolished invasion in the wound assay. Furthermore, bacteria only penetrated underneath the cells once actin fibers and focal contacts had been abolished, which can be easily explained by the need for the bacterium to lift the cell's basal membrane in order to progress. Interestingly, the flagellum mutants were only present in small numbers in wounds in the invasion assay, preventing efficient incursion into the basal compartment, while the other strains accumulated in this location whether or not

they invaded the cell layer. The flagellum is thus needed to reach points where invasion opportunities are available. Although delayed compared to the wild-type strain, the flagellum-deficient bacteria progressed with comparable speed under the cells in some locations, demonstrating that this motility parameter is independent of the flagellum.

In terms of speed and raft formation, the characteristics of wild-type bacterial migration under cells was similar to what has been described under agar [13], except that the leading bacteria migrated individually before assembling into rafts. Importantly, although the role of the flagellum in collective migration currently remains obscure, the flagellum-deficient bacteria never formed rafts. It is thus possible that flagella may be required for collective migration under cells.

Based on the main data presented in this paper, we propose a model (Fig. 6) in which the major opportunity for bacteria to transmigrate is to take advantage of either the cell division sites or sites of senescent cell extrusion. At these specific sites, junctional sealing is imperfect or the basolateral membranes are exposed allowing toxin injection, eventually leading to bacterial infiltration and access to the basal compartment. Once beneath the cell layer, the T3SS toxins induce cell rounding and detachment from the extracellular matrix, promoting rapid bacterial propagation below cells. When an entry site is found, numerous bacteria rush in and rapidly undermine the epithelium.

In conclusion, this paper describes a chronological view of *P. aeruginosa* transmigration across a model epithelium. The bacteria exploit rare, specific characteristics of the monolayer to breach the barrier at intercellular junctions and to propagate underneath it, employing at least three virulence factors: the T3SS system, pili and the flagellum.

Materials and Methods

Genetic constructions.

Replicative pIAPX2mCherry plasmid derived from pIAPX2 (32) by replacing the *gfp* reporter gene fused to constitutive and strong *pX2* promoter by mCherry coding sequence. The *pX2-mCherry* fusion was subcloned into mini-CTX integrative plasmid leading to miniCTXpX2mCherry plasmid.

P. aeruginosa strains and culture.

The strains and the plasmids used in this study are described in S1 Table. The bacteria of CHA strain secrete ExoS, T and Y through their T3SS, and exhibit functional pili and flagellum [32-34]. CHA Δ *pilY1* and CHA Δ *fliC* were checked for defective twitching and swimming, respectively (data not shown) and CHA Δ *pscF* was previously shown to have impaired T3SS toxin secretion [34]. All strains were transformed with pIAPX2-mCherry plasmid for fluorescence imaging. Bacteria were grown in liquid LB medium at 37°C with agitation until the cultures reached an optical density value of 1.0 to be in the exponential growth phase.

Cell culture and infection.

A549-EGFP and MDCK-EGFP cells were grown in RPMI and DMEM medium, respectively, supplemented with 10% fetal calf serum (all from Invitrogen). For videomicroscopy experiments, cells were seeded at 2,500 cells per mm² on Labtek II 8-chambered (Thermo Fisher Scientific) coverslips and used 72 h later to obtain highly confluent monolayers. Medium was replaced 16 h before infection with fresh medium, and 1 h before infection with fresh non-supplemented medium. Cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 15 (unless otherwise indicated) and immediately observed by videomicroscopy.

Cell transfection.

The plasmid coding for Lifeact-EGFP (Fig. 4A) was obtained from Roland Wedlich-Soldner. The vinculin-GFP plasmid (Fig. 4B) was from H el ene Delano -Ayari. MDCK cells were transfected with expression plasmids using Lipofectamin 2000 (LifeTechnologies) 48 h prior to infection. The medium was replaced 24 h before infection with fresh medium. MDCK cells expressing Ecad-GFP were a gift from René-Marc Mege.

Visualization of bacterial transmigration and cell retraction during infection.

A549-EGFP and MDCK-EGFP cells were grown as described above, and were infected by CHA-mCherry. Bacterial transmigration was observed by confocal microscopy for 6 hours, with time points every 15 min. Successive planes in 3D stacks were taken every 0.4 μ m. Out-of-focus information in confocal images was removed using the restoration module from Volocity (PerkinElmer). Iterative deconvolution was performed with calculated point spread function. 3D-reconstructions of confocal time-lapse were performed using the 3D VTK module from Icy software.

For quantitative analysis of bacteria transmigration (Fig. 1C,D) and cell retraction (Fig. 1E,F), 4 different mCherry transfected-strains were filmed in parallel. For each strain, 10 randomly chosen positions were imaged as above. The infection was filmed for 7.5 h, with time points every 15 min. To minimize the acquisition time, only the basal part of the cells was imaged (11 z-planes). For bacteria counting, only the z-sections where transmigrated bacteria were on focus were used. Images were binarized and bacteria were counted using ImageJ software. For cell retraction quantification, projections of the 5 lowest z-sections of A549-EGFP or MDCK-EGFP confocal images were generated. The projections were then binarized and the total cell surfaces were calculated for each image.

Quantification of cell division and cell death.

MDCK-EGFP were grown as described above. One hour prior to experiment, medium was replaced with fresh non-supplemented medium and nuclei were labeled with Hoechst 33342 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final concentration, Sigma-Aldrich). Nuclei and bacteria were filmed every 15 min with a confocal microscope and a 20X air objective. 48 fields were filmed in parallel, at 16 z-planes separated by 1 μm . Nuclei were counted on the first time point using ImageJ. Transmigration sites were scored visually, and classified according to their properties (i.e. cell division or cell death) (Fig. 2B). Cell divisions and cell deaths were scored visually for the first 3 hours of infection (Fig. 2C). Comparison of cell division numbers in infected and non-infected conditions was performed in another set of experiment, in which 24 infected fields and 24 non-infected fields were imaged in parallel. Cell division and cell death were scored visually for the first 3 hours of infection (Fig. 2D,E).

Visualization of E-cadherin labeling at transmigration sites.

MDCK Ecad-GFP were grown as described for MDCK-EGFP. One hour prior to experiment, medium was replaced with fresh non-supplemented medium and nuclei were labeled with Hoechst 33342. Then, cells were infected by CHA-mCherry. Bacterial transmigration was observed by confocal microscopy for 6 hours, with time points every 15 min, at 40 z-planes separated by 0.4 μm .

Correlation between bacteria transmigration and toxin injection.

Protocol for CCF2/AM loading was adapted from previous studies to be used in real-time microscopy [12]. Briefly, after 3 h of infection with CHA $\Delta\text{exoS-Sbla}$ -mCherry, cells were washed with PBS containing 2.5 mM probenidicid, and incubated with freshly prepared CCF2-AM solution (2 μM final concentration, LiveBLAzer™ FRET - B/G Loading Kit, Life Technologies) for 90 min in the dark at room temperature. Then, cells were carefully washed twice with PBS-2.5 mM probenidicid. Fluorescence images were acquired with a wide-field microscope as described below. Images of bacteria were also captured, either on the basal (i.e. transmigrated bacteria) or on the apical side of MDCK. To distinguish between these two populations of bacteria in merged images, transmigrated bacteria were given a red artificial color, whereas bacteria on the apical side were colored in yellow (Fig. 3C).

To determine whether bacteria in basal compartment are located below injected or uninjected cells, 12 fields exhibiting injected cells were acquired by wide-field microscopy. For each

field, the red channel (bacteria) was binarized, and the total number of transmigrated bacteria was measured using ImageJ. On the same images, the blue channel (cleaved CCF2) was binarized, and a mask corresponding to the zone of injected cells was generated. The number of bacteria in the mask was calculated. As the CCF2 fluorescence shift is delayed compared to bacterial propagation under cells, the number of bacteria surrounding the blue cells was also measured in the same mask dilated of 15 μm (Fig. 3D).

Measurement of bacterial propagation from a wound in the epithelial monolayer.

Cells were grown as indicated above. One hour prior to infection, the monolayer was scratched with a sterile 10- μL pipette tip across the well median. The well was then washed twice with fresh non-supplemented medium.

Wounded MDCK-EGFP monolayers were infected with 4 mCherry transfected-strains in parallel (S4 Fig.). For each strain, 8 positions were imaged by confocal microscopy. The infection was filmed for 6 hours, with time points every 10 min. Only the basal part of the cells was imaged (11 z-planes separated by 0.4 μm). The surface occupied by bacteria under MDCK was measured using ImageJ. Briefly, for each time point, a polygon representing the area invaded by bacteria under the cells was manually drawn. Its surface was then measured and compared to the total cell surface minus the wounded area (Fig. 5A).

Tracking of transmigrated bacteria.

MDCK-EGFP were infected with CHA-mCherry. After 4 h of infection, early transmigration sites were localized visually on a confocal microscope and bacteria propagation from these sites was filmed for 1.5 h every 30 s (S8,9 Movies). Tracking of bacteria at the propagation leading edge was performed using the MTrackJ plugin of ImageJ. The instantaneous velocities were measured (Fig. 5B,C). Only tracks of more than 20 μm were considered.

Confocal microscopy.

For fluorescence time-lapse microscopy, cells were imaged using a confocal spinning-disk inverted microscope (Nikon TI-E Eclipse) equipped with an Evolve EMCCD camera. The optical sectioning was performed by a Yokogawa motorized confocal head CSUX1-A1. Images were acquired using an illumination system from Roper Scientific (iLasPulsed) with a CFI Plan APO VC oil immersion objective (60X, N.A 1.4) or CFI Plan Fluor oil immersion objective (40X, N.A. 1.3). Z-series were generated using a motorized Z-piezo stage (ASI) by acquiring images with a step size of 0.4 μm . Microscope was controlled with MetaMorph software (Molecular Devices). Temperature, CO₂, and humidity control was performed using a chamliide TC system (TC-A, Quorum technologies). Solid-state 405, 491 and 561 nm lasers (iLas, Roper Scientific) and ET 460/50M (Chroma), ET 525/50M (Chroma), FF01-605/54 (Semrock) emission filters were used for excitation and emission of Hoechst 33342, EGFP and mCherry fluorescence, respectively.

Wide-field videomicroscopy.

Labtek chambers containing the infected cells were placed in an incubator equilibrated at 37°C and 5% CO₂ located on a IX71 Olympus microscope controlled by the CellR Olympus

system, automated in x, y, z axis and driven by Xcellence software (Olympus). Uncleaved CCF2 (i.e. non-injected cells) was excited at 360/40 nm, and emission was collected at 535/50 nm. Cleaved CCF2 (i.e. injected cells) were excited at 360/40 nm, and emission was collected at 460/50 nm. Images were captured with a Hamamatsu Orca-ER camera and a 20X (N.A. 0.5) air objective (UPLFN20XPH, Olympus). Acquisition times and frequencies are indicated in the figure legend.

Visualization of cell intoxication and bacterial propagation by TIRF microscopy.

For TIRF microscopy, Lifeact or vinculin-transfected cells were imaged using a NIKON TI-E/B microscope, equipped with an Evolve EMCCD camera. The illumination system used was from Roper Scientific (iLas²), and the objective was a Nikon CFI Plan APO VC oil immersion objective (60X, N.A. 1.4). The microscope was controlled with MetaMorph software (Molecular Devices). Temperature, CO₂, and humidity control was performed using a chamliide TC system (TC-A, Quorum technologies). The laser used for excitation of EGFP was a 491 nm cobolt Calypso laser, and the one for excitation of mCherry was a 561 nm MPBC Green Visible Fiber laser. ET525/50M (Chroma) and ET605/52M (Chroma) emission filters were used for EGFP and mCherry fluorescence collection, respectively.

Immunolabelling.

MDCK and A549 cells were washed, fixed with formaldehyde, permeabilized with 0.5 % triton and labeled with a rabbit anti-ZO1 primary antibody (Zymed) and goat anti-rabbit A488 secondary antibody (Molecular Probes). Nuclei were labeled with Hoechst 33258 (10 µg/mL, Sigma-Aldrich). Preparations were observed with an Olympus inverted microscope with a 20x air objective.

Statistics.

All experiments shown here are representative of at least 3 independent experiments. Mann-Whitney's test was performed using StatXact software.

Acknowledgments.

We thank the live microscopy facility of iRTSV (muLife, funded by CEA Nanobio and labex Gral) for confocal and TIRF acquisition and L. Kurzawa and L. Guyon for their help when using these equipments. We thank F. Lacroix and JP. Kleman for the support and access to the image analysis softwares of the IBS Cell Imaging Platform. We thank TWS Editing for proofreading of the manuscript.

References

1. Gellatly SL, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and disease*. 2013;67(3):159-73. doi: 10.1111/2049-632X.12033. PubMed PMID: 23620179.
2. Fleiszig SM, Evans DJ, Do N, Vallas V, Shin S, Mostov KE. Epithelial cell polarity affects susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* invasion and cytotoxicity. *Infection and immunity*. 1997;65(7):2861-7. PubMed PMID: 9199460; PubMed Central PMCID: PMC175402.
3. Heiniger RW, Winther-Larsen HC, Pickles RJ, Koomey M, Wolfgang MC. Infection of human mucosal tissue by *Pseudomonas aeruginosa* requires sequential and mutually dependent virulence factors and a novel pilus-associated adhesin. *Cellular microbiology*. 2010;12(8):1158-73. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01461.x. PubMed PMID: 20331639; PubMed Central PMCID: PMC2906647.
4. Lee A, Chow D, Haus B, Tseng W, Evans D, Fleiszig S, et al. Airway epithelial tight junctions and binding and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa*. *The American journal of physiology*. 1999;277(1 Pt 1):L204-17. PubMed PMID: 10409249.
5. Kierbel A, Gassama-Diagne A, Rocha C, Radoshevich L, Olson J, Mostov K, et al. *Pseudomonas aeruginosa* exploits a PIP3-dependent pathway to transform apical into basolateral membrane. *The Journal of cell biology*. 2007;177(1):21-7. PubMed PMID: 17403925.
6. Kierbel A, Gassama-Diagne A, Mostov K, Engel JN. The phosphoinositol-3-kinase-protein kinase B/Akt pathway is critical for *Pseudomonas aeruginosa* strain PAK internalization. *Molecular biology of the cell*. 2005;16(5):2577-85. PubMed PMID: 15772151.
7. Fraylick JE, La Rocque JR, Vincent TS, Olson JC. Independent and coordinate effects of ADP-ribosyltransferase and GTPase-activating activities of exoenzyme S on HT-29 epithelial cell function. *Infection and immunity*. 2001;69(9):5318-28. PubMed PMID: 11500401.
8. Huber P, Bouillot S, Elsen S, Attree I. Sequential inactivation of Rho GTPases and Lim kinase by *Pseudomonas aeruginosa* toxins ExoS and ExoT leads to endothelial monolayer breakdown. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(10):1927-41. doi: 10.1007/s00018-013-1451-9. PubMed PMID: 23974244.
9. Kazmierczak BI, Engel JN. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT acts in vivo as a GTPase-activating protein for RhoA, Rac1, and Cdc42. *Infection and immunity*. 2002;70(4):2198-205. PubMed PMID: 11895987.

10. Krall R, Schmidt G, Aktories K, Barbieri JT. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT is a Rho GTPase-activating protein. *Infection and immunity*. 2000;68(10):6066-8. PubMed PMID: 10992524.
11. Pentecost M, Otto G, Theriot JA, Amieva MR. *Listeria monocytogenes* invades the epithelial junctions at sites of cell extrusion. *PLoS pathogens*. 2006;2(1):e3. doi: 10.1371/journal.ppat.0020003. PubMed PMID: 16446782; PubMed Central PMCID: PMC1354196.
12. Verove J, Bernarde C, Bohn YS, Boulay F, Rabiet MJ, Attree I, et al. Injection of *Pseudomonas aeruginosa* Exo toxins into host cells can be modulated by host factors at the level of translocon assembly and/or activity. *PloS one*. 2012;7(1):e30488. PubMed PMID: 22299042.
13. Gloag ES, Turnbull L, Huang A, Vallotton P, Wang H, Nolan LM, et al. Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(28):11541-6. doi: 10.1073/pnas.1218898110. PubMed PMID: 23798445; PubMed Central PMCID: PMC3710876.
14. Join-Lambert O, Morand PC, Carbonnelle E, Coureuil M, Bille E, Bourdoulous S, et al. Mechanisms of meningeal invasion by a bacterial extracellular pathogen, the example of *Neisseria meningitidis*. *Progress in neurobiology*. 2010;91(2):130-9. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.12.004. PubMed PMID: 20026234.
15. Kwong MS, Evans DJ, Ni M, Cowell BA, Fleiszig SM. Human tear fluid protects against *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in a murine experimental model. *Infection and immunity*. 2007;75(5):2325-32. doi: 10.1128/IAI.01404-06. PubMed PMID: 17325054; PubMed Central PMCID: PMC1865794.
16. Sana TG, Hachani A, Bucior I, Soscia C, Garvis S, Termine E, et al. The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and Fur and modulates internalization in epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(32):27095-105. doi: 10.1074/jbc.M112.376368. PubMed PMID: 22665491; PubMed Central PMCID: PMC3411052.
17. Schaible B, McClean S, Selfridge A, Broquet A, Asehnoune K, Taylor CT, et al. Hypoxia modulates infection of epithelial cells by *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS one*. 2013;8(2):e56491. doi: 10.1371/journal.pone.0056491. PubMed PMID: 23418576; PubMed Central PMCID: PMC3572047.
18. Tran CS, Rangel SM, Almblad H, Kierbel A, Givskov M, Tolker-Nielsen T, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* type III translocon is required for biofilm formation at the epithelial barrier. *PLoS pathogens*. 2014;10(11):e1004479. doi:

- 10.1371/journal.ppat.1004479. PubMed PMID: 25375398; PubMed Central PMCID: PMC4223071.
19. Chi E, Mehl T, Nunn D, Lory S. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with A549 pneumocyte cells. *Infection and immunity*. 1991;59(3):822-8. PubMed PMID: 1671777; PubMed Central PMCID: PMC258333.
 20. Emam A, Carter WG, Lingwood C. Glycolipid-Dependent, Protease Sensitive Internalization of *Pseudomonas aeruginosa* Into Cultured Human Respiratory Epithelial Cells. *The open microbiology journal*. 2010;4:106-15. doi: 10.2174/1874285801004010106. PubMed PMID: 21270937; PubMed Central PMCID: PMC3026333.
 21. Fleiszig SM, Zaidi TS, Fletcher EL, Preston MJ, Pier GB. *Pseudomonas aeruginosa* invades corneal epithelial cells during experimental infection. *Infection and immunity*. 1994;62(8):3485-93. PubMed PMID: 8039920; PubMed Central PMCID: PMC302982.
 22. Clark CA, Thomas LK, Azghani AO. Inhibition of protein kinase C attenuates *Pseudomonas aeruginosa* elastase-induced epithelial barrier disruption. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2011;45(6):1263-71. doi: 10.1165/rcmb.2010-0459OC. PubMed PMID: 21757681.
 23. Golovkine G, Faudry E, Bouillot S, Voulhoux R, Attree I, Huber P. VE-cadherin cleavage by LasB protease from *Pseudomonas aeruginosa* facilitates type III secretion system toxicity in endothelial cells. *PLoS pathogens*. 2014;10(3):e1003939. doi: 10.1371/journal.ppat.1003939. PubMed PMID: 24626230; PubMed Central PMCID: PMC3953407.
 24. Nomura K, Obata K, Keira T, Miyata R, Hirakawa S, Takano K, et al. *Pseudomonas aeruginosa* elastase causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells. *Respiratory research*. 2014;15:21. doi: 10.1186/1465-9921-15-21. PubMed PMID: 24548792; PubMed Central PMCID: PMC3936699.
 25. Bojarski C, Weiske J, Schoneberg T, Schroder W, Mankertz J, Schulzke JD, et al. The specific fates of tight junction proteins in apoptotic epithelial cells. *Journal of cell science*. 2004;117(Pt 10):2097-107. doi: 10.1242/jcs.01071. PubMed PMID: 15054114.
 26. Keller SH, Nigam SK. Biochemical processing of E-cadherin under cellular stress. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;307(2):215-23. PubMed PMID: 12859942.
 27. Schmeiser K, Grand RJ. The fate of E- and P-cadherin during the early stages of apoptosis. *Cell death and differentiation*. 1999;6(4):377-86. doi: 10.1038/sj.cdd.4400504. PubMed PMID: 10381631.

28. Steinhilber U, Weiske J, Badock V, Tauber R, Bommert K, Huber O. Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(7):4972-80. doi: 10.1074/jbc.M006102200. PubMed PMID: 11076937.
29. Guillot L, Nathan N, Tabary O, Thouvenin G, Le Rouzic P, Corvol H, et al. Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2013;45(11):2568-73. doi: 10.1016/j.biocel.2013.08.009. PubMed PMID: 23988571.
30. Uhal BD. Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium. *The American journal of physiology*. 1997;272(6 Pt 1):L1031-45. PubMed PMID: 9227501.
31. Doran KS, Banerjee A, Disson O, Lecuit M. Concepts and mechanisms: crossing host barriers. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3:a010090.
32. Dacheux D. Mise en évidence et étude de la cytotoxicité de *Pseudomonas aeruginosa* envers les neutrophiles humains. [PhD thesis]2000.
33. Dacheux D, Attree I, Schneider C, Toussaint B. Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system. *Infection and immunity*. 1999;67(11):6164-7. PubMed PMID: 10531282; PubMed Central PMCID: PMC97008.
34. Pastor A, Chabert J, Louwagie M, Garin J, Attree I. PscF is a major component of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion needle. *FEMS microbiology letters*. 2005;253(1):95-101. PubMed PMID: 16239085.

