



Étude des mécanismes de virulence du pathogène nosocomial *Acinetobacter baumannii*

Stéphanie Gagné

► To cite this version:

Stéphanie Gagné. Étude des mécanismes de virulence du pathogène nosocomial *Acinetobacter baumannii*. Maladies infectieuses. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1045 . tel-01785630

HAL Id: tel-01785630

<https://theses.hal.science/tel-01785630>

Submitted on 4 May 2018

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.



N°d'ordre NNT : 2018LYSE1045

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 205
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences Santé

Spécialité de doctorat :
Infectiologie

Soutenue publiquement le 30/03/2018, par :
Stéphanie Gagné

Etude des mécanismes de virulence du pathogène nosocomial *Acinetobacter baumannii*

Devant le jury composé de :

Guignot, Julie
O'Callaghan, David
Doublet, Patricia
Jeannot, Katy
Lina, Gérard
Salcedo, Suzana

Docteure
Docteur
Professeure
Docteure
Professeur
Docteure

Inserm
Inserm
Université Lyon 1
CHRU Jean Minjoz
Université Lyon 1
Inserm

Rapporteure
Rapporteur
Présidente du jury
Examinatrice
Examineur
Directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Je tiens à adresser mes sincères remerciements au Professeure Patricia Doublet, au Docteur Julie Guignot, au Docteur Katy Jeannot, au Professeur Gérard Lina ainsi qu'au Docteur David O'Callaghan pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'évaluer mes travaux.

Je remercie particulièrement Suzana de m'avoir permis d'intégrer son laboratoire durant mon master puis de m'avoir préparée au mieux pour me permettre de réaliser cette thèse. Je la remercie pour son soutien, ses conseils et son aide apportée tout au long de mon parcours au sein de son équipe.

Je remercie la Région Auvergne-Rhône-Alpes d'avoir financé mes travaux de thèse à travers l'ARC1 Santé.

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe c2bp, les membres actuels mais j'ai également une pensée pour les anciens membres. Je vous remercie pour toute l'aide précieuse que vous m'avez apportés lors de la révision de ce manuscrit. Sans votre aide, le résultat ne serait pas le même. Merci pour votre sympathie et votre bienveillance. C'est en travaillant avec des collègues comme vous que je me lève le matin, motivée et prête à surmonter les difficultés. Je vous souhaite tout le meilleur pour vos futurs projets scientifiques comme personnels.

Je remercie l'ensemble du personnel de l'IBCP, scientifique et non scientifique, pour leurs discussions intéressantes et les services rendus. Je remercie toutes les personnes que j'ai pu croiser et qui m'ont transmises leur bonne humeur et notamment Sylvie qui a tous les matins le sourire et a eu un gentil mot pour moi.

Je remercie également les gestionnaires Christine, Dorothee et Souad pour leur bienveillance et leur réactivité au quotidien.

J'ai une pensée particulière pour les doctorants avec qui j'ai pu faire un bout de chemin. J'ai fait de belles rencontres durant cette thèse. Merci pour votre soutien au quotidien. Je vous souhaite le meilleur pour la suite !

Je remercie tout particulièrement Christelle. Merci pour l'important soutien que tu m'as apporté pour finir ce manuscrit. Merci pour ton aide lors de la révision du manuscrit, pour tes suggestions, tes importantes corrections et ta gentillesse ! Tu as grandement contribué à l'amélioration du manuscrit. Je ne te remercierai jamais assez.

Merci aux membres du PLATIM, pour leur aide et leur bienveillance lors de nos sessions microscopies.

J'ai une pensée pour mes amis connus en Master, ici, à Lyon. Merci à vous pour votre soutien, nos repas, votre présence et votre précieuse amitié depuis ces cinq dernières années. Félicitations encore Romain, tu as ouvert le bal et réussit à merveille. Félicitations Charlotte tu as su également mener à bien ta thèse avec brio. Je te remercie pour ton aide lors de la révision du manuscrit et ton soutien important dans les moments de doutes.

Merde aux autres, vous vous reconnaitrez, pour la soutenance prochaine !

Je remercie également mes amis scientifiques ou « non scientifiques », qui de près ou de loin ont participé par leur soutien et leurs messages à me rendre la vie plus belle durant cette thèse. Je ne pourrais pas citer tout le monde : Xénia, Mathilde, Anne, Sophie, Silvana, Louisa, Maïté, et bien d'autres. Merci à vous.

Je remercie mon club de boxe, New Olympic Savate, qui ne le sait surement pas mais a participé à mon équilibre tout au long de cette thèse.

Je remercie particulièrement mes proches, ma famille, d'avoir cru en moi, de m'avoir soutenue au cours de toutes ces années d'études et d'avoir pensé que je pouvais le faire. C'est grâce à vous si j'en suis arrivée là et je ne vous le rendrai jamais assez.

Je remercie Vincent pour être lui, pour sa présence durant ces années, son soutien malgré la distance et les doutes. Tu auras subi toutes ces années avec moi mais j'espère que tu seras fier du résultat.