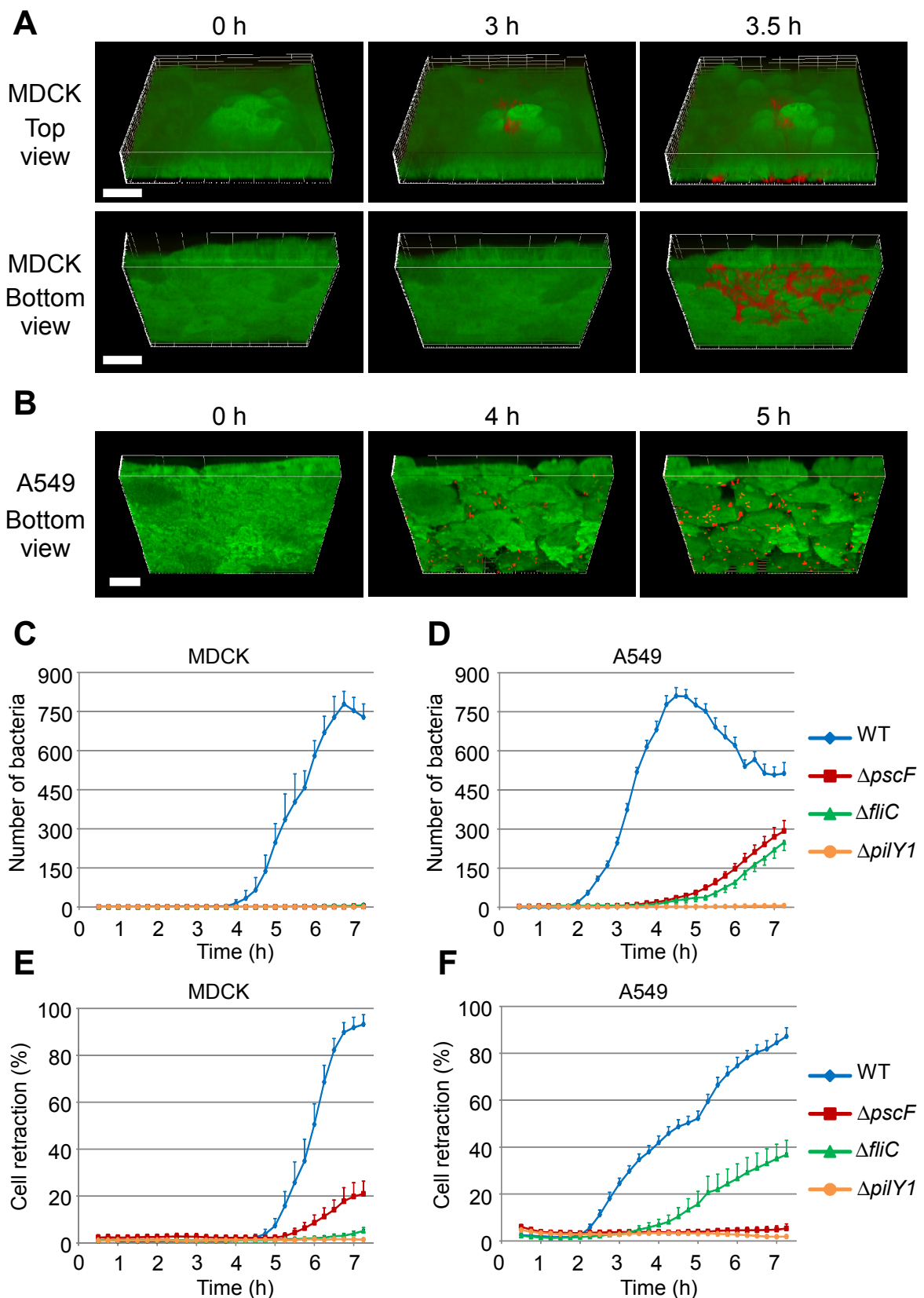


Fig. 1: *P. aeruginosa* crossing through epithelial barriers. (A) Reconstituted 3D images of WT bacteria (red) crossing through MDCK monolayers (green). Selected frames from S1 Movie. Transmigration was observed simultaneously from the apical surface (Top view) and from the basal compartment (Bottom view) at indicated times post infection. (B) Similar experiment with A549 monolayer. Frames were selected from S2 Movie. 3D-reconstitution was performed from 30 and 40 confocal z-planes for A549 and MDCK, respectively. Scale bars: 15 μ m. (C,D) The averaged number (+ SEM) of bacteria located in the basal compartment are plotted against time post infection of MDCK (C) and A549 monolayers (D) (n = 10 fields per condition). Cells were infected by either the wild type (WT), or mutants lacking T3SS (Δ pscF), flagellum (Δ fliC) or pili (Δ pilY1). Images showing the transmigrated bacteria for each strain at different time points are presented for MDCK in S2 Fig. (E,F) Cell retraction was measured on the same datasets as in (C,D) for MDCK (E) and A549 (F), using z-projections of the 5 lowest confocal images.

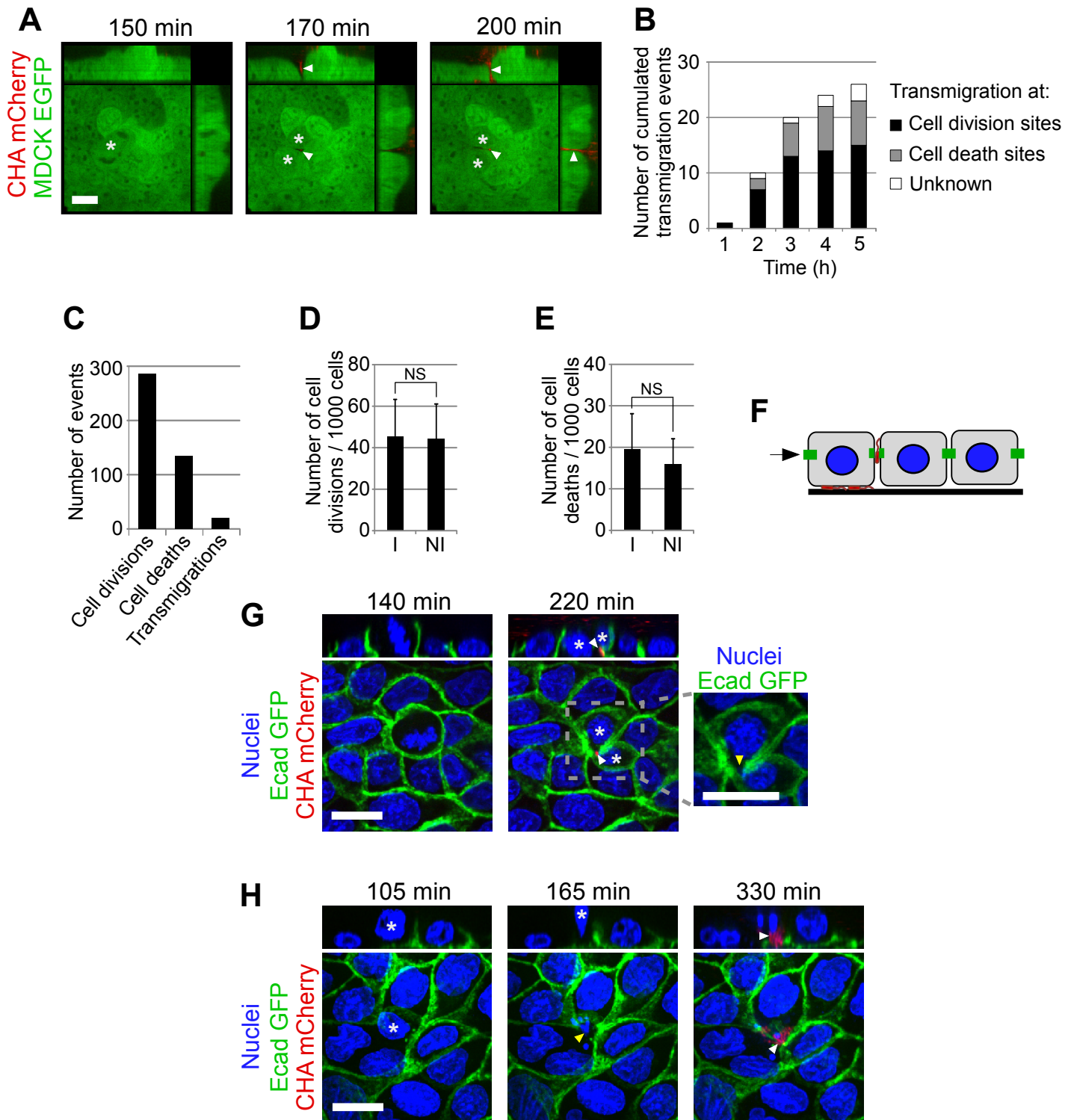


Fig. 2: Transmigration sites in epithelial monolayers. (A) Confocal images in (x,y), (x,z) and (y,z) showing the transmigration of bacteria (red) in a cleft (arrowhead) formed between two dividing MDCK cells (*). Scale bar: 20 μ m. (B) The total number of transmigration sites was scored on 48 fields, representing 28,000 cells, and were plotted against time. Transmigration occurred at cell division, cell death or at uncharacterized events (Unknown), as indicated. (C) The total numbers of cell division, cell death and the transmigration sites were scored in the first 3 hours of infection. (D) The number of dividing MDCK cells was determined in 24 fields for 3 hours in infected (I) and non-infected (NI) conditions. (E) The number of dying cells were counted on the same dataset. N.S., not significant according to Student's test. (F) Diagram showing the experimental model used in (G,H). MDCK monolayers expressing Ecad-EGFP and labeled with Hoechst were infected with CHA-mCherry. (G) Confocal images in (x,y) and (x,z) showing a bacterium (white arrowhead) penetrating the intercellular junction at a site of interrupted E-cadherin labeling (yellow arrowhead), between two daughter cells (*), following division. Scale bar: 15 μ m. Selected frames from S3 Movie. (H) Confocal images in (x,y) and (x,z) showing a bacterial penetration (arrowhead) at intercellular junctions at site of senescent cell extrusion (*). Scale bar: 15 μ m. Selected frames from S4 Movie.

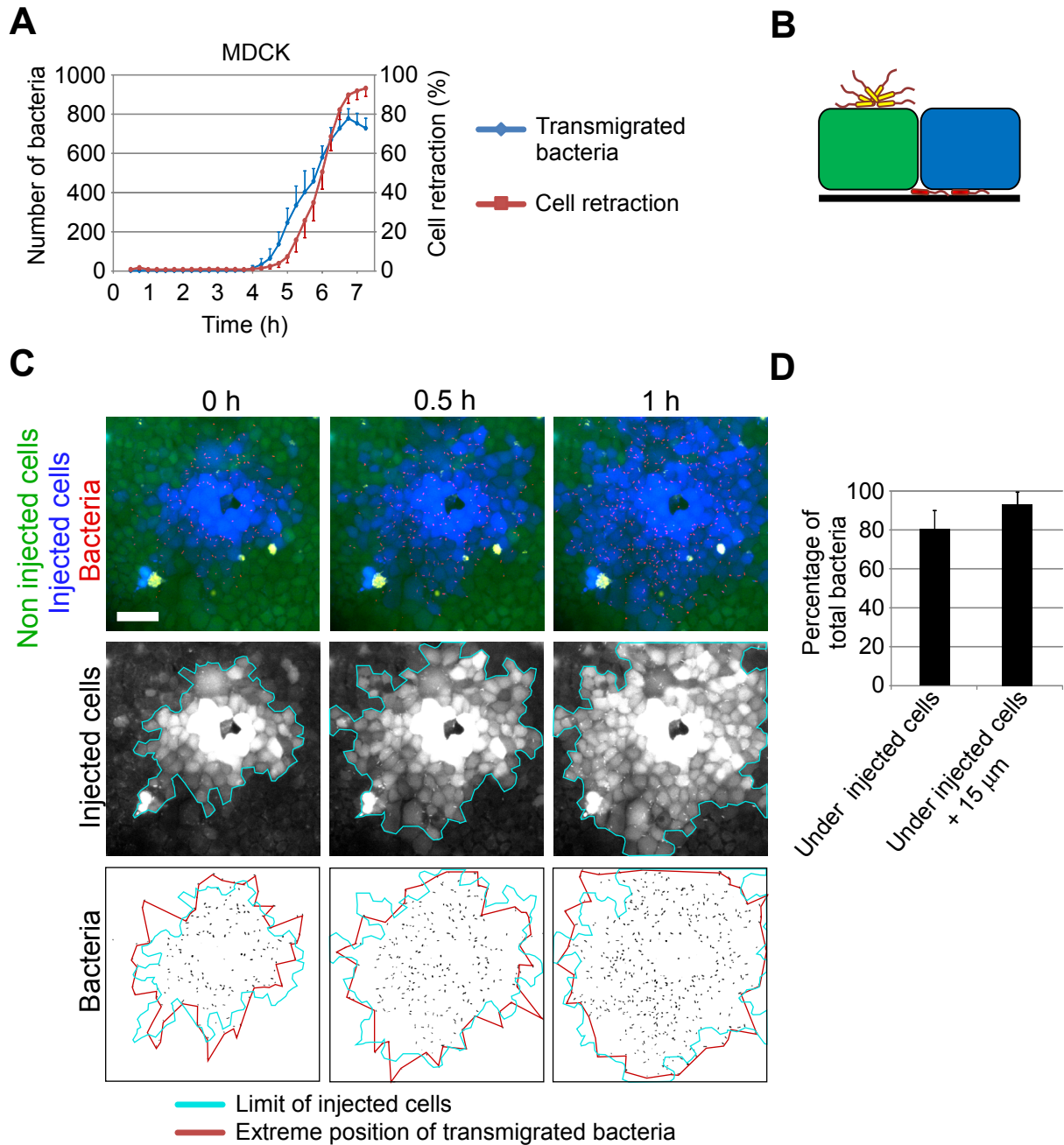


Fig. 3: Visualization of T3SS toxin injection in epithelial monolayers. (A) The bacterial transmigration kinetics is shown as in Fig. 1C and compared to cell retraction (Fig. 1D), owing to toxin injection, measured on the same dataset (means + SEM, $n = 10$ fields). Cell retraction was consistently delayed compared to bacterial transmigration in each field. (B) Diagram showing the experimental system used in (C) to monitor T3SS toxin injection: bacteria injecting an ExoS-Bla chimeric toxin were used to infect MDCK monolayers loaded with CCF2, a bifluorescent Bla substrate (see SI Materials and Methods). Once CCF2 is cleaved by ExoS-Bla, fluorescence is shifted from green to blue. Bacterial aggregates at apical surface are represented in yellow, and bacteria in the basal compartment are in red. (C) Top: merged wide-field images at different time points post-CCF2 loading, centered at a transmigration site. Scale bar: 50 μm . Images are selected frames from S5 Movie. Middle: images showing only the blue channel (injected cells). A blue line indicates the external limit of injected cells. Bottom: images showing the bacteria in the basal compartment. The red line represents the outermost bacteria positions and the blue line is as above. (D) Histogram showing the percentage of bacteria within the injected cell surface in 12 fields at 4 h (MOI 30), and within the injected cell surface dilated of 15 μm on each side.

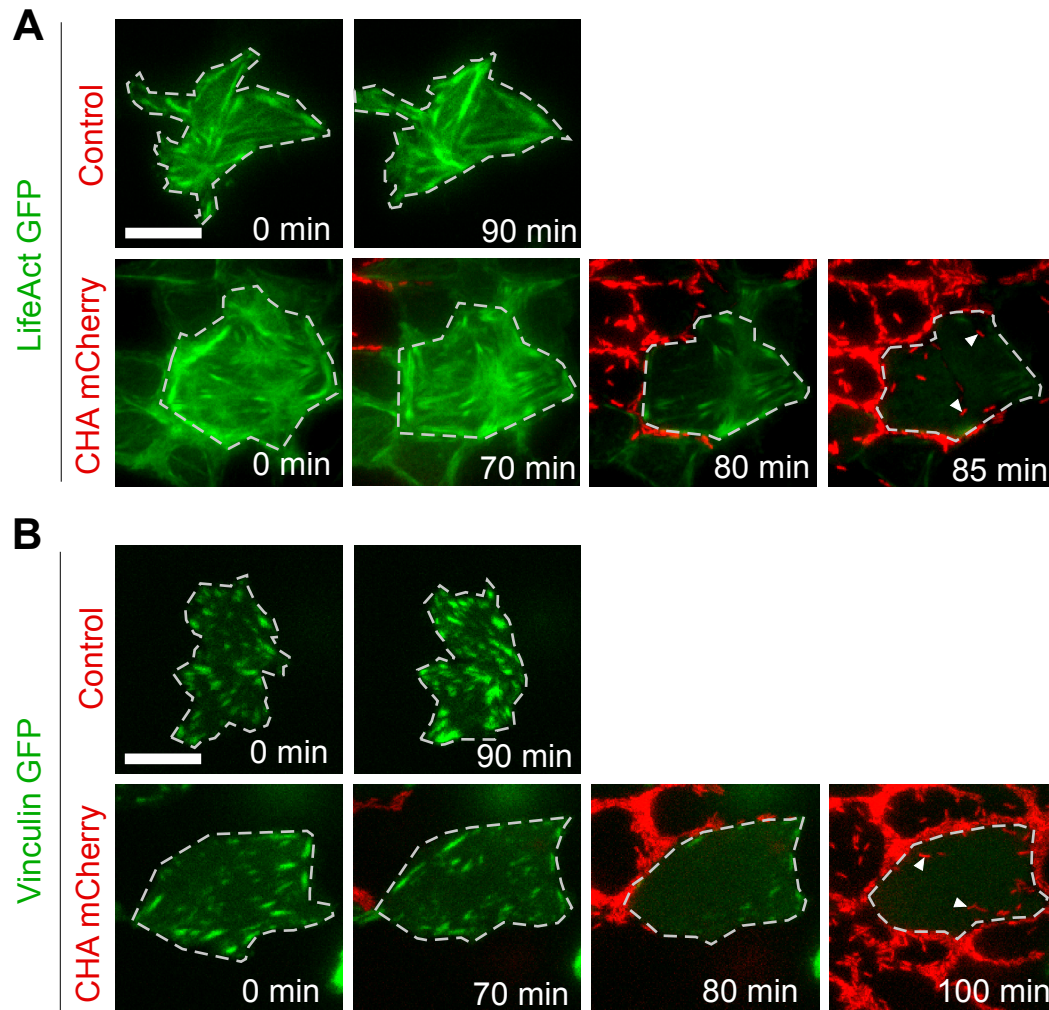


Fig. 4: Correlation of bacteria propagation and disruption of host cellular components. (A) MDCK were transiently transfected with Lifeact-GFP to label actin fibers. Note that not all cells expressed Lifeact-GFP in the monolayer. Monolayers were infected with CHA-mCherry or uninfected (Control) and images were acquired in the basal compartment at different points by TIRF microscopy. Selected frames from S6 Movie are presented. For clarity, a transfected cell has been surrounded by a dashed line. Arrowheads highlight bacteria moving below the cell after actin fiber disruption. (B) Similar experiment but with vinculin-GFP expressing MDCK cells. Selected frames from S7 Movie.

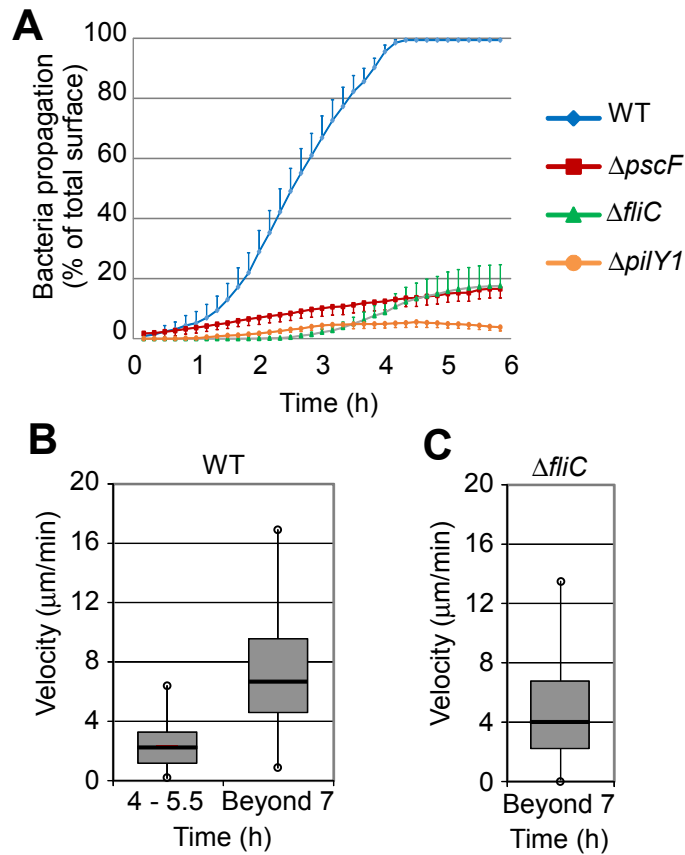


Fig. 5: Bacterial propagation below an epithelial monolayer. (A) A wound was made in MDCK monolayers and bacteria were subsequently introduced in the medium. Invasion from the wound was recorded in the basal compartment by confocal microscopy at different time points, as illustrated in S4 Fig. The wounded monolayers were infected with the wild type or with mutants lacking T3SS ($\Delta pscF$), flagellum ($\Delta fliC$) or pili ($\Delta pilY1$). The invasion surfaces were measured in 8 fields. The data represent the averaged percentages of invaded surfaces (+ SEM) of total field surface minus the wounded area. (B) MDCK-EGFP monolayers were infected with CHA and bacteria progression was recorded by confocal microscopy in the basal compartment (S8 Movie). Bacteria were tracked using ImageJ software MTrackJ. Once bacteria assembled in rafts, the leading bacterium was recorded. The box-plots represent the instantaneous velocities recorded in 4 movies for each condition. $N = 640$ velocities from 40 trajectories at 4-5.5 hpi, and $n = 455$ velocities from 20 trajectories beyond 7 hpi. Data were significantly different at 4-5.5 and beyond 7 hpi, using Mann-Whitney's test ($p < 0.001$). (C) Similar experiment with $\Delta fliC$ (see S9 Movie). Box-plot showing the instantaneous velocities ($n = 1360$) of $\Delta fliC$ from 35 trajectories in 4 different movies.

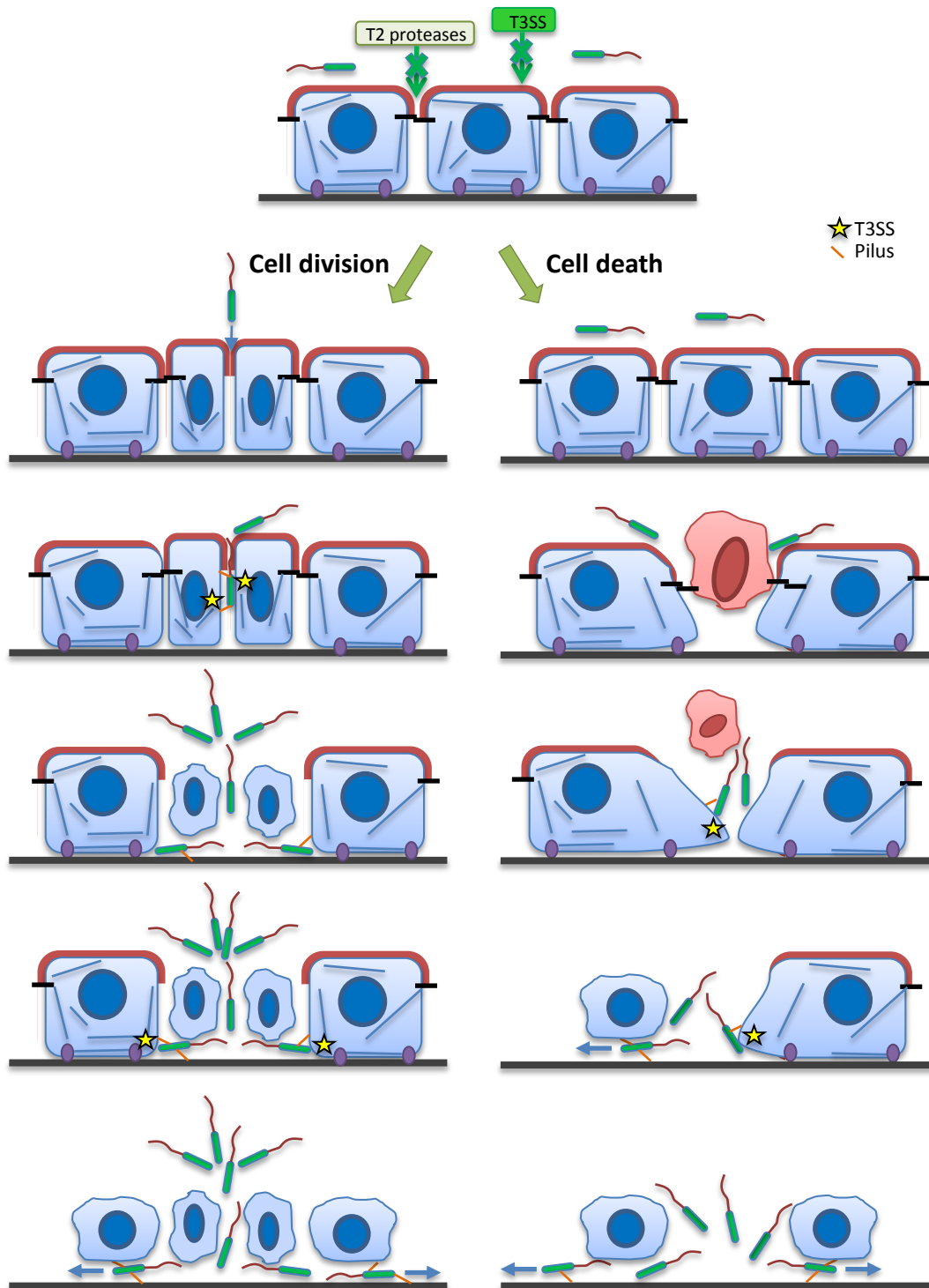


Fig. 6: Model of *P. aeruginosa* transmigration across epithelial layers. In resting epithelium, T2SS proteases or T3SS toxins are inefficient to disrupt the barrier formed by polarized epithelial cells provided with mature junctions. Bacteria may use cell division or dying cell extrusion to penetrate the epithelium. Once bacteria have access to the baso-lateral domain, they interact with cell membranes using their pili and inject their T3SS toxins, inducing cell retraction and facilitating their invasion of the basal compartment.

Supporting Information

Movie Legends

Times post-infection are indicated on movies as h.h:min.min.

S1 Movie. 3D-reconstruction of CHA transmigration across MDCK cell layer. The images illustrate the invasion of MDCK monolayer (green) by bacteria (red), viewed from the top or the bottom side. See Fig. 1A for more details.

S2 Movie. 3D-reconstruction of CHA transmigration across A549 cell layer. The images illustrate the invasion of A549 monolayer (green) by bacteria (red), viewed from the bottom side. See Fig. 1B for more details.

S3 Movie. Penetration of a bacterium at a cell division site. E-cadherin-GFP-MDCK cells exhibiting a gap in E-cadherin labeling between two dividing cells. A bacterium (red) penetrates the layer at this specific point. See Fig. 2G for more details.

S4 Movie. Penetration of bacteria at senescent cell extrusion site. E-cadherin-GFP-MDCK cells exhibiting a gap in E-cadherin labeling in the junction newly formed below the extruding dying cell. Several bacteria (red) penetrate the layer at this specific point. See Fig. 2H for more details.

S5 Movie. T3SS toxin injection is correlated with bacterial progression under the cells. T3SS toxin injection was monitored using the ExoS-Bla/CCF2 system (See Fig. 3C for more details). Uninjected cells are green, injected cells are blue and the bacteria located in the basal compartment are red.

S6 Movie. Disruption of actin cytoskeleton in the course of bacterial progression under the cells. The actin cytoskeleton of MDCK was labeled with Lifeact-GFP. Left: actin skeleton, middle: bacteria, right: merge images. The bacteria penetrated the basal compartment when the cytoskeleton vanished, owing to T3SS toxin injection. See Fig. 4A for more details.

S7 Movie. Disruption of focal contacts in the course of bacterial progression under the cells. MDCK focal contacts were labeled with vinculin-GFP. Left: focal contacts, middle: bacteria, right: merge. The bacteria penetrated the basal compartment when the focal contacts vanished, owing to T3SS toxin injection. See Fig. 4B for more details.

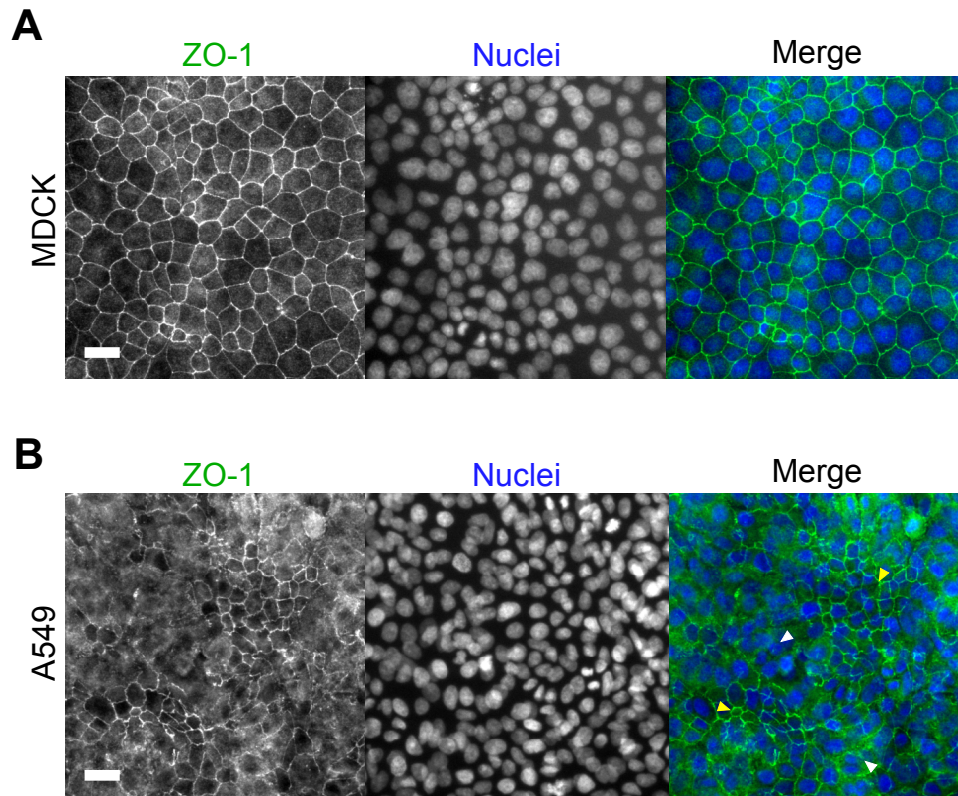
S8 Movie. Tracking of wild-type bacteria in the basal compartment. Some trajectories (colorized) of wild-type bacteria (white) invading the basal compartment were followed using the MTrackJ plugin of ImageJ software. See Fig. 5B for quantifications.

S9 Movie. Tracking of flagellum-deficient bacteria in the basal compartment. Some trajectories (colorized) of Δ *fliC* bacteria (white) invading the basal compartment were followed using the MTrackJ plugin of ImageJ software. See Fig. 5C for quantifications.

S1 Table: Strains and plasmids used in this work

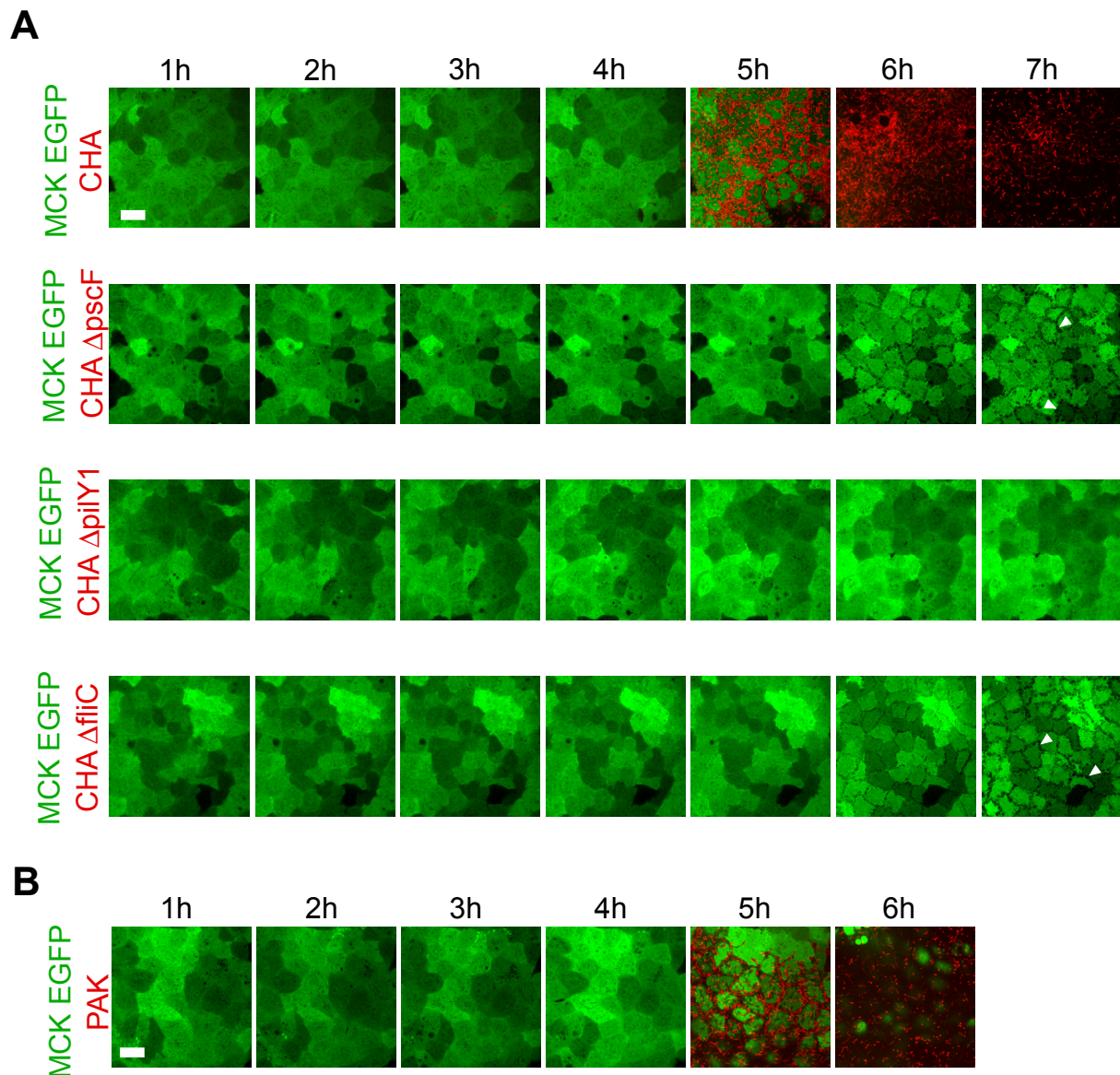
	Description	Abbreviations used
<i>Original strains transformed with pIApX2-mCherry</i>		
CHA [33]	Wild-type <i>P. aeruginosa</i> strain	WT
CHA Δ <i>pscF</i> [34]	CHA with an internal deletion of the <i>pscF</i> gene	Δ <i>pscF</i>
CHA Δ <i>fliC</i> [34]	CHA with a gentamycin cassette inserted within <i>fliC</i>	Δ <i>fliC</i>
CHA Δ <i>pilY1</i> [32]	CHA with a transposon cassette in the <i>pilY1</i> gene	Δ <i>pilY1</i>
CHA Δ <i>exoS::exoS-bla</i> [12]	CHA with deletion of <i>exoS</i> and insertion of <i>exoS</i> fused to β -lactamase	<i>exoS-bla</i>
<i>Original strain transformed with miniCTXpX2-mCherry</i>		
PAK	Wild-type <i>P. aeruginosa</i> strain	PAK
<i>Plasmids</i>		
pIApX2-mCherry ^a	Replicative pUCP20-derived plasmid bearing pX2-mCherry fusion	
miniCTXpX2-mCherry ^a	Integrative mini-CTX plasmid bearing pX2-mCherry fusion	

^aThis study.



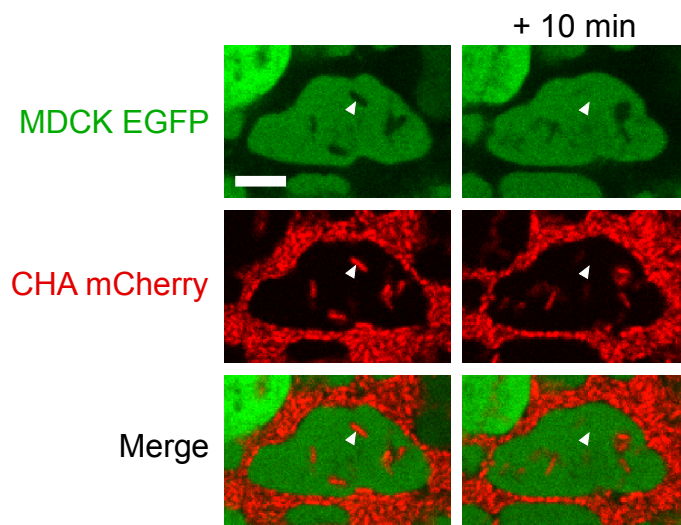
S1 Figure

S1 Fig. E-cadherin labeling of MDCK and A549 monolayers. MDCK (**A**) or A549 (**B**) cells, seeded at 2,500 cells/mm² and cultured for 3 days, as for videomicroscopy experiments, were fixed and labeled with anti-ZO-1 antibodies (green) to highlight cell-cell junctions. Nuclei are in blue. Yellow arrowheads show ZO-1-positive junctions and white arrowheads show interrupted junctions. Scale bars: 50 μ m.



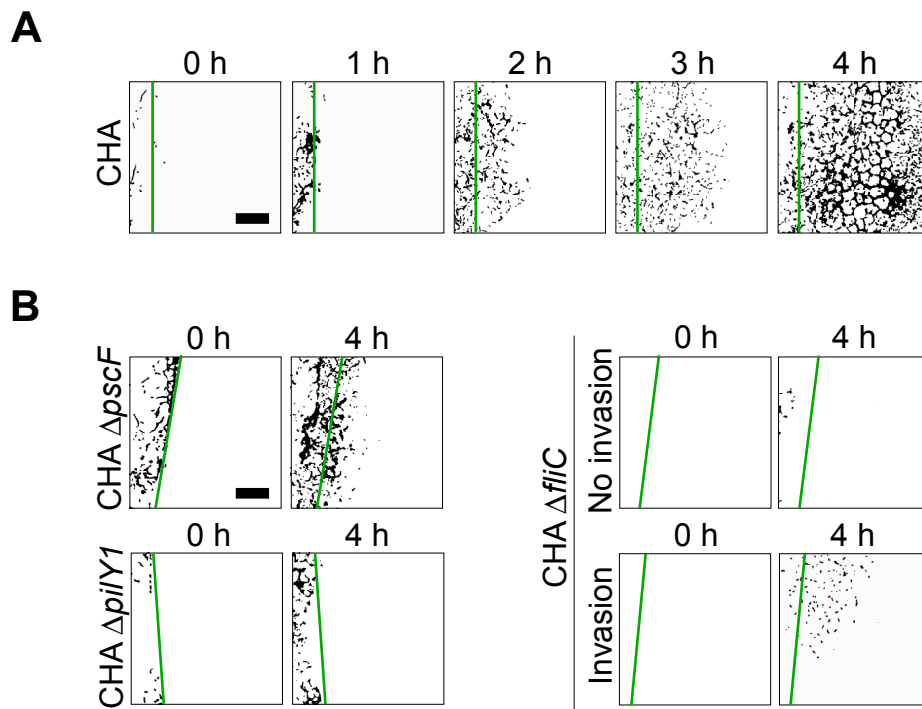
S2 Figure

S2 Fig. Kinetics of bacteria transmigration across MDCK monolayers. (A,B) MDCK-EGFP monolayers were infected with various strains expressing mCherry. Merged confocal images of green and red channels, taken at the cell basal side at different time points are shown. Note that MDCK cells did not express EGFP at the same level, allowing cell individualization. (A) MDCK were infected by CHA or with CHA mutants lacking T3SS (Δ pscF), pili (Δ pilY1) or flagellum (Δ fliC). Note that at late time points, cells infected with Δ pscF or Δ fliC exhibited disrupted intercellular junctions (arrowheads), a phenotype not observed in Δ pilY1-infected cells. Quantifications of bacterial transmigration and cell retraction are shown in Fig. 1C,E. (B) Similar experiment using PAK background. MDCK were infected with PAK. Scale bars, 20 μ m.



S3 Figure

S3 Fig. Bacteria raise the host cells to invade the lower compartment. MDCK-EGFP cells were infected with CHA-mCherry. Two successive confocal microscopy images captured at the cell's basal side were selected to show the imprints of bacteria (arrowheads) in the cell, as monitored by the loss of green fluorescence in MDCK cytosol. Scale bars: 15 μ m.



S4 Figure

S4 Fig. Bacterial propagation below an epithelial monolayer from a wound. A wound was made in MDCK monolayers and bacteria were subsequently introduced in the medium. Invasion from the wound was recorded in the basal compartment by confocal microscopy at different time points, as indicated. The green lines indicate the wound edge. Scale bars: 25 μ m. **(A)** The wounded monolayer was infected by CHA. **(B)** The wounded monolayers were infected with mutants lacking T3SS (Δ pscF), flagellum (Δ fliC) or pili (Δ pilY1). Note that in the Δ fliC condition, bacteria did not accumulate in the wounded area and invaded solely from specific points of the wound (“Invasion” as opposed to “No invasion”). See Fig. 5 for quantifications.

C. Discussion

Par microscopie confocale en temps réel, nous démontrons dans cette étude que *P. aeruginosa* est capable de transmigration à travers un modèle *in vitro* d'épithélium en utilisant une voie paracellulaire.

Pour cela, *P. aeruginosa* exploite les processus de renouvellement de l'épithélium que sont les divisions cellulaires et les morts cellulaires. En ces sites précis, les bactéries tirent parti de faiblesses jonctionnelles de la monocouche pour transmigration massivement et accéder aux domaines basolatéraux des cellules.

Les bactéries se propagent alors horizontalement sous la monocouche, injectant les toxines du SST3 dans les cellules au fur et à mesure de leur progression. Au moins trois facteurs de virulence sont nécessaires pour cette invasion : les pili, le SST3 et le flagelle.

En complément de la discussion de l'article, certains points seront discutés ci-après.

a. Résistance de l'épithélium à l'infection

Dans ces travaux, nous montrons que *P. aeruginosa* est capable de franchir une barrière épithéliale en ciblant des sites de divisions cellulaires ou de morts cellulaires. Cependant, plusieurs études rapportent que l'épithélium pulmonaire d'un individu sain est résistant à l'infection. Plusieurs raisons permettent d'expliquer ce phénomène :

- Le taux de division cellulaire est sans doute bien plus bas dans le poumon, en comparaison du modèle *in vitro* que nous avons développé. Le temps de renouvellement moyen de l'épithélium pulmonaire en situation normale est estimé à 4 ou 5 semaines. Cependant, il est documenté que ce taux peut fortement augmenter en cas de stress ou de blessure (Fehrenbach, 2001).
- Les cellules sont protégées des bactéries par le mucus, qui forme une couche protectrice empêchant les bactéries d'adhérer directement aux cellules, et permet leur élimination par les mécanismes de clairance mucociliaire (Williams et al., 2010).
- Le surfactant produit par les pneumocytes de type 2 recouvre les alvéoles pulmonaires et participe à l'élimination des microorganismes (Gellatly and Hancock, 2013).