Liste des abréviations.

Ab : *Acinetobacter baumannii*

ABRI : Ab résistante à l'imipénème

Acb : Le complexe *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* composé des espèces : *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii* et *A. dijkshoorniae* et *A. calcoaceticus*

AIC : Air Interface Culture, condition de culture air-liquide

BSA : Bovine Serum Albumin

Ca²⁺ : calcium

CDI : Contact-Dependent growth Inhibition, systèmes à deux partenaires de type inhibition de la croissance contact dépendant

CFU : Colony Forming Unit, nombre de colonies

ChoP : protéine présente à la membrane externe d'Ab contenant des phosphorylcholines

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMEM+SVF+A : DMEM+SVF contenant de l'hygromycine B à 300 µg/mL et de l'apramycine à 50 µg/mL

DO : densité optique

ECDC : centre européen de contrôle et de prévention des maladies

Expo : culture en phase exponentielle

G-C : Guanine-Cytosine

Hcp : Hemolysin co-regulated protein

HK : Heat Killed, souche inactivée par la chaleur

IC : International Clone, lignées clonales internationales

InVS : Institut de Veille Sanitaire français

IP : iode de propidium

IS : Séquence d'insertions

ISU : infections du système urinaire

LB : Luria-Bertani

LCC : condition de culture liquide-liquide

LDH : Lactate Déshydrogénase

LPS : Lipopolysaccharides

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MDR : Multi-résistant aux antibiotiques

MEC : Matrice extracellulaire

MOI : multiplicité d'infection

MP : mutation ponctuelle

NET : neutrophil extracellular trap

NF-κB : nuclear factor-κ B

NK : natural killer

NLR : nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors ou Nod-like receptors

NO : oxyde nitrique

Omp : Outer membrane proteins, protéines présentes à la surface externe de la bactérie

OMV : Outer Membrane Vesicles, vésicule libérée à partir de la membrane externe

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAFR : récepteur du facteur d'activation plaquettaire

PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns

PC : pneumonies communautaires

PDR : Pan Drug Resistant

PNV : pneumonies nosocomiales acquises sous ventilation mécanique
PRR : Pattern recognition receptor
RI : réponse immunitaire
SEAP : sécrétion de la phosphatase alcaline embryonnaire
SI : système immunitaire
SS : systèmes de sécrétion
SST1 : systèmes de sécrétion de type I
Statio : culture en phase stationnaire
SVF : sérum de veau fœtal
Tae : Type VI secretion amidase effectors
TER : résistance électrique trans-épithéliale
Tge : Type VI secretion glycoside hydrolase effectors
Tle : Type VI Lipase Effector
TLR : Toll like receptor
TNF α : le facteur de nécrose tumorale α
XDR : Extensively Drug Resistant

Liste des tableaux.

Tableau 1. Proportion du génome « cœur » et accessoire chez différentes espèces du genre <i>Acinetobacter</i>	23
Tableau 2. Souches utilisées au cours de l'étude	145
Tableau 3. Résistance aux antibiotiques des souches d'Ab	146

Liste des figures.

Figure 1. Arbre phylogénétique du genre <i>Acinetobacter</i>	13
Figure 2. Signalements d'ABRI (N=343) et proportion de signalements d'ABRI rapportée à l'ensemble des signalements pour des cas d'infections nosocomiales reçus à l'InVS en France, entre août 2001 et mai 2011.	20
Figure 3. Pourcentage d'infection par des souches d' <i>Acinetobacter</i> avec une résistance combinée aux fluoroquinolones, aux aminoglycosides et aux carbapénèmes, par pays en Europe (2014).	21
Figure 4. Mécanisme d'adhésion et d'interaction d'Ab avec les cellules épithéliales pulmonaires.	31
Figure 5. Déstabilisation de la paroi chez le mutant 19606 Δ ompA.	34
Figure 6. OMV libérées par Ab au cours de sa culture <i>in vitro</i> et lors d'infection <i>in vivo</i>	35
Figure 7. Les fonctions d'OmpA identifiées chez Ab.	37
.....	38
Figure 8. Reconnaissance et réponse immunitaire induite par Ab lors de l'infection d'une cellule épithéliale.	38
Figure 9. Réponse immunitaire induite lors de l'infection par Ab.	44
Figure 10. Cartographie des systèmes essentiels à la virulence d'Ab et présents à sa surface.	47
Figure 11. Modèle illustrant les différentes étapes d'assemblage, de translocation d'effecteurs vers la cellule cible et de recyclage des composants du SST6.	51
Figure 12. Fonctions du SST6.	52
Figure 13. Expression et sécrétion de Hcp par les différentes souches d'Ab.	66
Figure 14. Courbe de survie des <i>G. mellonella</i> infectées par Ab.	68
Figure 15. Analyse du pourcentage d'adhésion des différentes souches d'Ab aux cellules épithéliales pulmonaires.	70
Figure 16. Aucun effet du SST6 d'Ab sur l'adhésion aux cellules épithéliales pulmonaires.	71
Figure 17. Visualisation de l'adhésion des souches 17978 et DSM30011 d'Ab aux cellules épithéliales pulmonaires humaines.	73
Figure 18. Absence de perturbation de la monocouche de cellules Calu3 polarisée en condition AIC par l'infection d'Ab.	74
Figure 19. Mesure de LDH dans le surnageant des cellules infectées par les différentes souches d'Ab.	77
Figure 20. Différences de cytotoxicité observées par mesure d'incorporation de IP lors de l'infection des cellules pulmonaires épithéliales par les différentes souches d'Ab.	79
Figure 21. Absence de détection par microscopie de la translocation de NF- κ B dans le noyau des cellules infectées par Ab.	80
Figure 22. Activation de la voie NF- κ B par Ab.	81