- Le système immunitaire, en particulier les cellules phagocytaires, assure une protection efficace contre les pathogènes bactériens.

Le modèle que nous avons établi nous a permis d'observer un mécanisme jusque-là insoupçonné de franchissement d'une barrière épithéliale. Ce modèle, très simple, pourrait être amélioré pour être plus proche des conditions réelles d'infection.

b. Vers une complexification du modèle utilisé

Deux points principaux seraient susceptibles de représenter une amélioration conséquente du modèle que nous avons développé : la morphologie des cellules et la présence d'une matrice extracellulaire sous-jacente.

i. Morphologie et conditions de culture des cellules

Les MDCK sont une lignée cellulaire dérivée de cellules épithéliales de rein de chien. Leur choix en tant que premier type cellulaire testé se justifie par plusieurs points : ce sont des cellules polarisées avec des jonctions cellulaires matures, elles ont une forte inhibition de contact et sont très faciles à manipuler. En revanche, leur morphologie est assez différente de celle des pneumocytes de type 1, qui sont les principales cellules épithéliales rencontrées par *P. aeruginosa* au cours de l'infection. En effet, les MDCK sont hautes et de forme cylindrique, alors que les pneumocytes de type 1 sont plates et pavimenteuses. Cependant, aucune des lignées cellulaires employées pour l'étude de l'interaction entre *P. aeruginosa* et les cellules épithéliales n'a cette morphologie. Seules des cultures primaires de pneumocytes de type 1 pourraient avoir la morphologie et la fonction de barrière adéquate. Des contraintes de microscopie (notamment pour la transfection de ces cellules afin de les rendre fluorescentes) pourraient cependant limiter les possibilités d'utilisation de telles cellules.

Par ailleurs, cultiver les cellules dans un système Transwell pourrait également être intéressant, car cela permettrait d'éviter qu'elles n'expriment du côté apical des transporteurs basolatéraux pour obtenir des nutriments (Bucior et al., 2014). Encore une fois, la microscopie de ces systèmes serait délicate.

ii. Importance de la matrice extracellulaire

Un point qu'il serait intéressant d'étudier serait la présence d'une matrice extracellulaire épaisse et de composition plus proche de la structure de la lame basale sous les cellules. Dans notre modèle, les bactéries qui transmigrent se propagent horizontalement sous la monocouche, injectant les toxines du SST3 dans les cellules au fur et à mesure de leur progression. Cette progression horizontale est forcée, puisqu'elles entrent en contact avec la lame de verre sur laquelle les cellules ont été cultivées. Il serait intéressant de savoir comment les bactéries se comporteraient si elles avaient la possibilité de poursuivre plus avant leur invasion à travers cette structure matricielle.

c. Attraction des bactéries par le domaine basal

L'observation par microscopie confocale de l'interaction entre *P. aeruginosa* et une monocouche de cellules épithéliales a permis de mettre en évidence un phénomène qui relève clairement du chimiotactisme. En effet, nous constatons que *P. aeruginosa* est attirée par le domaine basal des cellules, et que les bactéries exploitent certains sites de divisions cellulaires et de morts cellulaires pour y accéder. A ces sites précis, nous constatons un phénomène de recrutement massif des bactéries (voir Figure 34).

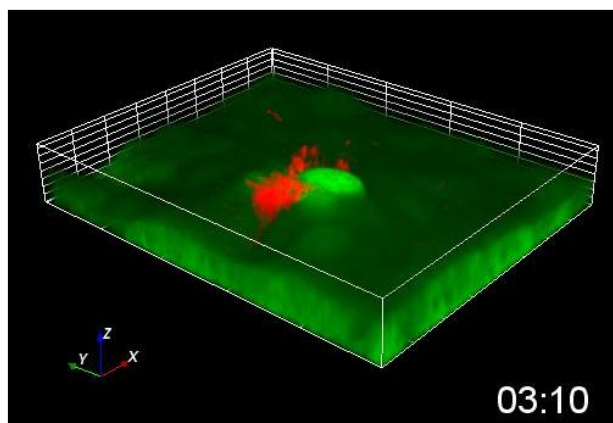


Figure 34 : Recrutement massif de bactéries aux futurs sites de transmigration (données non publiées)

Il est intéressant de noter que, sur l'ensemble des divisions cellulaires et morts cellulaires, seules celles où un phénomène de transmigration a eu lieu par la suite ont provoqué ce recrutement bactérien. Il est possible qu'une molécule (potentiellement du domaine basal des cellules ou de la matrice extracellulaire) soit libérée dans le milieu extracellulaire à ces sites spécifiques et serve de signal chimiotactique guidant les bactéries.

Identifier le signal chimique permettant ce recrutement bactérien constituerait une avancée importante dans la compréhension du mécanisme de transmigration. L'identification de ce signal pourrait avoir un retentissement thérapeutique important, à condition de pouvoir le corrompre.

Par ailleurs, il est important de noter que les amas de bactéries observés en surface des futurs sites de transmigration ne semblent pas constituer des agrégats figés, mais au contraire des structures dynamiques dans lesquelles des bactéries sont recrutées alors qu'elles nagent en surface des cellules. Le phénomène de chimiotactisme agit donc vraisemblablement sur le flagelle.

d. Rôle des pili dans la transmigration

Il apparait clairement d'après nos résultats, ainsi que ceux d'autres groupes (Hayashi et al., 2015; Heiniger et al., 2010) que les pili sont indispensables à l'invasion d'une monocouche de cellules épithéliales. Plusieurs points peuvent cependant être discutés.

i. Rôle des pili dans l'interaction avec les cellules

D'après nos résultats, les pili sont les facteurs de virulence les plus importants pour l'infection de cellules épithéliales. En effet, le mutant sans pili que nous avons testé est incapable de transmigrer à travers une monocouche de cellules polarisées ou non polarisées. Les pili sont vraisemblablement essentiels à plusieurs étapes du processus de transmigration bactérienne :

- La reconnaissance et l'adhésion au domaine apical des cellules par interaction avec les N-glycanes (Bucior et al., 2012).
- L'interaction avec le domaine basal des cellules par le biais de certaines intégrines (Johnson et al., 2011)
- L'injection des toxines du SST3 (Sundin et al., 2002)

ii. Importance du twitching pour la transmigration

Nos résultats ne nous permettent pas de savoir quelle fonction des pili est indispensable à l'invasion d'une monocouche de cellules épithéliales (*i.e.* adhésion, contact rapproché permettant l'injection ou mobilité de type twitching). Le mutant utilisé dans notre étude, *ΔpilY1*, est un mutant de *P. aeruginosa* dépourvu de pili, ne pouvant ni se déplacer par twitching, ni injecter les toxines du SST3 dans les cellules épithéliales.

Certains de nos résultats ne figurant pas dans la publication pourraient constituer une piste intéressante pour étudier cette question : nous avons testé un mutant de *P. aeruginosa*, $\Delta pilV$, incapable de se déplacer par twitching, mais qui peut cependant induire une cytotoxicité sur A549 par injection de toxines du SST3 (voir Figure 35).

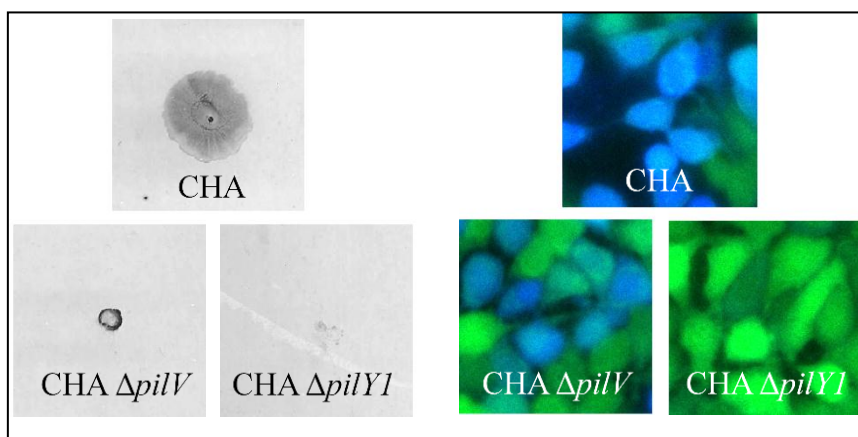


Figure 35: Phénotype du mutant $\Delta pilV$
 (Gauche) Twitching des souches CHA, CHA $\Delta pilV$ et CHA $\Delta pilY1$; (Droite) Test d'injection de ces souches par le système CCF2/ExoS- β La (données non publiées). Les 2 mutants ne sont pas capables de twitching, mais le mutant $\Delta pilV$ conserve la fonction d'injection via le SST3

Ce mutant est, à notre connaissance, le premier mutant pour lequel les fonctions de twitching et d'injection sont dissociées. Il représente donc un outil intéressant dans l'optique de mieux comprendre le rôle joué par les pili dans l'infection des cellules épithéliales.

La capacité de ce mutant à transmigrier dans le modèle MDCK (cellules polarisées) et le modèle A549 (cellules non polarisées) a été comparée à celle du mutant $\Delta pilY1$, qui est totalement dépourvu de pili, et à celle du mutant $\Delta PscF$, dépourvu de SST3. Alors que la transmigration du mutant $\Delta pilY1$ est totalement abolie dans les deux modèles cellulaires, les mutants $\Delta pilV$ et $\Delta PscF$ sont capables de transmigrier faiblement dans le modèle A549, mais pas dans le modèle MDCK. Ce résultat suggère que l'activité de twitching est indispensable à elle-seule au franchissement d'un épithélium polarisé par *P. aeruginosa*.

Le mutant $\Delta pilV$ a été créé par insertion d'un transposon dans le gène *pilV*, codant pour une piline mineure. Les pilines mineures sont de petites protéines impliquées dans la biogenèse des pili, dont la fonction exacte n'est pas complètement établie à ce jour. La protéine PilV,

identifiée en 1995, a été décrite par plusieurs groupes comme étant nécessaire à la formation des pili (Alm and Mattick, 1995; Giltner et al., 2010), ce qui entre en contradiction avec le phénotype que nous observons, puisque sans pili, l'injection par le SST3 ne devrait pas être possible.

Ce mutant semble être une piste intéressante pour étudier le rôle des pili dans l'invasion, mais une vérification de sa construction génétique, ainsi que de son phénotype (notamment de sa capacité à former des pili) est indispensable avant de pouvoir poursuivre nos travaux.

iii. Interaction des pili et du flagelle

Dans cette étude, nous faisons le constat que le flagelle est essentiel à la migration collective des bactéries sous la monocouche de cellules épithéliales (voir Figures 5 et S4 du manuscrit soumis pour publication). Il est admis que le flagelle n'est pas impliqué dans la mobilité de type twitching. Il est donc possible que la mobilité sous les cellules soit un processus différent du twitching sous gélose. Alternativement, il est envisageable que le rôle du flagelle dans le twitching ait été sous-estimé. En effet, ce type de mobilité est généralement étudié à l'échelle macroscopique (voir Figure 35). Il est possible qu'un défaut d'interaction entre bactéries à l'échelle microscopique passe inaperçu à cette échelle. Il serait intéressant d'étudier le rôle du flagelle dans le modèle microscopique développé par Gloag et ses collaborateurs (Gloag et al., 2013b).

e. Exploitation des divisions et morts cellulaires

i. Pourquoi les divisions et morts cellulaires ne sont-elles pas toutes exploitées ?

Une question importante est de savoir pourquoi seule une petite fraction des divisions cellulaires et des morts cellulaires est exploitée par *P. aeruginosa* pour transmigrer.

Comme il est mentionné dans la discussion de l'article, il est possible que ce phénomène soit avant tout statistique : la probabilité qu'une bactérie soit « au bon endroit, au bon moment » est peut-être faible. Une autre hypothèse est que seule une petite fraction des divisions cellulaires et des morts cellulaires peut donner lieu à une transmigration. En observant la E-cadhérine aux sites de transmigration, nous avons constaté une fermeture incomplète des jonctions aux sites de divisions cellulaires et de morts cellulaires.

Le maintien des jonctions cellulaires au cours de la division cellulaire est un phénomène qui est étudié depuis longtemps, mais qui a connu des avancées importantes avec l'avènement de la microscopie confocale en temps réel. Ainsi, des études récentes rapportent que dans certains tissus épithéliaux (par exemple dans l'ectoderme d'embryon de drosophile), un intervalle se forme dans la jonction E-cadhérine entre la cellule en division et les cellules voisines (voir Figure 36). Ce phénomène est peut-être spécifique à ce type de tissu, car il n'a pas été observé dans d'autres modèles d'épithéliums (notum de larve de drosophile, voir Figure 36) (Ragkousi and Gibson, 2014).

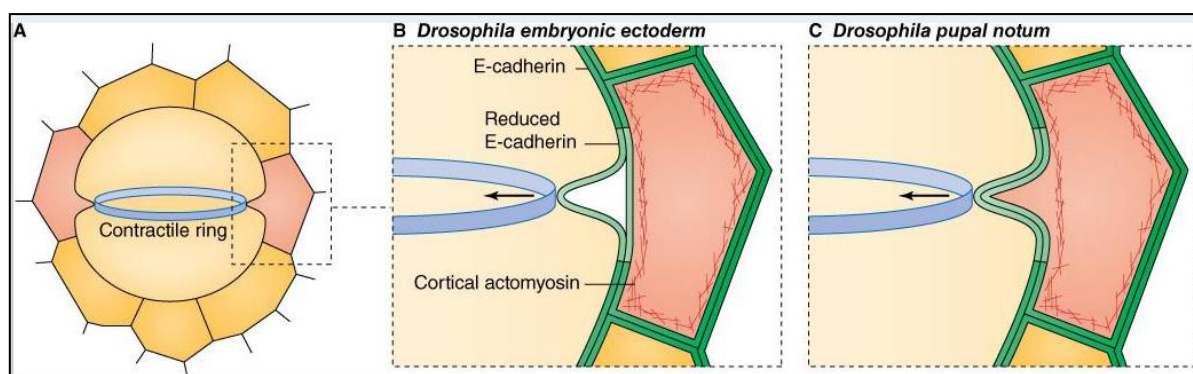


Figure 36 : Comportement des jonctions adhérentes au cours de la division cellulaire dans différents tissus épithéliaux.

(Gauche) Schéma d'une cellule épithéliale en division dans un tissu. (Centre) Dans l'ectoderme d'embryon de drosophile, un intervalle est créé entre la cellule en division et la cellule adjacente. (Droite) Ce phénomène n'est pas observé dans le notum de larve de drosophile (Ragkousi and Gibson, 2014).

Savoir si un tel intervalle se crée au cours de la division dans le modèle MDCK nous permettrait peut-être de mieux comprendre comment *P. aeruginosa* transmigre dans ce contexte. Il a été décrit que les surfaces latérales étaient exposées au moment de la division (*L. monocytogenes*) ; il est donc également possible que la bactérie exploite ce démasquage membranaire pour injecter des toxines via le SST3, et ainsi provoquer une ouverture des jonctions. Pour répondre à cette question, il faudrait poursuivre les analyses en vidéomicroscopie en faisant des acquisitions moins espacées dans le temps, à condition de gérer les contraintes de phototoxicité, de photoblanchiment et surtout l'énorme quantité d'images générées.

ii. *Blocage de la division cellulaire*

Nous avons émis l'hypothèse qu'en bloquant la division cellulaire, nous pourrions peut-être retarder la transmigration bactérienne, et ainsi ralentir l'infection. Avant infection, nous avons donc incubé les MDCK avec plusieurs molécules (mitomycine C, hydroxyurée) à différentes concentrations. Contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature, nous ne sommes pas parvenus à bloquer complètement la division cellulaire. Même à forte concentration, ces molécules n'ont pas eu l'effet escompté, et elles provoquaient même une toxicité envers les cellules ce qui augmentait la transmigration aux sites d'extrusion des cellules mortes. Ces molécules sont généralement utilisées sur cellules isolées ou sous confluentes. Il est possible que d'autres facteurs entrent en jeu dans le cas de cellules épithéliales très confluentes.

f. Internalisation ou transmigration ?

i. *L'internalisation, un phénomène surestimé*

Avant toute chose, il est important de signaler que les conditions expérimentales utilisées pour mettre en évidence l'internalisation sont généralement très différentes de celles utilisées dans notre étude. Notamment, les souches de *P. aeruginosa* utilisées ne sont pas les mêmes : la souche généralement utilisée pour mettre en évidence l'internalisation est la souche PAK, tandis que nous utilisons la souche CHA, caractérisée comme étant plus cytotoxique sur cellules épithéliales. De même, les protocoles de culture des bactéries avant infection sont différents : les bactéries utilisées dans notre étude sont en phase exponentielle de croissance, alors que celles utilisées pour l'internalisation sont généralement en phase stationnaire. Il est possible que ces divergences soient responsables des différences observées.

Une étude récente menée par Engel et son groupe rapporte que des agrégats bactériens peuvent se former en surface de cellules épithéliales (MDCK), et que ces agrégats exhibent des propriétés propres aux biofilms : présence de matrice extracellulaire et d'ADN extracellulaire, nécessité des pili et du flagelle, et surtout augmentation de la résistance aux antibiotiques (Tran et al., 2014b).

Les agrégats se forment rapidement (en moins de 60 minutes), et permettent aux bactéries de résister à de fortes concentrations en antibiotique. Ce résultat entre en contradiction avec ceux rapportés précédemment par les utilisateurs du « gentamycin protection assay » (voir Tableau

3), selon lesquels seules les bactéries intracellulaires résistent à l'antibiotique ajouté au milieu extracellulaire après infection.

Tous les auteurs s'accordent à dire que l'internalisation est un phénomène facultatif. L'internalisation est cependant un phénomène trop largement décrit en utilisant des techniques très variées pour n'être qu'un artefact. Malgré cela, les résultats de Tran et ses collaborateurs (Tran et al., 2014b) semblent indiquer que la quantité de bactéries intracellulaires mesurée par le « gentamycin protection assay » pourrait avoir été surévaluée dans certaines expériences, puisque les bactéries agrégées en surface des cellules (résistantes aux antibiotiques) sont aussi comptabilisées.

Plusieurs études récentes, dont la nôtre, tendent à montrer que dans le contexte d'une infection aiguë, *P. aeruginosa* utilise une voie paracellulaire (Heiniger et al., 2010; Soong et al., 2008). Les voies paracellulaires et transcellulaires ne sont pas forcément exclusives : il est possible que les deux phénomènes aient lieu au cours de l'infection. L'internalisation étant inversement corrélée à la cytotoxicité, il est envisageable que ce phénomène ne soit pas impliqué dans l'invasion des tissus par *P. aeruginosa*, mais soit plutôt un mécanisme de protection contre le système immunitaire, comme observé pour d'autres pathogènes bactériens comme *Salmonella* (Srikanth et al., 2011)

ii. Rôle ambigu du SST3 dans l'internalisation

L'étude menée par Tran et ses collaborateurs soulève une autre question intéressante : dans leur modèle, le SST3 semble être nécessaire à la formation d'agrégats en surface de cellules (Tran et al., 2014b). Ce résultat suggère que le SST3 est capable d'interagir avec le domaine apical des cellules épithéliales, ce qui est en contradiction apparente avec ce qui a été rapporté dans la littérature (Fleiszig et al., 1997; Lee et al., 1999).

D'un point de vue plus global, le rôle du SST3 dans l'internalisation de *P. aeruginosa* est ambigu. Plusieurs groupes rapportent que le SST3 empêche l'internalisation de *P. aeruginosa* dans les cellules épithéliales (Garrity-Ryan et al., 2000; Hauser et al., 1998; Kazmierczak et al., 2001). Au contraire, Tran et ses collaborateurs indiquent que le SST3 est nécessaire à l'internalisation (Tran et al., 2014b), tandis qu'Angus et ses collaborateurs identifient ExoS comme indispensable à la survie de *P. aeruginosa* dans les cellules épithéliales (Angus et al.,

2010). Déterminer quel est le rôle du SST3 dans l'internalisation sera d'une importance capitale pour mieux comprendre ce phénomène.

iii. La transmigration, un phénomène méconnu

La capacité de *P. aeruginosa* à former des biofilms dans le contexte de la mucoviscidose, ou sa capacité à entrer dans les cellules épithéliales, sont des mécanismes qui ont été largement étudiés ces dernières années. En revanche, les mécanismes mis en œuvre par ce pathogène pour franchir l'épithélium au cours de l'infection aiguë sont des phénomènes qui ont été peu étudiés.

Récemment, plusieurs groupes (dont le nôtre) se sont focalisés sur cette question, et ont mis en place des modèles *in vitro* permettant de simuler ce franchissement de l'épithélium (Heiniger et al., 2010; Soong et al., 2008). Ces études mettent en évidence des mécanismes nouveaux d'invasion des tissus, dans lesquels *P. aeruginosa* utilise une voie paracellulaire. A présent, le défi majeur de cet axe de recherche sera de montrer que ces phénomènes ont bien lieu *in vivo*.

g. Mécanismes de renouvellement de l'épithélium pulmonaire

Le modèle le plus pertinent au plan physiopathologique pour observer des infections à *P. aeruginosa* est le modèle d'infection pulmonaire. Le poumon est un organe à l'architecture très complexe, dont les processus de renouvellement de l'épithélium ne sont pas entièrement compris à ce jour. Avant de pouvoir observer le phénomène de transmigration que nous mettons en évidence dans cette étude, il serait important de mieux comprendre ces mécanismes.

Il est maintenant clairement établi que les pneumocytes de type 2 jouent un rôle prépondérant dans le renouvellement de l'épithélium alvéolaire. Ces cellules, dont la fonction principale est de sécréter le surfactant pulmonaire, ont la capacité de s'auto-renouveler en cas de blessure, ainsi que de se différencier en pneumocytes de type 1 (voir Figure 37). Ce mécanisme, appelé « transdifférenciation » a été mis en évidence *in vitro* et *in vivo* (Fehrenbach, 2001). Plus récemment, une population de cellules souches bronchoalvéolaires (Bronchioalveolar Stem

Cells, BASC dans la Figure 37) a été identifiée. Ces cellules, localisées à l'entrée des alvéoles pulmonaires, ont la capacité de se différencier *in vitro* en pneumocytes de types 1 et 2 (AECI et AECII dans la Figure 37) et en cellules club (cellules bronchiales sécrétoires, anciennement appelées cellules de Clara). Leur rôle *in vivo* n'est pour l'instant pas établi.

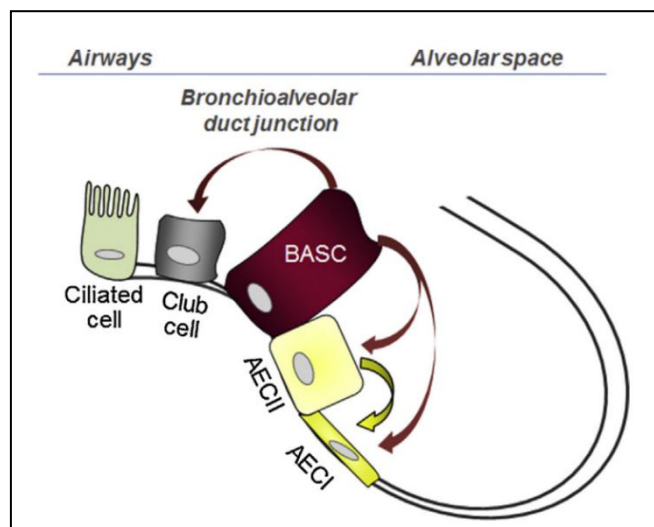


Figure 37 : Mécanisme supposé de renouvellement de l'épithélium pulmonaire (Guillot et al., 2013)

Comprendre comment s'opère le remplacement des pneumocytes de type 1 par les pneumocytes de type 2, et notamment comment l'intégrité de l'épithélium est maintenue, est un prérequis indispensable à l'observation de la transmigration *in vivo*.

h. Modèles *in vivo* envisageables

La majorité des études décrivant l'effet de *P. aeruginosa* sur l'épithélium pulmonaire a été réalisée grâce à des techniques d'histologie. Ces techniques permettent d'observer clairement la destruction de l'architecture des poumons par les bactéries (voir Figure 38).

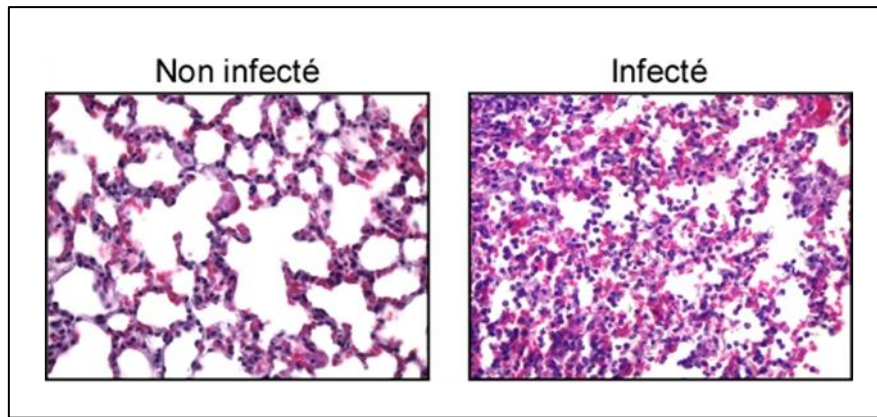


Figure 38 : Histologie de poumons de souris (Gauche) non infectées et (Droite) infectées par P. aeruginosa (données non publiées)

Ces approches ne peuvent cependant pas nous fournir d'informations sur les étapes précoces de l'interaction entre bactéries et cellules. Récemment, une étude menée par Rangel et ses collaborateurs a représenté une avancée importante dans l'exploration de ces phénomènes (Rangel et al., 2015). En combinant des techniques d'histologie au système CCF2/ExoS-βLa, ces auteurs ont pu observer pour la première fois l'injection de la toxine ExoS dans les poumons au cours de l'infection.

Au début de l'infection, un nombre très restreint de pneumocytes sont injectés. Les cellules adjacentes à ces premières cellules sont progressivement injectées, conduisant à la formation de « zones » de cellules injectées (« Fields Of Cell Injection », FOCI) qui s'étendent au cours de l'infection (voir Figure 39).

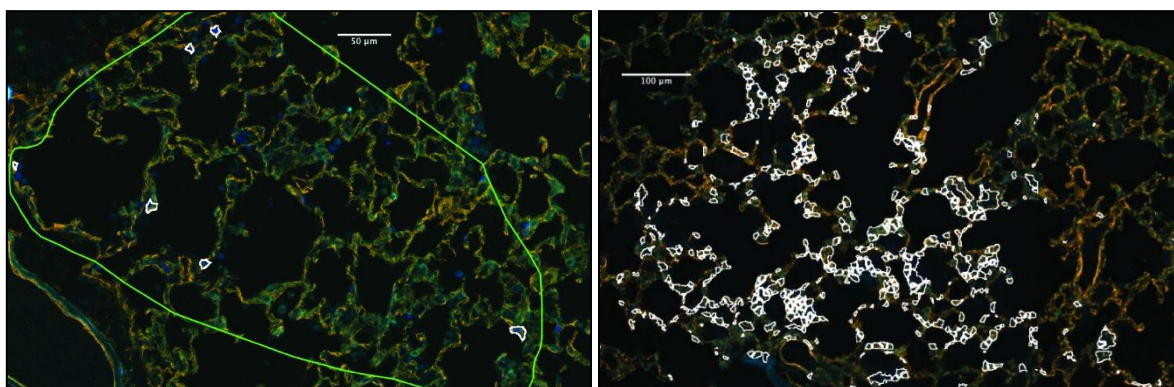


Figure 39 : Injection des pneumocytes au cours de l'infection pulmonaire aiguë. (Gauche) 12h d'infection et (Droite) 23h d'infection (Rangel et al., Plos Pathog 2015). Les cellules injectées sont indiquées en blanc.

D'après ces travaux, les neutrophiles sont les premières cellules prises pour cible par *P. aeruginosa* et son SST3, tandis que les pneumocytes ne sont injectés qu'à des temps plus tardifs, ce qui souligne le fait que l'épithélium pulmonaire est résistant à *P. aeruginosa*. De façon intéressante, Rangel et ses collaborateurs indiquent qu'il y a de nombreuses zones où des bactéries sont présentes sans qu'il y ait injection de l'épithélium. L'injection des premières cellules épithéliales n'est donc pas uniquement liée à la présence de bactéries, mais fait intervenir d'autres facteurs. Il est possible d'imaginer que les divisions cellulaires ou les morts cellulaires sont les événements qui permettent cette première injection.

La transmigration des bactéries à travers l'épithélium que nous décrivons est un processus très dynamique, qu'il sera vraisemblablement impossible à mettre en évidence à partir d'échantillons fixés. L'approche développée par Rangel et ses collaborateurs n'est malheureusement pas envisageable en temps réel pour le moment. Observer le franchissement de la barrière épithéliale directement dans le poumon représente un défi technique majeur.

Alternativement, des modèles *ex vivo* très aboutis ont été développés pour d'autres pathogènes bactériens. Par exemple, un modèle *ex vivo* de villosités intestinales a permis de mettre en évidence le fait que *Listeria monocytogenes*, un pathogène humain intestinal, cible spécifiquement les zones d'extrusion de cellules épithéliales situées à l'extrémité des villosités pour envahir les tissus (Pentecost et al., 2006). Plus récemment, la méthode du « swiss roll » a été appliquée à la visualisation en temps réel de l'infection de l'intestin par la bactérie *S. flexneri* (Arena et al., 2015). Dans ce modèle, l'intestin d'un cochon d'inde infecté par *S. flexneri* est isolé puis enroulé sur lui-même. Cet échantillon *ex vivo* est alors fixé, congelé, puis découpé en sections de 30 µm d'épaisseur (voir Figure 40). Ces sections sont alors observées à l'aide d'un microscope confocal à spinning disk. Chaque section contient donc plusieurs épaisseurs d'épithélium intestinal, ce qui permet de réduire la quantité totale d'images et de localiser facilement les zones d'invasion par *S. flexneri*.

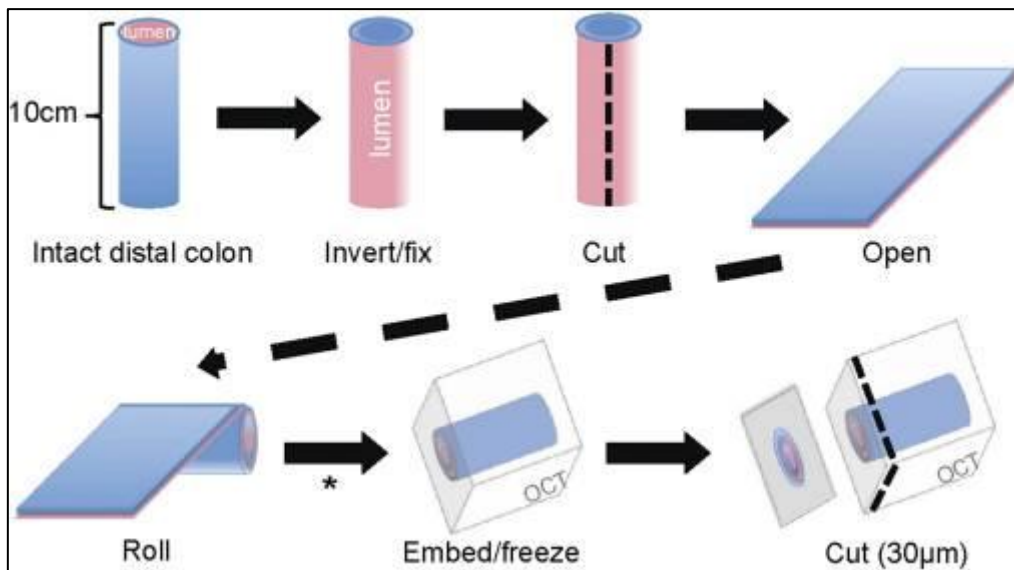


Figure 40 : Préparation d'échantillons *ex vivo* par la méthode du "swiss roll" (Arena et al., 2015)

Un modèle *ex vivo* pourrait peut-être être mis en place pour observer l'infection à *P. aeruginosa* dans des conditions tissulaires plus proches de la réalité.

Conclusion

Pour conclure ce mémoire, je propose un modèle global d'infection aiguë à *P. aeruginosa*, récapitulant les deux études que j'ai menées (voir Figure 41). La situation considérée dans ce modèle est celle où les bactéries se situent initialement du côté apical de cellules épithéliales, ce qui pourrait correspondre à l'infection d'une muqueuse (par exemple une infection pulmonaire).

Nos observations ainsi que celles réalisées par d'autres groupes (Fleiszig et al., 1997) suggèrent que le domaine apical des cellules épithéliales est réfractaire à l'infection par *P. aeruginosa*, car l'injection des toxines du SST3 y est impossible. De plus, la E-cadhérine des jonctions intercellulaires est résistante à l'action protéolytique des protéases sécrétées par *P. aeruginosa* (Golovkine et al., 2014), rendant la barrière épithéliale infranchissable par les bactéries.

Les résultats de la seconde étude décrite dans ce manuscrit montrent que le franchissement de la barrière épithéliale par les bactéries peut s'opérer à des sites de divisions cellulaires ou de morts cellulaires (ce cas de figure n'est pas représenté dans la Figure 41). A ces sites précis, *P. aeruginosa* est en mesure d'accéder aux domaines baso-latéraux des cellules, où l'injection des toxines du SST3 peut s'opérer.

Cet évènement permet à *P. aeruginosa* d'accéder à la lame basale, une matrice de protéine principalement composée de collagène, de laminine et de fibronectine. Nous pouvons supposer que la lame basale ne constitue pas une barrière efficace contre *P. aeruginosa*, car ses composants principaux sont dégradés *in vitro* par l'action de protéases du SST2 de *P. aeruginosa* (Beaufort et al., 2011).

La dégradation de la membrane basale permet aux bactéries d'accéder au domaine basal des cellules endothéliales, où l'injection des toxines du SST3 peut s'opérer directement. La forte rétraction cellulaire médiée par ces toxines entraîne alors une rupture de l'intégrité de l'endothélium, qui permet aux bactéries d'accéder au sang.

Les bactéries sont alors capables de disséminer dans le système sanguin. La dégradation des jonctions endothéliales engendrée par la protéase LasB permet aux bactéries de coloniser

d'autres tissus et organes, entraînant une aggravation importante de l'état de santé du patient infecté.

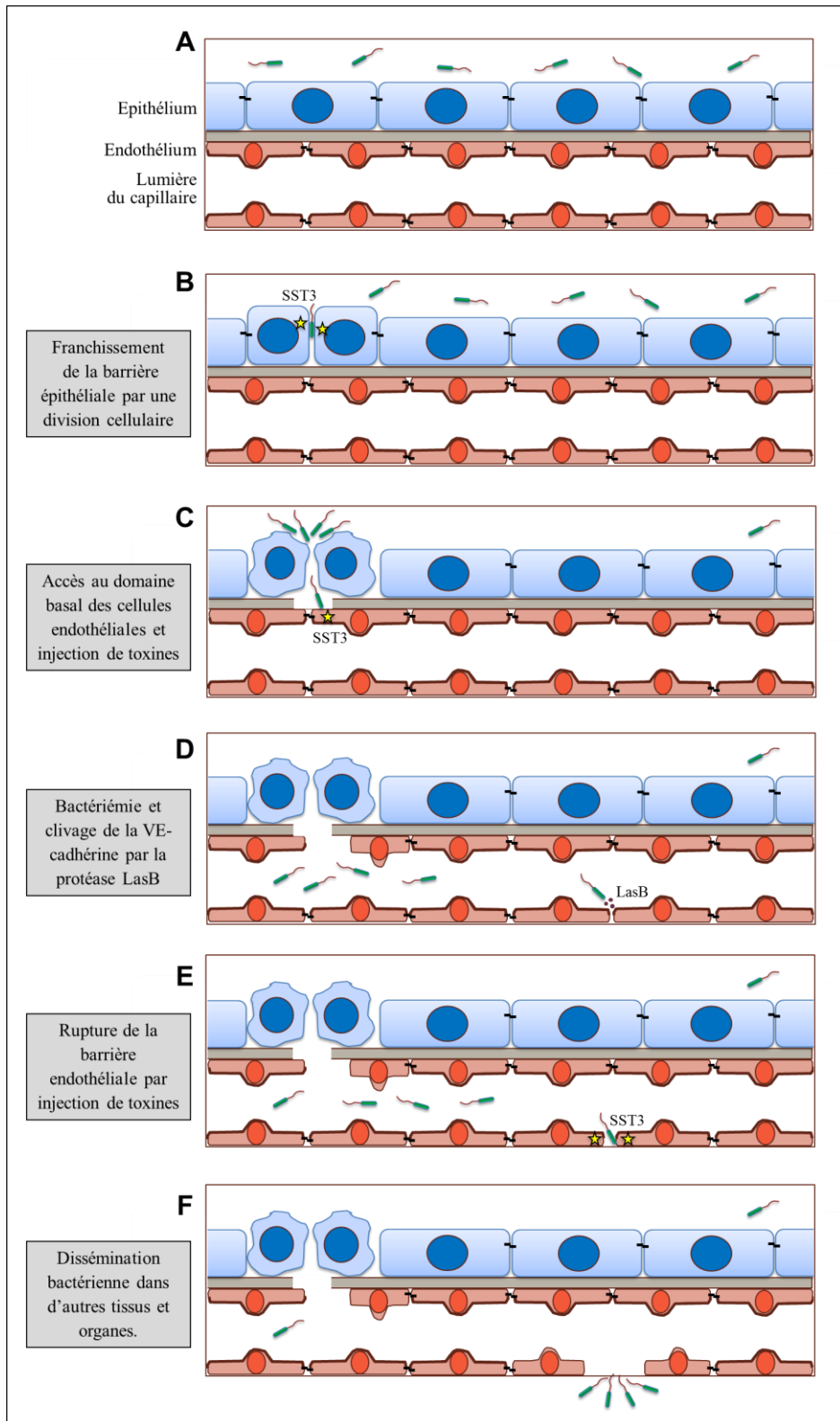


Figure 41 : Mécanisme proposé de franchissement des barrières épithéliales et endothéliales par P. aeruginosa au cours de l'infection aiguë.

Pourtant, ce modèle, basé majoritairement sur des études *in vitro*, ne récapitule sans doute pas la complexité d'une infection *in vivo*. Plusieurs pistes pourraient être suivies pour l'améliorer.

En ce qui concerne l'étude menée sur l'endothélium, une notion importante qui n'a pas été abordée est celle de flux sanguin. Dans notre modèle *in vitro*, nous montrons que LasB dégrade la VE-cadhérine des cellules endothéliales. Cependant, il est possible qu'en situation réelle de bactériémie, les flux sanguins empêchent l'accumulation locale d'une concentration de LasB suffisante pour que cette activité de protéolyse s'exerce. Les systèmes microfluidiques de culture cellulaire développés récemment par plusieurs sociétés pourraient s'avérer être des outils permettant d'enrichir notre étude, car ils nous permettraient d'appliquer un flux contrôlé de milieu de culture en surface de nos cellules et de vérifier si le clivage de la VE-cadhérine s'opère dans ces conditions.

Plusieurs pistes d'amélioration sont envisageables pour le modèle d'épithélium. Nous pourrions par exemple utiliser d'autres types cellulaires (ayant une morphologie différente), ou modifier la composition du milieu de culture pour simuler la présence de mucus ou de surfactant. Une autre perspective intéressante serait de miniaturiser l'approche de microscopie que nous utilisons afin de concevoir un « test de transmigration ». Nous pourrions alors tester des banques de mutants de *P. aeruginosa*, ce qui pourrait potentiellement nous permettre d'identifier de nouveaux facteurs de virulence qui échappent aux criblages classiquement réalisés (relargage de LDH, mesure de rétraction cellulaire, etc.). Des expériences préliminaires menées en plaques 96 puits suggèrent qu'une telle miniaturisation est possible (données non publiées).

Il est évident que certains aspects de l'infection ne pourront pas être pris en compte dans des modèles *in vitro*. En particulier, le système immunitaire, qui joue un rôle prépondérant au cours de l'infection, ne pourra pas y être intégré. Pour de nombreux pathogènes tels que *Salmonella*, *Listeria* ou *Neisseria*, le développement d'approches d'imagerie *in vivo* ou *ex vivo* a été une étape indispensable à la compréhension des mécanismes de franchissement des barrières tissulaires au cours de l'infection. Les mêmes développements sont maintenant nécessaires pour *P. aeruginosa*.

Bien que notre vision globale du processus de transmigration de *P. aeruginosa* à travers les barrières épithéliales et endothéliales soit encore parcellaire, les deux études décrites dans ce

manuscrit nous permettent cependant d'envisager plusieurs pistes thérapeutiques intéressantes.

La perspective la plus évidente issue de l'étude sur l'endothélium serait de bloquer l'activité de LasB. Actuellement, plusieurs groupes travaillent à la création de peptides inhibant ce facteur de virulence (Cathcart et al., 2011; Hirakawa et al., 2012). Certains peptides issus de ces travaux pourraient être testés dans notre modèle. Alternativement, nous pourrions synthétiser un peptide correspondant à la séquence de la VE-cadhérine reconnue par LasB, ce qui pourrait avoir une activité protectrice au cours de l'infection.

L'étude menée sur l'épithélium nous permet également d'envisager plusieurs pistes thérapeutiques. La première approche que nous avons envisagée a été de tenter de bloquer la division cellulaire pour montrer son rôle prépondérant dans la transmigration bactérienne. Cependant, cette solution nous semble très peu susceptible d'être exploitable. En effet, dans les muqueuses, les divisions cellulaires correspondent à un phénomène physiologique en réponse à un endommagement tissulaire. Bloquer ce phénomène reviendrait à bloquer les processus de réparation de la monocouche épithéliale. Une approche plus intéressante serait de bloquer les facteurs de virulence de *P. aeruginosa*. A ce jour, cette approche est considérée comme une alternative intéressante aux antibiotiques, car elle est moins susceptible d'entraîner l'apparition de phénomènes de résistance chez les bactéries. Dans cette étude, nous identifions 3 facteurs de virulence (le SST3, les pili et le flagelle) dont la suppression permet d'abolir la transmigration de *P. aeruginosa*. Le SST3 est une cible thérapeutique déjà clairement établie, pour laquelle il existe déjà une recherche active d'inhibiteurs chimiques ou d'anticorps (Aiello et al., 2010; Baer et al., 2009; Bowlin et al., 2014). De même, un nombre croissant d'études démontrent l'importance des pili de type IV dans de nombreux processus tels que l'adhésion des bactéries, leur mobilité, ou encore la régulation de la virulence (Persat et al., 2015), faisant de ces appendices extracellulaires des cibles thérapeutiques incontournables. Enfin, nous mettons en évidence l'importance du flagelle sur la transmigration des bactéries. Perturber la nage, en modifiant les signaux chimiotactiques par exemple, pourrait avoir des retombées thérapeutiques importantes, à condition de pouvoir identifier au préalable le signal impliqué.


Annexes

Annexe 1 : Lettre scientifique de l'iRTSV

N°42

Septembre 2014

La lettre scientifique de l'institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant est une lettre électronique bimensuelle dont l'objectif est de faire connaître à l'ensemble de l'institut les nouvelles découvertes réalisées par chaque laboratoire. L'article publié dans PLoS pathogens a fait l'objet d'une rubrique dans la lettre n°42, publiée en septembre 2014.



L'équipe Pathogenèse Bactérienne et Réponses Cellulaire du Laboratoire Biologie du Cancer et de l'Infection cherche à élucider les mécanismes de franchissement de la barrière vasculaire par *Pseudomonas aeruginosa* au cours d'infections aiguës. La barrière vasculaire est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales qui tapissent les vaisseaux sanguins. Le système de sécrétion de type 3 a été décrit précédemment comme le facteur de virulence majeur de *Pseudomonas*, induisant une rapide rétraction cellulaire (Figure). Ce système est connu pour avoir une affinité plus grande pour le domaine basal des cellules. Les chercheurs de l'équipe ont mis en évidence un mécanisme inédit de coopération entre ce système de sécrétion et une protéase, LasB, libérée dans le milieu extracellulaire. Ils ont montré que LasB clivait la VE-cadhérine, une protéine essentielle des jonctions cellulaires, induisant ainsi une rupture de la barrière vasculaire endothéliale. Les bactéries peuvent ainsi accéder au domaine basal et injecter les toxines du système de sécrétion de type 3.

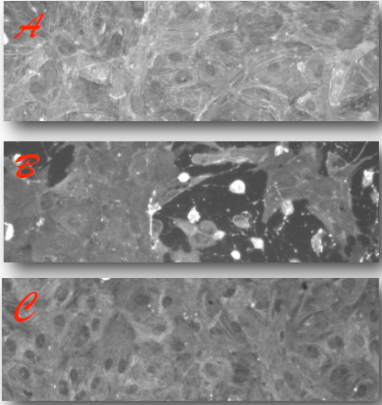
Pseudomonas à l'assaut des jonctions cellulaires

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène bactérien responsable d'infections nosocomiales. Certaines de ces infections sont dites aiguës. Au cours de celles-ci, *Pseudomonas* va rapidement franchir les différentes barrières de l'organisme et se disséminer par le système sanguin. Alors que de nombreuses souches de *Pseudomonas* résistantes aux antibiotiques font leur apparition en milieu hospitalier, certains mécanismes de l'infection restent incompris.

Cette étude montre que les facteurs de virulence bactériens, généralement étudiés indépendamment, coopèrent pour augmenter la virulence. De nouveaux inhibiteurs pharmacologiques bloquant LasB pourraient permettre de ralentir la dissémination de ce pathogène dans l'organisme.

Contacts : [Guillaume Golovkine](#) et [Philippe Huber](#)
[BCI](#)
 Laboratoire Biologie du Cancer et de l'Infection
 UMR_S 1036 - CEA - Inserm - UJF

Référence
 Golovkine G, Faudry E, Bouillot S, Voulhoux R, Attée I and Huber P. VE-cadherin cleavage by LasB protease from *Pseudomonas aeruginosa* facilitates Type III Secretion System toxicity in endothelial cells. *PLoS Pathogens*. 2014



A - Cellules endothéliales B - Cellules endothéliales après 3 heures d'infection par une souche sauvage de *Pseudomonas*. C - infection par un mutant sans LasB.

Annexe 2 : Faits marquants de la DSV

L'article publié dans PLoS pathogens a également fait l'objet d'un communiqué dans les « Faits Marquants » de la Direction des Sciences du Vivant du CEA, en Octobre 2014.

La boîte à outils de *Pseudomonas*



CDC/Janice Haney Carr

Une équipe du CEA-IRTSV montre que deux facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* coopèrent pour assurer la dissémination de cette bactérie dans l'organisme et renforcer sa toxicité.

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie responsable d'infections nosocomiales graves, en particulier chez les personnes atteintes de mucoviscidose, ainsi que chez les porteurs de dispositifs médicaux implantés (cathéters, chambres d'injection, etc.). C'est un agent pathogène d'autant plus préoccupant que beaucoup de souches hospitalières sont devenues multi-résistantes aux antibiotiques. Son principal facteur de virulence, un système appelé SST3, injecte des toxines à l'intérieur des cellules cibles grâce à une seringue moléculaire. *Pseudomonas* dispose également d'un SST2, un système qui libère des enzymes dans le milieu extracellulaire, avec un effet pathogène moins puissant que celui du SST3. Toutefois, pour atteindre le sang et provoquer une infection généralisée, la bactérie doit au préalable franchir différentes barrières tissulaires.

Des chercheurs de l'IRTSV ont ainsi voulu comprendre comment *Pseudomonas* traverse la barrière vasculaire, cette monocouche de cellules endothéliales tapissant la paroi interne des vaisseaux sanguins. À l'aide de bactéries mutantes dépourvues (ou non) de SST2, ils ont montré sur des cultures primaires de cellules endothéliales humaines que ce dernier favorise l'activité toxique du SST3, provoque une rupture de la monocouche cellulaire et accélère l'infection. Comment ? Une des enzymes secrétées, une protéase appelée LasB, clive la protéine membranaire assurant la jonction entre cellules endothéliales, dite VE-cadhérine. L'équipe a ensuite confirmé ces résultats *in vivo* chez un modèle rongeur d'infection pulmonaire aiguë.

SUR LE MÊME THÈME

01/06/2015
Une nouvelle immunothérapie pour les cancers urologiques

09/04/2015
Fabriquer in vitro des anticorps pleinement humains

16/02/2015
Un filtre sanguin pour barrer la route aux prions

12/02/2015
Une autre chimie pour les antibiotiques de nouvelle génération

06/01/2015
La médaille Louis Pasteur 2014 récompense une contribution majeure à la compréhension des génomes bactériens et de leur métabolisme

[Voir plus](#)



Cellules endothéliales exposées au SST2, sans LasB (gauche) ou avec LasB (droite). Dans ce dernier cas, les jonctions (VE-cadhérine, vert) ont disparu (étoile) ou sont résiduelles (flèches).

Les chercheurs proposent donc un modèle inédit de coopération entre ces deux systèmes de virulence, considérés jusqu'ici comme indépendants et étudiés séparément. En clivant la VE-cadhérine, le SST2 serait responsable de la dissociation des jonctions endothéliales, ouvrant ainsi la voie à *Pseudomonas* et à son redoutable système SST3. L'équipe cherche maintenant à comprendre comment cette bactérie peut traverser un autre type de tissu, l'épithélium, formant entre autres la peau et les muqueuses.

RÉFÉRENCES

> [VE-Cadherin Cleavage by LasB Protease from *Pseudomonas aeruginosa* Facilitates Type III Secretion System Toxicity in Endothelial Cells, Plos Pathogens, 2014](#)

Annexe 3 : Poster présenté lors de la conférence « Pseudomonas 2013 » à Lausanne du 7 au 11 Septembre 2013.

VE-cadherin cleavage by LasB protease from *Pseudomonas aeruginosa* facilitates Type III secretion system toxicity in endothelial cells

Guillaume Golovkine^{1,2,3,4}, Eric Faudry^{1,2,3,4}, Stéphanie Bouillot^{1,2,3,4}, Romé Voulhoux⁵, Ina
Attrée^{1,2,3,4}, Philippe Huber^{1,2,3,4}

¹ INSERM, U1036, Biology of Cancer and Infection, Grenoble, France,

² CNRS, ERL 5261, Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses, Grenoble, France,

³ Université Joseph Fourier-Grenoble I, Grenoble, France,

⁴ CEA, DSV/iRTSV, Grenoble, France,

⁵ CNRS and Aix-Marseille Univ, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires
(UMR7255), Marseille, France

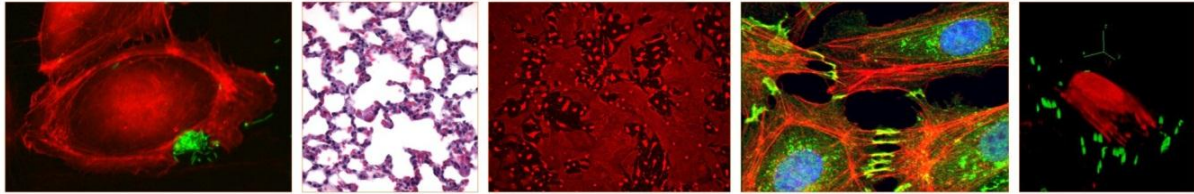
Abstract :

Infection of the vascular system by *Pseudomonas aeruginosa* occurs during bacterial dissemination in the body or in blood-borne infections. Like most Gram-negative bacteria, *P. aeruginosa* utilizes several virulence factors during the infection process. The mortality of model animals was attributed to two major virulence determinants, the type 3 secretion system (T3SS) and the type 2 secretion system (T2SS).

The T3SS injects toxins directly into the cytoplasm of target cells. These toxins induce actin cytoskeleton dismantlement, focal adhesion loss and thus a massive cell retraction when injected into endothelial cells (Huber et al., 2014).

P. aeruginosa also delivers various toxins in the extracellular milieu by the T2SS, including the protease LasB. Here, we investigated whether the T2SS of *P. aeruginosa* also plays a role in endothelial cell intoxication and vascular barrier breakdown.

Ce Poster a également été présenté du Vivant le 24 Avril 2014 à la journée annuelle des doctorants de l'Ecole Doctorale de Chimie et Science de Grenoble, et a obtenu le prix du meilleur poster dans la catégorie « Microbiologie ».



VE-cadherin cleavage by LasB protease from *Pseudomonas aeruginosa* facilitates Type III secretion system toxicity in endothelial cells

Guillaume Golovkine^{1,2,3,4}, Eric Faudry^{1,2,3,4}, Stéphanie Bouillot^{1,2,3,4}, Romé Voulhoux⁵, Ina Attrée^{1,2,3,4}, Philippe Huber^{1,2,3,4}

¹INSERM, U1036, Biology of Cancer and Infection, Grenoble, France, ²CNRS, ERL 5261, Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses, Grenoble, France, ³Université Joseph Fourier-Grenoble I, Grenoble, France, ⁴CEA, DSV/IRTSV, Grenoble, France, ⁵CNRS and Aix-Marseille Univ, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires (UMR7255), Marseille, France

Contact : guillaume.golovkine@cea.fr

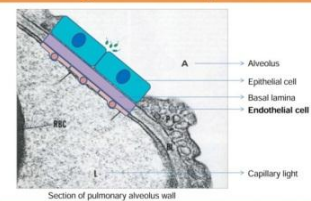
Introduction

Infection of the vascular system by *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) occurs during bacterial dissemination in the body or in blood-borne infections. Like most Gram-negative bacteria, *P. aeruginosa* utilizes several virulence factors during the infection process. The mortality of model animals was attributed to two major virulence determinants, the **type 3 secretion system** (T3SS) and the **type 2 secretion system** (T2SS).

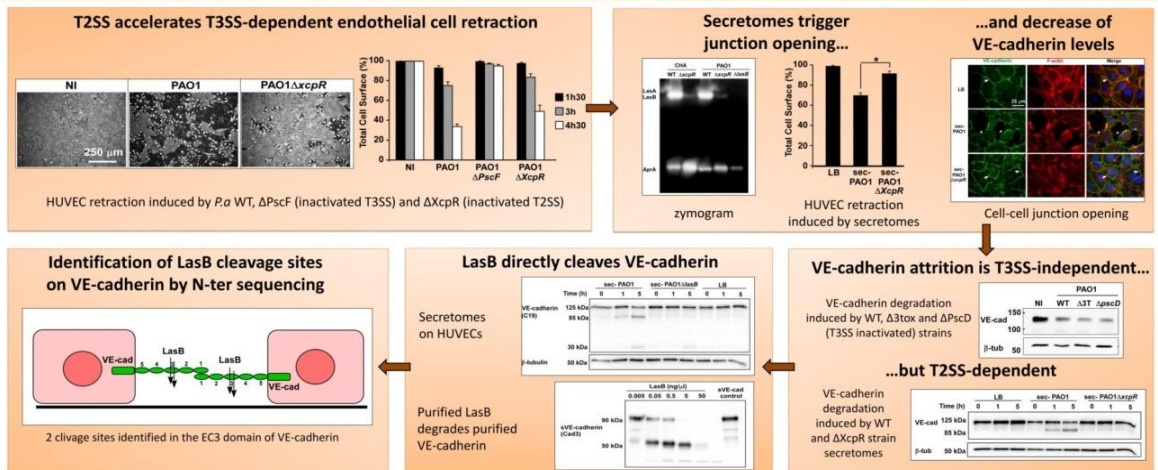
The T3SS injects toxins directly into the cytoplasm of target cells. These toxins induce actin cytoskeleton dismantlement, focal adhesion loss and thus a massive cell retraction when injected into endothelial cells (Huber et al. Cell Mol Life Sci, 2013).

Pa also delivers various toxins in the extracellular milieu by the T2SS, including the protease LasB. Here, we investigated whether the T2SS of *P. aeruginosa* also plays a role in **endothelial cell intoxication** and **vascular barrier breakdown**.

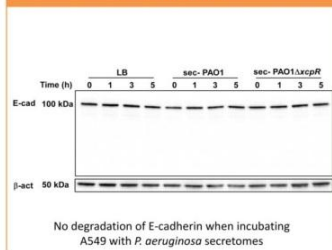
Breaking of the body barriers



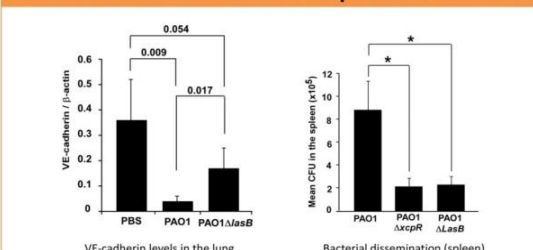
LasB directly cleaves VE-cadherin in endothelial cells



LasB does not proteolyse E-cadherin

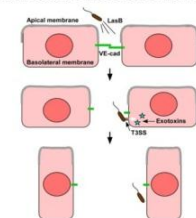


Lung VE-cadherin levels and bacterial dissemination are decreased in a mouse acute pneumonia model



Conclusion :

T2SS and T3SS cooperate to intoxicate endothelial cells



Golovkine et al. Plos Pathog, 2014

Annexe 4 : Poster présenté lors de la
Gordon Research Conference sur la
thématique : « Microbial Adhesion and
Signal Transduction » du 25 au 31 Juillet
2015.

Breaking through epithelial monolayers by *Pseudomonas aeruginosa*

Golovkine G, Faudry E, Bouillot S, Elsen S, Attrée I and Huber P.

INSERM, U1036, Biology of Cancer and Infection, Grenoble, France

CNRS, ERL 5261, Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses, Grenoble, France

Université Grenoble-Alpes, Grenoble, France

CEA, DSV/iRTSV, Grenoble, France

Abstract :

Pseudomonas aeruginosa is a human opportunistic pathogen and one of the most important causal agents of nosocomial infections. Despite extensive study, we currently lack information on the exact mechanisms used by this bacterium to transmigrate across epithelial tissues, and the entry sites it uses.

Here, using real-time microscopy and a model epithelial barrier, we show that *P. aeruginosa* employs a paracellular route to transmigrate at cell division and senescent cell extrusion sites. The basal compartment is then invaded radially from the initial penetration site. Effective transmigration and propagation require type IV pili, the type 3 secretion system (T3SS) and a flagellum. In the basal compartment, the bacteria inject the T3SS toxins into host cells, disrupting the cytoskeleton and focal contacts, and making their progression under the cells possible. The bacterial propagation mechanism is related to twitching motility.

Thus, *P. aeruginosa* exploits intrinsic host cell processes to breach the epithelium and invade the subcellular compartment.

Breaking through epithelial monolayers by *Pseudomonas aeruginosa*

Guillaume Golovkine, Stéphanie Bouillot, Eric Faudry, Sylvie Elsen, Ina Attrée, Philippe Huber

INSERM, U1036, Biology of Cancer and Infection, Grenoble, France
Université Grenoble-Alpes, Grenoble, France

CNRS, ERL 5261, Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses, Grenoble, France
CEA, DSV/IRTSV, Grenoble, France

Contact : guillaume.golovkine@cea.fr

Introduction

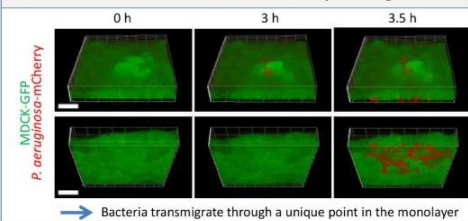
Pseudomonas aeruginosa is a human opportunistic pathogen, responsible of severe hospital-acquired acute infections. In this type of infections, *P. aeruginosa* crosses tissue barriers and disseminates in the body. In general, the first tissue barrier of the human body exposed to the bacteria is an epithelial layer.

Unlike for other pathogens, the mechanisms of **transmigration across the epithelial barrier** by *P. aeruginosa* remain controversial, and have never been assessed in **real time imaging**.

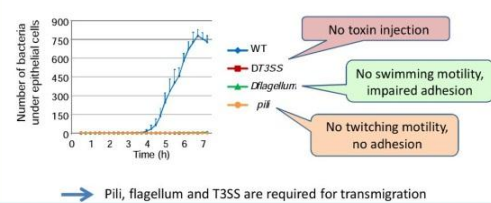
Here, we investigate this phenomenon using MDCK cells as an epithelial barrier model. We also studied the role of the main bacterial virulence factors in this process. We focused on the **Type 3 secretion system (T3SS)**, the major virulence determinant of *P. aeruginosa*, and two motility factors, the **flagellum** and the **pili**.

3D confocal videomicroscopy of *P. aeruginosa* transmigration across a monolayer of epithelial cells

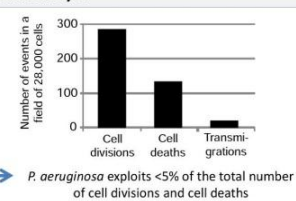
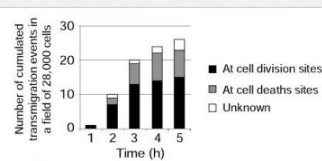
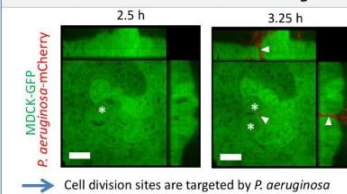
3D reconstruction of MDCK-GFP infected by *P. aeruginosa*-mCherry



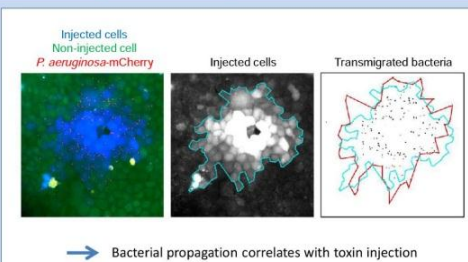
Transmigration depends on several *P. aeruginosa*'s virulence factors



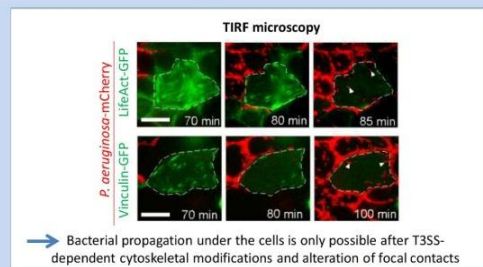
P. aeruginosa exploits cell division and senescent cell extrusion to cross the monolayer



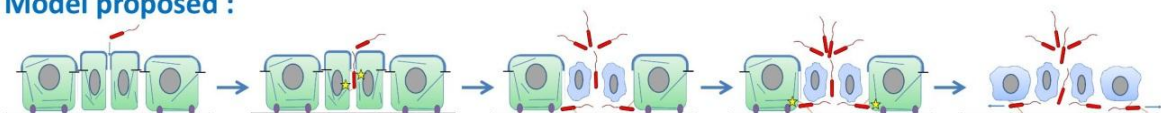
Toxin injection occurs on the basal side of MDCK



T3SS affects actin cytoskeleton and focal contacts



Model proposed :



Bibliographie

-A-

Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., and Chihib, N.E. (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. Archives of microbiology 196, 453-472.

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. Antimicrobial agents and chemotherapy 54, 1988-1999.

Aird, W.C. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. Circulation research 100, 158-173.

Alhede, M., Bjarnsholt, T., and Givskov, M. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: mechanisms of immune evasion. Advances in applied microbiology 86, 1-40.

Alm, R.A., and Mattick, J.S. (1995). Identification of a gene, pilV, required for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*, whose product possesses a pre-pilin-like leader sequence. Molecular microbiology 16, 485-496.

Amiel, E., Lovewell, R.R., O'Toole, G.A., Hogan, D.A., and Berwin, B. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* evasion of phagocytosis is mediated by loss of swimming motility and is independent of flagellum expression. Infection and immunity 78, 2937-2945.

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. Infection and immunity 78, 4500-4510.

Angus, D.C., and van der Poll, T. (2013). Severe sepsis and septic shock. The New England journal of medicine 369, 840-851.

Anyan, M.E., Amiri, A., Harvey, C.W., Tierra, G., Morales-Soto, N., Driscoll, C.M., Alber, M.S., and Shrout, J.D. (2014). Type IV pili interactions promote intercellular association and moderate swarming of *Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111, 18013-18018.

Arena, E.T., Campbell-Valois, F.X., Tinevez, J.Y., Nigro, G., Sachse, M., Moya-Nilges, M., Nothelfer, K., Marteyn, B., Shorte, S.L., and Sansonetti, P.J. (2015). Bioimage analysis of *Shigella* infection reveals targeting of colonic crypts. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 112, E3282-3290.

-B-

Baer, M., Sawa, T., Flynn, P., Luehrsen, K., Martinez, D., Wiener-Kronish, J.P., Yarranton, G., and Bebbington, C. (2009). An engineered human antibody fab fragment specific for *Pseudomonas aeruginosa* PcrV antigen has potent antibacterial activity. Infection and immunity 77, 1083-1090.

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*. American journal of physiology Cell physiology 297, C263-277.

Balczon, R., Prasain, N., Ochoa, C., Prater, J., Zhu, B., Alexeyev, M., Sayner, S., Frank, D.W., and Stevens, T. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin Y-mediated tau hyperphosphorylation impairs microtubule assembly in pulmonary microvascular endothelial cells. PLoS one 8, e74343.

- Balloy, V., Verma, A., Kuravi, S., Si-Tahar, M., Chignard, M., and Ramphal, R. (2007). The role of flagellin versus motility in acute lung disease caused by *Pseudomonas aeruginosa*. The Journal of infectious diseases 196, 289-296.
- Bardoel, B.W., van der Ent, S., Pel, M.J., Tommassen, J., Pieterse, C.M., van Kessel, K.P., and van Strijp, J.A. (2011). *Pseudomonas* evades immune recognition of flagellin in both mammals and plants. PLoS pathogens 7, e1002206.
- Barken, K.B., Pamp, S.J., Yang, L., Gjermansen, M., Bertrand, J.J., Klausen, M., Givskov, M., Whitchurch, C.B., Engel, J.N., and Tolker-Nielsen, T. (2008). Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Environmental microbiology 10, 2331-2343.
- Bazzoni, G., and Dejana, E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. Physiological reviews 84, 869-901.
- Beaufort, N., Corvazier, E., Hervieu, A., Choqueux, C., Dussiot, M., Louedec, L., Cady, A., de Bentzmann, S., Michel, J.B., and Pidard, D. (2011). The thermolysin-like metalloproteinase and virulence factor LasB from pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* induces anoikis of human vascular cells. Cellular microbiology 13, 1149-1167.
- Beaufort, N., Corvazier, E., Mlanaoindrou, S., de Bentzmann, S., and Pidard, D. (2013). Disruption of the endothelial barrier by proteases from the bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: implication of matrilysin and receptor cleavage. PloS one 8, e75708.
- Beaussart, A., Baker, A.E., Kuchma, S.L., El-Kirat-Chatel, S., O'Toole, G.A., and Dufrene, Y.F. (2014). Nanoscale adhesion forces of *Pseudomonas aeruginosa* type IV Pili. ACS nano 8, 10723-10733.
- Beckert, U., Wolter, S., Hartwig, C., Bahre, H., Kaever, V., Ladant, D., Frank, D.W., and Seifert, R. (2014). ExoY from *Pseudomonas aeruginosa* is a nucleotidyl cyclase with preference for cGMP and cUMP formation. Biochemical and biophysical research communications 450, 870-874.
- Belas, R. (2014). Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. Trends in microbiology 22, 517-527.
- Bleves, S., Sana, T.G., and Voulhoux, R. (2014). The target cell genus does not matter. Trends in microbiology 22, 304-306.
- 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. International journal of medical microbiology : IJMM 300, 534-543.
- Bonazzi, M., and Cossart, P. (2011). Impenetrable barriers or entry portals? The role of cell-cell adhesion during infection. The Journal of cell biology 195, 349-358.
- Bouillot, S., Attree, I., and Huber, P. (2015). Pharmacological activation of Rap1 antagonizes the endothelial barrier disruption induced by exotoxins ExoS and ExoT of *Pseudomonas aeruginosa*. Infection and immunity 83, 1820-1829.
- Bouis, D., Hospers, G.A., Meijer, C., Molema, G., and Mulder, N.H. (2001). Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. Angiogenesis 4, 91-102.
- Bowlin, N.O., Williams, J.D., Knoten, C.A., Torhan, M.C., Tashjian, T.F., Li, B., Aiello, D., Meccas, J., Hauser, A.R., Peet, N.P., et al. (2014). Mutations in the *Pseudomonas aeruginosa* needle protein

gene *pscF* confer resistance to phenoxyacetamide inhibitors of the type III secretion system. Antimicrobial agents and chemotherapy 58, 2211-2220.

Boyer, L., Doye, A., Rolando, M., Flatau, G., Munro, P., Gounon, P., Clement, R., Pulcini, C., Popoff, M.R., Mettouchi, A., et al. (2006). Induction of transient macroapertures in endothelial cells through RhoA inhibition by *Staphylococcus aureus* factors. The Journal of cell biology 173, 809-819.

Breidenstein, E.B., de la Fuente-Nunez, C., and Hancock, R.E. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. Trends in microbiology 19, 419-426.

Breviario, F., Caveda, L., Corada, M., Martin-Padura, I., Navarro, P., Golay, J., Introna, M., Gulino, D., Lampugnani, M.G., and Dejana, E. (1995). Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 15, 1229-1239.

Bruzaud, J., Tarrade, J., Coudreuse, A., Canette, A., Herry, J.M., Taffin de Givenchy, E., Darmanin, T., Guittard, F., Guilbaud, M., and Bellon-Fontaine, M.N. (2015). Flagella but not type IV pili are involved in the initial adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to hydrophobic or superhydrophobic surfaces. Colloids and surfaces B, Biointerfaces 131, 59-66.

Bucior, I., Pielage, J.F., and Engel, J.N. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* pili and flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium. PLoS pathogens 8, e1002616.

Bucior, I., Tran, C., and Engel, J. (2014). Assessing *Pseudomonas* virulence using host cells. Methods Mol Biol 1149, 741-755.

Burrows, L.L. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action. Annu Rev Microbiol 66, 493-520.

-C-

Caiazza, N.C., Shanks, R.M., and O'Toole, G.A. (2005). Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of bacteriology 187, 7351-7361.

Campbell, I.D., and Humphries, M.J. (2011). Integrin structure, activation, and interactions. Cold Spring Harbor perspectives in biology 3.

Cao, X., Surma, M.A., and Simons, K. (2012). Polarized sorting and trafficking in epithelial cells. Cell research 22, 793-805.

Carayol, N., and Tran Van Nhieu, G. (2013). Tips and tricks about *Shigella* invasion of epithelial cells. Current opinion in microbiology 16, 32-37.

Cathcart, G.R., Quinn, D., Greer, B., Harriott, P., Lynas, J.F., Gilmore, B.F., and Walker, B. (2011). Novel inhibitors of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor LasB: a potential therapeutic approach for the attenuation of virulence mechanisms in pseudomonal infection. Antimicrobial agents and chemotherapy 55, 2670-2678.

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. Infection and immunity 77, 2065-2075.

Chi, E., Mehl, T., Nunn, D., and Lory, S. (1991). Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with A549 pneumocyte cells. Infection and immunity 59, 822-828.

- Clermont, Y., Lalli, M., and Bencsath-Makkai, Z. (2009). Light-Microscopic Histology Atlas. Disponible sur : http://audilab.bmed.mcgill.ca/HA/html/resp_21_F.html.
- Colvin, K.M., Irie, Y., Tart, C.S., Urbano, R., Whitney, J.C., Ryder, C., Howell, P.L., Wozniak, D.J., and Parsek, M.R. (2012). The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. Environmental microbiology 14, 1913-1928.
- Comolli, J.C., Hauser, A.R., Waite, L., Whitchurch, C.B., Mattick, J.S., and Engel, J.N. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity in vitro and virulence in a mouse model of acute pneumonia. Infection and immunity 67, 3625-3630.
- Conrad, J.C., Gibiansky, M.L., Jin, F., Gordon, V.D., Motto, D.A., Mathewson, M.A., Stopka, W.G., Zelasko, D.C., Shrout, J.D., and Wong, G.C. (2011). Flagella and pili-mediated near-surface single-cell motility mechanisms in *P. aeruginosa*. Biophysical journal 100, 1608-1616.
- Copreni, E., Castellani, S., Bagnacani, A., Colombo, A., Rizzuti, T., Di Gioia, S., Colombo, C., and Conese, M. (2010). Bacterial internalization is not sufficient to clear *Pseudomonas aeruginosa* infection in human fetal airway xenografts. Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research 16, BR361-366.
- Corada, M., Liao, F., Lindgren, M., Lampugnani, M.G., Breviario, F., Frank, R., Muller, W.A., Hicklin, D.J., Bohlen, P., and Dejana, E. (2001). Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability. Blood 97, 1679-1684.
- Corr, S.C., Gahan, C.C., and Hill, C. (2008). M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. FEMS immunology and medical microbiology 52, 2-12.
- Costa, A.M., Leite, M., Seruca, R., and Figueiredo, C. (2013). Adherens junctions as targets of microorganisms: a focus on *Helicobacter pylori*. FEBS letters 587, 259-265.
- Coureuil, M., Join-Lambert, O., Lecuyer, H., Bourdoulous, S., Marullo, S., and Nassif, X. (2013). Pathogenesis of meningococemia. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 3.
- Coureuil, M., Mikaty, G., Miller, F., Lecuyer, H., Bernard, C., Bourdoulous, S., Dumenil, G., Mege, R.M., Weksler, B.B., Romero, I.A., et al. (2009). Meningococcal type IV pili recruit the polarity complex to cross the brain endothelium. Science 325, 83-87.
- Cox, C.D. (1986). Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin. Infection and immunity 52, 263-270.
- Cullen, L., and McClean, S. (2015). Bacterial Adaptation during Chronic Respiratory Infections. Pathogens 4, 66-89.

-D-

- Dando, S.J., Mackay-Sim, A., Norton, R., Currie, B.J., St John, J.A., Ekberg, J.A., Batzloff, M., Ulett, G.C., and Beacham, I.R. (2014). Pathogens penetrating the central nervous system: infection pathways and the cellular and molecular mechanisms of invasion. Clinical microbiology reviews 27, 691-726.
- Darling, K.E., Dewar, A., and Evans, T.J. (2004). Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by polarized respiratory epithelial cells. Cellular microbiology 6, 521-533.

Darling, K.E., and Evans, T.J. (2003). Effects of nitric oxide on *Pseudomonas aeruginosa* infection of epithelial cells from a human respiratory cell line derived from a patient with cystic fibrosis. Infection and immunity 71, 2341-2349.

David, A., Risitano, D.C., Mazzeo, G., Sinardi, L., Venuti, F.S., and Sinardi, A.U. (2005). Central venous catheters and infections. Minerva anesthesiologica 71, 561-564.

de Bentzmann, S., Roger, P., and Puchelle, E. (1996). *Pseudomonas aeruginosa* adherence to remodelling respiratory epithelium. The European respiratory journal 9, 2145-2150.

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

Diaz, M.H., Shaver, C.M., King, J.D., Musunuri, S., Kazzaz, J.A., and Hauser, A.R. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* induces localized immunosuppression during pneumonia. Infection and immunity 76, 4414-4421.

Dimasi, D., Sun, W.Y., and Bonder, C.S. (2013). Neutrophil interactions with the vascular endothelium. International immunopharmacology 17, 1167-1175.

Doran, K.S., Banerjee, A., Disson, O., and Lecuit, M. (2013). Concepts and mechanisms: crossing host barriers. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 3.

Doring, G. (2012). Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* by early antibiotic treatment has been one of the major advances in the last decade for subjects with CF. Introduction. Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society 11, 1.

-E-

El-Solh, A.A., Hattemer, A., Hauser, A.R., Alhajhusain, A., and Vora, H. (2012). Clinical outcomes of type III *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. Critical care medicine 40, 1157-1163.

Elsen, S., Huber, P., Bouillot, S., Coute, Y., Fournier, P., Dubois, Y., Timsit, J.F., Maurin, M., and Attree, I. (2014). A type III secretion negative clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* employs a two-partner secreted exolysin to induce hemorrhagic pneumonia. Cell host & microbe 15, 164-176.

Emam, A., Yu, A.R., Park, H.J., Mahfoud, R., Kus, J., Burrows, L.L., and Lingwood, C.A. (2006). Laboratory and clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains do not bind glycosphingolipids in vitro or during type IV pili-mediated initial host cell attachment. Microbiology 152, 2789-2799.

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

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

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. Infection and immunity 69, 281-287.

-F-

Fehrenbach, H. (2001). Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. Respiratory research 2, 33-46.

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. Infection and immunity 66, 43-51.

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

Fleiszig, S.M., Arora, S.K., Van, R., and Ramphal, R. (2001). FlhA, a component of the flagellum assembly apparatus of *Pseudomonas aeruginosa*, plays a role in internalization by corneal epithelial cells. Infection and immunity 69, 4931-4937.

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. Infection and immunity 65, 2861-2867.

Fleiszig, S.M., Zaidi, T.S., Preston, M.J., Grout, M., Evans, D.J., and Pier, G.B. (1996). Relationship between cytotoxicity and corneal epithelial cell invasion by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Infection and immunity 64, 2288-2294.

Folkesson, A., Jelsbak, L., Yang, L., Johansen, H.K., Ciofu, O., Hoiby, N., and Molin, S. (2012). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. Nature reviews Microbiology 10, 841-851.

Furukawa, S., Kuchma, S.L., and O'Toole, G.A. (2006). Keeping their options open: acute versus persistent infections. Journal of bacteriology 188, 1211-1217.

-G-

Ganter, M.T., Roux, J., Su, G., Lynch, S.V., Deutschman, C.S., Weiss, Y.G., Christiaans, S.C., Myazawa, B., Kipnis, E., Wiener-Kronish, J.P., et al. (2009). Role of small GTPases and alphavbeta5 integrin in *Pseudomonas aeruginosa*-induced increase in lung endothelial permeability. American journal of respiratory cell and molecular biology 40, 108-118.

Garrity-Ryan, L., Kazmierczak, B., Kowal, R., Comolli, J., Hauser, A., and Engel, J.N. (2000). The arginine finger domain of ExoT contributes to actin cytoskeleton disruption and inhibition of internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells and macrophages. Infection and immunity 68, 7100-7113.

Gellatly, S.L., and Hancock, R.E. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. Pathogens and disease 67, 159-173.

Gendrin, C., Contreras-Martel, C., Bouillot, S., Elsen, S., Lemaire, D., Skoufias, D.A., Huber, P., Attree, I., and Dessen, A. (2012). Structural basis of cytotoxicity mediated by the type III secretion toxin ExoU from *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS pathogens 8, e1002637.

Ghafoor, A., Hay, I.D., and Rehm, B.H. (2011). Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. Applied and environmental microbiology 77, 5238-5246.

Giltner, C.L., Habash, M., and Burrows, L.L. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* minor pilins are incorporated into type IV pili. Journal of molecular biology 398, 444-461.

Glentis, A., Gurchenkov, V., and Matic Vignjevic, D. (2014). Assembly, heterogeneity, and breaching of the basement membranes. Cell adhesion & migration 8, 236-245.

Gloag, E.S., Javed, M.A., Wang, H., Gee, M.L., Wade, S.A., Turnbull, L., and Whitchurch, C.B. (2013a). Stigmergy: A key driver of self-organization in bacterial biofilms. Communicative & integrative biology 6, e27331.

Gloag, E.S., Turnbull, L., Huang, A., Vallotton, P., Wang, H., Nolan, L.M., Mililli, L., Hunt, C., Lu, J., Osvath, S.R., et al. (2013b). Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110, 11541-11546.

Golovkine, G., Faudry, E., Bouillot, S., Voulhoux, R., Attree, I., and Huber, P. (2014). VE-Cadherin Cleavage by LasB Protease from *Pseudomonas aeruginosa* Facilitates Type III Secretion System Toxicity in Endothelial Cells. PLoS pathogens 10, e1003939.

Goodenough, D.A., and Paul, D.L. (2009). Gap junctions. Cold Spring Harbor perspectives in biology 1, a002576.

Guillot, L., Nathan, N., Tabary, O., Thouvenin, G., Le Rouzic, P., Corvol, H., Amselem, S., and Clement, A. (2013). Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis. The international journal of biochemistry & cell biology 45, 2568-2573.

Guttman, J.A., and Finlay, B.B. (2009). Tight junctions as targets of infectious agents. Biochimica et biophysica acta 1788, 832-841.

Guzzo, J., Pages, J.M., Duong, F., Lazdunski, A., and Murgier, M. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. Journal of bacteriology 173, 5290-5297.

-H-

Ha, U., and Jin, S. (2001). Growth phase-dependent invasion of *Pseudomonas aeruginosa* and its survival within HeLa cells. Infection and immunity 69, 4398-4406.

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

Harris, E.S., and Nelson, W.J. (2010). VE-cadherin: at the front, center, and sides of endothelial cell organization and function. Current opinion in cell biology 22, 651-658.

Hauser, A.R. (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. Nature reviews Microbiology 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. Infection and immunity 66, 1413-1420.

Hayashi, N., Nishizawa, H., Kitao, S., Deguchi, S., Nakamura, T., Fujimoto, A., Shikata, M., and Gotoh, N. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* injects type III effector ExoS into epithelial cells through the function of type IV pili. FEBS letters 589, 890-896.

Heimer, S.R., Evans, D.J., Stern, M.E., Barbieri, J.T., Yahr, T., and Fleiszig, S.M. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* utilizes the type III secreted toxin ExoS to avoid acidified compartments within epithelial cells. PloS one 8, e73111.

Heiniger, R.W., Winther-Larsen, H.C., Pickles, R.J., Koomey, M., and Wolfgang, M.C. (2010). Infection of human mucosal tissue by *Pseudomonas aeruginosa* requires sequential and mutually

dependent virulence factors and a novel pilus-associated adhesin. Cellular microbiology 12, 1158-1173.

Hermant, B., Bibert, S., Concord, E., Dublet, B., Weidenhaupt, M., Vernet, T., and Gulino-Debrac, D. (2003). Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during neutrophil transmigration. The Journal of biological chemistry 278, 14002-14012.

Hidron, A.I., Edwards, J.R., Patel, J., Horan, T.C., Sievert, D.M., Pollock, D.A., and Fridkin, S.K. (2008). NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. Infection control and hospital epidemiology 29, 996-1011.

Hirakawa, T., Fujita, S., Ohyama, T., Dedachi, K., Khan, M.T., Sylte, I., and Kurita, N. (2012). Specific interactions and binding energies between thermolysin and potent inhibitors: molecular simulations based on ab initio molecular orbital method. Journal of molecular graphics & modelling 33, 1-11.

Hoiby, N., Ciofu, O., and Bjarnsholt, T. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. Future microbiology 5, 1663-1674.

Holm, J.P., Hilberg, O., Noerskov-Lauritsen, N., and Bendstrup, E. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* in patients without cystic fibrosis is strongly associated with chronic obstructive lung disease. Danish medical journal 60, A4636.

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.

Hoy, B., Geppert, T., Boehm, M., Reisen, F., Plattner, P., Gadermaier, G., Sewald, N., Ferreira, F., Briza, P., Schneider, G., et al. (2012). Distinct roles of secreted HtrA proteases from gram-negative pathogens in cleaving the junctional protein and tumor suppressor E-cadherin. The Journal of biological chemistry 287, 10115-10120.

Huber, P., Bouillot, S., Elsen, S., and Attree, I. (2014). Sequential inactivation of Rho GTPases and Lim kinase by *Pseudomonas aeruginosa* toxins ExoS and ExoT leads to endothelial monolayer breakdown. Cellular and molecular life sciences : CMLS 71, 1927-1941.

-I-

Inoshima, I., Inoshima, N., Wilke, G.A., Powers, M.E., Frank, K.M., Wang, Y., and Bubeck Wardenburg, J. (2011). A *Staphylococcus aureus* pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice. Nature medicine 17, 1310-1314.

-J-

Jain, N., and Walker, W.A. (2015). Diet and host-microbial crosstalk in postnatal intestinal immune homeostasis. Nature reviews Gastroenterology & hepatology 12, 14-25.

Johnson, M.D., Garrett, C.K., Bond, J.E., Coggan, K.A., Wolfgang, M.C., and Redinbo, M.R. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* PilY1 binds integrin in an RGD- and calcium-dependent manner. PloS one 6, e29629.

Jyot, J., Balloy, V., Jouvion, G., Verma, A., Touqui, L., Huerre, M., Chignard, M., and Ramphal, R. (2011). Type II secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: in vivo evidence of a significant role in death due to lung infection. The Journal of infectious diseases 203, 1369-1377.

-K-

Kang, P.J., Hauser, A.R., Apodaca, G., Fleiszig, S.M., Wiener-Kronish, J., Mostov, K., and Engel, J.N. (1997). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* genes required for epithelial cell injury. Molecular microbiology 24, 1249-1262.

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. European journal of immunology 36, 1739-1752.

Kato, J., Kim, H.E., Takiguchi, N., Kuroda, A., and Ohtake, H. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* as a model microorganism for investigation of chemotactic behaviors in ecosystem. Journal of bioscience and bioengineering 106, 1-7.

Kazmierczak, B.I., Jou, T.S., Mostov, K., and Engel, J.N. (2001). Rho GTPase activity modulates *Pseudomonas aeruginosa* internalization by epithelial cells. Cellular microbiology 3, 85-98.

Kessler, E., Safrin, M., Abrams, W.R., Rosenbloom, J., and Ohman, D.E. (1997). Inhibitors and specificity of *Pseudomonas aeruginosa* LasA. The Journal of biological chemistry 272, 9884-9889.

Kessler, E., Safrin, M., Olson, J.C., and Ohman, D.E. (1993). Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease. The Journal of biological chemistry 268, 7503-7508.

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. The Journal of cell biology 177, 21-27.

Kipnis, E., Sawa, T., and Wiener-Kronish, J. (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Medecine et maladies infectieuses 36, 78-91.

Kobielak, A., and Fuchs, E. (2004). Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. Nature reviews Molecular cell biology 5, 614-625.

Komori, Y., Nonogaki, T., and Nikai, T. (2001). Hemorrhagic activity and muscle damaging effect of *Pseudomonas aeruginosa* metalloproteinase (elastase). Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 39, 1327-1332.

Kos, V.N., Deraspe, M., McLaughlin, R.E., Whiteaker, J.D., Roy, P.H., Alm, R.A., Corbeil, J., and Gardner, H. (2015). The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. Antimicrobial agents and chemotherapy 59, 427-436.

Kowalski, M.P., and Pier, G.B. (2004). Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to lipid rafts of epithelial cells is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced cellular activation. J Immunol 172, 418-425.

Kumar, Y., and Valdivia, R.H. (2009). Leading a sheltered life: intracellular pathogens and maintenance of vacuolar compartments. Cell host & microbe 5, 593-601.

-L-

Laarman, A.J., Bardoel, B.W., Ruyken, M., Fernie, J., Milder, F.J., van Strijp, J.A., and Rooijackers, S.H. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. J Immunol 188, 386-393.

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

Le Berre, R., Nguyen, S., Nowak, E., Kipnis, E., Pierre, M., Quenee, L., Ader, F., Lancel, S., Courcol, R., Guery, B.P., et al. (2011). Relative contribution of three main virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. Critical care medicine 39, 2113-2120.

Leach, L., Hamilton, R.D., and Foss, A.J. (2012). Phenotypic plasticity of human umbilical vein endothelial cells. The British journal of ophthalmology 96, 1152.

Lee, A., Chow, D., Haus, B., Tseng, W., Evans, D., Fleiszig, S., Chandy, G., and Machen, T. (1999). Airway epithelial tight junctions and binding and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa*. The American journal of physiology 277, L204-217.

Lemichez, E., Lecuit, M., Nassif, X., and Bourdoulous, S. (2010). Breaking the wall: targeting of the endothelium by pathogenic bacteria. Nature reviews Microbiology 8, 93-104.

Lepanto, P., Bryant, D.M., Rossello, J., Datta, A., Mostov, K.E., and Kierbel, A. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* interacts with epithelial cells rapidly forming aggregates that are internalized by a Lyn-dependent mechanism. Cellular microbiology 13, 1212-1222.

Liang, G.H., and Weber, C.R. (2014). Molecular aspects of tight junction barrier function. Current opinion in pharmacology 19, 84-89.

Lister, P.D., Wolter, D.J., and Hanson, N.D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clinical microbiology reviews 22, 582-610.

Lyczak, J.B., Cannon, C.L., and Pier, G.B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. Microbes and infection / Institut Pasteur 2, 1051-1060.

-M-

Maddugoda, M.P., Stefani, C., Gonzalez-Rodriguez, D., Saarikangas, J., Torrino, S., Janel, S., Munro, P., Doye, A., Prodon, F., Aurrand-Lions, M., et al. (2011). cAMP signaling by anthrax edema toxin induces transendothelial cell tunnels, which are resealed by MIM via Arp2/3-driven actin polymerization. Cell host & microbe 10, 464-474.

Madigan, M.T. Brock biology of microorganisms, Fourteenth edition. edn.

Malloy, J.L., Veldhuizen, R.A., Thibodeaux, B.A., O'Callaghan, R.J., and Wright, J.R. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology 288, L409-418.

Martin-Belmonte, F., and Mostov, K. (2008). Regulation of cell polarity during epithelial morphogenesis. Current opinion in cell biology 20, 227-234.

Matsumoto, K. (2004). Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratial keratitis. Biological chemistry 385, 1007-1016.

Micek, S.T., Lloyd, A.E., Ritchie, D.J., Reichley, R.M., Fraser, V.J., and Kollef, M.H. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. Antimicrobial agents and chemotherapy 49, 1306-1311.

Mikkelsen, H., Sivaneson, M., and Filloux, A. (2011). Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. Environmental microbiology 13, 1666-1681.

Miller, F., Lecuyer, H., Join-Lambert, O., Bourdoulous, S., Marullo, S., Nassif, X., and Coureuil, M. (2013). *Neisseria meningitidis* colonization of the brain endothelium and cerebrospinal fluid invasion. Cellular microbiology 15, 512-519.

Mittal, R., Aggarwal, S., Sharma, S., Chhibber, S., and Harjai, K. (2009). Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. Journal of infection and public health 2, 101-111.

Mittal, R., Grati, M., Gerring, R., Blackwelder, P., Yan, D., Li, J.D., and Liu, X.Z. (2014). In vitro interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with human middle ear epithelial cells. PLoS one 9, e91885.

Mostov, K., Su, T., and ter Beest, M. (2003). Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity. Nature cell biology 5, 287-293.

Mulcahy, L.R., Isabella, V.M., and Lewis, K. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. Microbial ecology 68, 1-12.

Muller, A.J., Kaiser, P., Dittmar, K.E., Weber, T.C., Haueter, S., Endt, K., Songhet, P., Zellweger, C., Kremer, M., Fehling, H.J., et al. (2012). *Salmonella* gut invasion involves TTSS-2-dependent epithelial traversal, basolateral exit, and uptake by epithelium-sampling lamina propria phagocytes. Cell host & microbe 11, 19-32.

-N-

Niedergang, F., Didierlaurent, A., Kraehenbuhl, J.P., and Sirard, J.C. (2004). Dendritic cells: the host Achille's heel for mucosal pathogens? Trends in microbiology 12, 79-88.

Nolan, L.M., Cavaliere, R., Turnbull, L., and Whitchurch, C.B. (2015). Extracellular ATP inhibits twitching motility-mediated biofilm expansion by *Pseudomonas aeruginosa*. BMC microbiology 15, 55.

Nomura, K., Obata, K., Keira, T., Miyata, R., Hirakawa, S., Takano, K., Kohno, T., Sawada, N., Himi, T., and Kojima, T. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* elastase causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells. Respiratory research 15, 21.

-O-

Ochoa, C.D., Alexeyev, M., Pastukh, V., Balczon, R., and Stevens, T. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin Y is a promiscuous cyclase that increases endothelial tau phosphorylation and permeability. The Journal of biological chemistry 287, 25407-25418.

Ostroff, R.M., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (1990). Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of bacteriology 172, 5915-5923.

-P-

- Pentecost, M., Otto, G., Theriot, J.A., and Amieva, M.R. (2006). *Listeria monocytogenes* invades the epithelial junctions at sites of cell extrusion. PLoS pathogens 2, e3.
- Pereira, S.H., Cervante, M.P., Bentzmann, S., and Plotkowski, M.C. (1997). *Pseudomonas aeruginosa* entry into Caco-2 cells is enhanced in repairing wounded monolayers. Microbial pathogenesis 23, 249-255.
- Perez, T.D., and Nelson, W.J. (2004). Cadherin adhesion: mechanisms and molecular interactions. Handbook of experimental pharmacology, 3-21.
- Perl, A.K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H., and Christofori, G. (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. Nature 392, 190-193.
- Persat, A., Inclan, Y.F., Engel, J.N., Stone, H.A., and Gitai, Z. (2015). Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 112, 7563-7568.
- Peters, J.E., and Galloway, D.R. (1990). Purification and characterization of an active fragment of the LasA protein from *Pseudomonas aeruginosa*: enhancement of elastase activity. Journal of bacteriology 172, 2236-2240.
- Pier, G.B. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. International journal of medical microbiology : IJMM 297, 277-295.
- Pittet, J.F., Kudoh, I., and Wiener-Kronish, J.P. (1998). Endothelial exposure to *Pseudomonas aeruginosa* proteases increases the vulnerability of the alveolar epithelium to a second injury. American journal of respiratory cell and molecular biology 18, 129-135.
- Pizarro-Cerda, J., Kuhbacher, A., and Cossart, P. (2012). Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: an updated view. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 2.
- Plotkowski, M.C., de Bentzmann, S., Pereira, S.H., Zahm, J.M., Bajolet-Laudinat, O., Roger, P., and Puchelle, E. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* internalization by human epithelial respiratory cells depends on cell differentiation, polarity, and junctional complex integrity. American journal of respiratory cell and molecular biology 20, 880-890.
- Plotkowski, M.C., and Meirelles, M.N. (1997). Concomitant endosome-phagosome fusion and lysis of endosomal membranes account for *Pseudomonas aeruginosa* survival in human endothelial cells. Journal of submicroscopic cytology and pathology 29, 229-237.
- Plotkowski, M.C., Saliba, A.M., Pereira, S.H., Cervante, M.P., and Bajolet-Laudinat, O. (1994). *Pseudomonas aeruginosa* selective adherence to and entry into human endothelial cells. Infection and immunity 62, 5456-5463.
- Powers, M.E., Kim, H.K., Wang, Y., and Bubeck Wardenburg, J. (2012). ADAM10 mediates vascular injury induced by *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin. The Journal of infectious diseases 206, 352-356.
- Prince, A. (2006). Flagellar activation of epithelial signaling. American journal of respiratory cell and molecular biology 34, 548-551.
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C., Heidelberg, J.F., and Mekalanos, J.J. (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio*

cholerae using the Dictyostelium host model system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 1528-1533.

-Q-

Qian, C., Wong, C.C., Swarup, S., and Chiam, K.H. (2013). Bacterial tethering analysis reveals a "run-reverse-turn" mechanism for *Pseudomonas* species motility. Applied and environmental microbiology 79, 4734-4743.

-R-

Rada, B., and Leto, T.L. (2013). Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. Trends in microbiology 21, 73-81.

Ragkousi, K., and Gibson, M.C. (2014). Cell division and the maintenance of epithelial order. The Journal of cell biology 207, 181-188.

RAISIN Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, mai-juin 2012. Résultats. Disponible à l'adresse : <http://www.invs.sante.fr/enp>.

Ramphal, R., and Arora, S.K. (2001). Recognition of mucin components by *Pseudomonas aeruginosa*. Glycoconjugate journal 18, 709-713.

Rangel, S.M., Diaz, M.H., Knoten, C.A., Zhang, A., and Hauser, A.R. (2015). The Role of ExoS in Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* during Pneumonia. PLoS pathogens 11, e1004945.

Rangel, S.M., Logan, L.K., and Hauser, A.R. (2014). The ADP-ribosyltransferase domain of the effector protein ExoS inhibits phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* during pneumonia. mBio 5, e01080-01014.

Ribet, D., and Cossart, P. (2015). How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. Microbes and infection / Institut Pasteur 17, 173-183.

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. The European respiratory journal 13, 1301-1309.

Roy, P.H., Tetu, S.G., Larouche, A., Elbourne, L., Tremblay, S., Ren, Q., Dodson, R., Harkins, D., Shay, R., Watkins, K., et al. (2010). Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. PLoS one 5, e8842.

-S-

Sadikot, R.T., Blackwell, T.S., Christman, J.W., and Prince, A.S. (2005). Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. American journal of respiratory and critical care medicine 171, 1209-1223.

Saliba, A.M., Filloux, A., Ball, G., Silva, A.S., Assis, M.C., and Plotkowski, M.C. (2002). Type III secretion-mediated killing of endothelial cells by *Pseudomonas aeruginosa*. Microbial pathogenesis 33, 153-166.

- Sampedro, I., Parales, R.E., Krell, T., and Hill, J.E. (2015). *Pseudomonas* chemotaxis. FEMS microbiology reviews 39, 17-46.
- Sana, T.G., Baumann, C., Merdes, A., Soscia, C., Rattei, T., Hachani, A., Jones, C., Bennett, K.L., Filloux, A., Superti-Furga, G., et al. (2015). Internalization of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 into Epithelial Cells Is Promoted by Interaction of a T6SS Effector with the Microtubule Network. mBio 6, e00712.
- Sato, H., and Frank, D.W. (2014). Intoxication of host cells by the T3SS phospholipase ExoU: PI(4,5)P2-associated, cytoskeletal collapse and late phase membrane blebbing. PLoS one 9, e103127.
- Schaefer, P., and Baugh, R.F. (2012). Acute otitis externa: an update. American family physician 86, 1055-1061.
- Schalk, I.J., and Guillon, L. (2013). Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis. Environmental microbiology 15, 1661-1673.
- Schroeder, T.H., Reiniger, N., Meluleni, G., Grout, M., Coleman, F.T., and Pier, G.B. (2001a). Transgenic cystic fibrosis mice exhibit reduced early clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the respiratory tract. J Immunol 166, 7410-7418.
- Schroeder, T.H., Zaidi, T., and Pier, G.B. (2001b). Lack of adherence of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to asialo-GM(1) on epithelial cells. Infection and immunity 69, 719-729.
- Shaver, C.M., and Hauser, A.R. (2004). Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. Infection and immunity 72, 6969-6977.
- Shaw, S.K., Bamba, P.S., Perkins, B.N., and Lusinskas, F.W. (2001). Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. J Immunol 167, 2323-2330.
- Soong, G., Parker, D., Magargee, M., and Prince, A.S. (2008). The type III toxins of *Pseudomonas aeruginosa* disrupt epithelial barrier function. Journal of bacteriology 190, 2814-2821.
- Srikanth, C.V., Mercado-Lubo, R., Hallstrom, K., and McCormick, B.A. (2011). *Salmonella* effector proteins and host-cell responses. Cellular and molecular life sciences : CMLS 68, 3687-3697.
- Stevens, A.M., Schuster, M., and Rumbaugh, K.P. (2012). Working together for the common good: cell-cell communication in bacteria. Journal of bacteriology 194, 2131-2141.
- Stevens, T.C., Ochoa, C.D., Morrow, K.A., Robson, M.J., Prasain, N., Zhou, C., Alvarez, D.F., Frank, D.W., Balczon, R., and Stevens, T. (2014). The *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme Y impairs endothelial cell proliferation and vascular repair following lung injury. American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology 306, L915-924.
- 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.
- Strateva, T., and Mitov, I. (2011). Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Ann Microbiol 61, 717-732.
- Strateva, T., and Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. Journal of medical microbiology 58, 1133-1148.

Su, W.H., Chen, H.I., and Jen, C.J. (2002). Differential movements of VE-cadherin and PECAM-1 during transmigration of polymorphonuclear leukocytes through human umbilical vein endothelium. Blood 100, 3597-3603.

Sun, Y., Karmakar, M., Taylor, P.R., Rietsch, A., and Pearlman, E. (2012). ExoS and ExoT ADP ribosyltransferase activities mediate *Pseudomonas aeruginosa* keratitis by promoting neutrophil apoptosis and bacterial survival. J Immunol 188, 1884-1895.

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*. Microbial pathogenesis 33, 265-277.

-T-

Tang, H., Kays, M., and Prince, A. (1995). Role of *Pseudomonas aeruginosa* pili in acute pulmonary infection. Infection and immunity 63, 1278-1285.

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.

Tran, C.S., Eran, Y., Ruch, T.R., Bryant, D.M., Datta, A., Brakeman, P., Kierbel, A., Wittmann, T., Metzger, R.J., Mostov, K.E., et al. (2014a). Host cell polarity proteins participate in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infection. Cell host & microbe 15, 636-643.

Tran, C.S., Rangel, S.M., Almblad, H., Kierbel, A., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., Hauser, A.R., and Engel, J.N. (2014b). The *Pseudomonas aeruginosa* type III translocon is required for biofilm formation at the epithelial barrier. PLoS pathogens 10, e1004479.

-U-

Ulanova, M., Gravelle, S., and Barnes, R. (2009). The role of epithelial integrin receptors in recognition of pulmonary pathogens. Journal of innate immunity 1, 4-17.

-V-

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. Infection and immunity 67, 914-920.

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. Infection and immunity 73, 1706-1713.

Vasil, M.L. (1986). *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. The Journal of pediatrics 108, 800-805.

Vasil, M.L., Stonehouse, M.J., Vasil, A.I., Wadsworth, S.J., Goldfine, H., Bolcome, R.E., 3rd, and Chan, J. (2009). A complex extracellular sphingomyelinase of *Pseudomonas aeruginosa* inhibits angiogenesis by selective cytotoxicity to endothelial cells. PLoS pathogens 5, e1000420.

Vikstrom, E., Bui, L., Konradsson, P., and Magnusson, K.E. (2009). The junctional integrity of epithelial cells is modulated by *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule through phosphorylation-dependent mechanisms. Experimental cell research 315, 313-326.

-W-

Wallez, Y., and Huber, P. (2008). Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. Biochimica et biophysica acta 1778, 794-809.

Wang, S., Yu, S., Zhang, Z., Wei, Q., Yan, L., Ai, G., Liu, H., and Ma, L.Z. (2014). Coordination of swarming motility, biosurfactant synthesis, and biofilm matrix exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. Applied and environmental microbiology 80, 6724-6732.

Weiss, R.L. (1971). The structure and occurrence of pili (fimbriae) on *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of general microbiology 67, 135-143.

Wilhelm, S., Gdynia, A., Tielen, P., Rosenau, F., and Jaeger, K.E. (2007). The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. Journal of bacteriology 189, 6695-6703.

Willcox, M.D. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* infection and inflammation during contact lens wear: a review. Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry 84, 273-278.

Williams, B.J., Dehnbostel, J., and Blackwell, T.S. (2010). *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. Respirology 15, 1037-1056.

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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101, 6664-6668.

Wood, S., Goldufsky, J., and Shafikhani, S.H. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* ExoT Induces Atypical Anoikis Apoptosis in Target Host Cells by Transforming Crk Adaptor Protein into a Cytotoxin. PLoS pathogens 11, e1004934.

Woodfin, A., Voisin, M.B., and Nourshargh, S. (2010). Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. Current opinion in hematology 17, 9-17.

www.embryology.ch Cours d'embryologie en ligne à l'usage des étudiants et étudiantes en médecine. Disponible sur : <http://www.embryology.ch/francais/rrespiratory/phasen07.html>.

www.medscape.com *Pseudomonas aeruginosa* Infections Clinical Presentation. Lessnau, K.-D., Cunha, B., and Dua, P. Disponible sur : <http://emedicine.medscape.com/article/226748-overview>.

-Y-

Yamamoto, N., Jester, J.V., Petroll, W.M., and Cavanagh, H.D. (2006). Prolonged hypoxia induces lipid raft formation and increases *Pseudomonas* internalization in vivo after contact lens wear and lid closure. Eye & contact lens 32, 114-120.

Yamamoto, N., Petroll, M.W., Cavanagh, H.D., and Jester, J.V. (2005). Internalization of *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by lipid rafts in contact lens-wearing rabbit and cultured human corneal epithelial cells. Investigative ophthalmology & visual science 46, 1348-1355.

Young, B., O'Dowd, G., and Woodford, P. (2011). Wheater's functional histology : a text and colour atlas, Sixth edition / edn.

-Z-

Zaas, D.W., Swan, Z.D., Brown, B.J., Li, G., Randell, S.H., Degan, S., Sunday, M.E., Wright, J.R., and Abraham, S.N. (2009). Counteracting signaling activities in lipid rafts associated with the invasion of lung epithelial cells by *Pseudomonas aeruginosa*. The Journal of biological chemistry 284, 9955-9964.

Zaidi, T., Mowrey-McKee, M., and Pier, G.B. (2004). Hypoxia increases corneal cell expression of CFTR leading to increased *Pseudomonas aeruginosa* binding, internalization, and initiation of inflammation. Investigative ophthalmology & visual science 45, 4066-4074.

Zhang, R.Y., Liu, Y.Y., Li, L., Cui, W., Zhao, K.J., Huang, W.C., Gu, X.W., Liu, W., Wu, J., Min, D., et al. (2010). Increased levels of soluble vascular endothelial cadherin are associated with poor outcome in severe sepsis. The Journal of international medical research 38, 1497-1506.

Zhao, K., Tseng, B.S., Beckerman, B., Jin, F., Gibiansky, M.L., Harrison, J.J., Luijten, E., Parsek, M.R., and Wong, G.C. (2013). Psl trails guide exploration and microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Nature 497, 388-391.

Zolfaghar, I., Evans, D.J., and Fleiszig, S.M. (2003). Twitching motility contributes to the role of pili in corneal infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Infection and immunity 71, 5389-5393.

Zulianello, L., Canard, C., Kohler, T., Caille, D., Lacroix, J.S., and Meda, P. (2006). Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. Infection and immunity 74, 3134-3147.

Franchissement des barrières épithéliales et endothéliales par le pathogène opportuniste *P. aeruginosa*.

P. aeruginosa est l'un des principaux pathogènes responsables d'infections nosocomiales. Les infections aiguës à cette bactérie sont associées à une morbidité et une mortalité élevées, notamment lorsque ces bactéries envahissent le système sanguin. Dans la majorité des cas, ces infections du sang sont la conséquence du franchissement par *P. aeruginosa* de deux barrières tissulaires: l'épithélium pour les muqueuses et l'endothélium pour les vaisseaux. Bien que ces événements soient des étapes cruciales de la dissémination systémique des bactéries, les mécanismes permettant la pénétration du pathogène dans l'organisme sont à ce jour mal compris. Pour l'endothélium, nous démontrons que *P. aeruginosa* induit le clivage de la VE-cadhérine, une protéine des jonctions intercellulaires, par l'action de la protéase LasB sécrétée par les bactéries. Le clivage de la VE-cadhérine entraîne une perte d'intégrité de l'endothélium, permettant aux bactéries d'accéder au domaine basolatéral des cellules. Les toxines du Système de Sécrétion de Type 3 peuvent être alors injectées dans la cellule, provoquant une intoxication cellulaire majeure. Le franchissement de la barrière épithéliale s'opère par un mécanisme très différent. Par microscopie confocale en temps réel, nous montrons que *P. aeruginosa* transmigre par une voie paracellulaire, en exploitant des faiblesses jonctionnelles aux sites de divisions et de morts cellulaires. Ce processus de transmigration requiert l'action coordonnée des pili de Type IV, du flagelle et de toxines du Système de Sécrétion de Type 3.

Crossing of the epithelial and endothelial barriers by the opportunistic pathogen *P. aeruginosa*.

P. aeruginosa is one of the main pathogens responsible for nosocomial infections. Acute infections by this bacterium are associated with high rates of morbidity and mortality, especially when bacteria disseminate in the bloodstream. In most situations, blood infection is the consequence of the crossing of two essential tissue barriers by *P. aeruginosa*: the epithelium for the mucosa and the endothelium for the blood vessel. Although these events are critical steps for systemic spread of bacteria, the mechanisms involved in the penetration of the pathogen in the organism are poorly understood. For the endothelium, we demonstrate that *P. aeruginosa* induces the cleavage of VE-cadherin, a protein of endothelial junctions, by the action of LasB, a protease secreted by the bacteria. VE-cadherin cleavage induces a loss of integrity of the endothelium, allowing bacterial access to the cellular basolateral domain. Once in this location, the Type 3 secretion system may inject toxins into the cell, triggering a major intoxication process. Crossing of the epithelial barrier involves a very different mechanism. Using real-time confocal microscopy, we show that *P. aeruginosa* uses a paracellular route to transmigrate, exploiting junctional weaknesses at sites of cell division and cell death. This transmigration process requires the coordinate actions of Type IV pili, the flagellum and toxins of the Type 3 secretion system.