Figure 23. Sécrétion d'IL-6 par les cellules épithéliales infectées par les différentes souches d'Ab.....	82
Figure 24. Invasion des cellules épithéliales par Ab et multiplication des souches cliniques hypervirulentes à l'intérieur des cellules eucaryotes.....	85
Figure 25. Visualisation de la souche 17978 d'Ab au niveau intracellulaire chez différentes lignées de cellules épithéliales.....	86
Figure 26. Ab est associée à une vacuole LAMP1 ⁺ à l'intérieur des cellules infectées.	87
.....	88
Figure 27. Adhésion des souches cliniques hypervirulentes d'Ab aux cellules épithéliales pulmonaires humaines.	88
Figure 28. Cellule infectée par la souche 5075 d'Ab présentant un nombre important de bactéries intracellulaires.	90
Figure 29. Modèle de régulation du SST6 chez Ab.	110
Figure 30. Variation de phase chez la souche 5075 d'Ab.....	112
Figure 31. Images de microscopie à épifluorescence des constructions d'Ab exprimant la GFP.	138
Figure 32. Mise en place du modèle cellulaire polarisé des cellules Calu3.....	140
Figure 33. Diminution progressive de la résistance transépithéliale des monocouches de cellules Calu3 polarisées.....	142
Figure 34. Comparaison de la polarisation de la monocouche de cellules Calu3 cultivées en condition LCC ou AIC.	142
Figure 35. Mise au point des conditions d'utilisations du système de gène rapporteur permettant l'évaluation de l'activation de la voie NF- κ B.....	144

Sommaire

Remerciements.....	1
Liste des abréviations.....	4
Liste des tableaux.....	6
Liste des figures.....	6
I. INTRODUCTION.....	11
1. Taxonomie et caractéristiques biologiques.....	13
2. Réservoir naturel d' <i>Acinetobacter</i>	15
3. Infections dues à Ab	16
3. 1. Pneumonie.....	16
3. 2. Bactériémie.....	17
3. 3. Infection chez les grands brûlés	18
3. 4. Infection urinaire	18
3. 5. Infection liée à un contexte de guerre ou à un désastre naturel	18
3. 6. Infection nosocomiale rare à Ab.....	19
4. Une urgence sanitaire et économique	19
5. Diversité génomique et plasticité génétique.....	22
5. 1. Caractéristiques du génome d'Ab	22
5. 2. Diversification génomique d'Ab.....	24
6. Mécanismes de virulence d'Ab.....	26
6. 1. Mécanismes d'adhésion d'Ab	26
6. 2. Internalisation d'Ab par la cellule infectée.....	30
6. 3. Induction de la mort des cellules eucaryotes par Ab	32
7. Réponse immunitaire induite lors de l'infection par Ab	36
7.1. Reconnaissance d'Ab par les PRR.....	37
7. 2. Effecteurs de la RI innée impliqués dans l'infection à Ab	41
8. Les Systèmes de Sécrétion (SS) chez Ab.....	46
8. 1. Introduction	46
8. 2. Le SST1	47
8. 3. Le SST2.....	48
8. 4. Le SST5.....	48
8. 5. Le SST6.....	49
Objectifs de la thèse	54
II. Résultats.....	57
Chapitre 1.....	59
Differential Role of the T6SS in <i>Acinetobacter baumannii</i> Virulence.....	59

Chapitre 2	65
Présence d'un SST6 inactif chez les souches cliniques hypervirulentes	66
Analyse de la virulence des souches hypervirulentes dans le modèle d'infection <i>G. mellonella</i>	67
Analyse de la capacité d'adhésion des souches d'Ab aux cellules épithéliales humaines	69
Observation par microscopie de l'adhésion d'Ab aux cellules épithéliales humaines	72
Analyse de la capacité de perturbation de la monocouche cellulaire par Ab	74
Comparaison de l'induction de cytotoxicité chez les cellules infectées par les différentes souches d'Ab	75
Induction de réponse immunitaire innée par Ab	79
Evidence d'une phase intracellulaire et multiplication des souches cliniques hypervirulentes à l'intérieur des cellules eucaryotes	83
Matériels et méthodes du Chapitre 2 Partie II. Résultats	93
Chapitre 3	103
Relatedness of wildlife and livestock avian isolates of the nosocomial pathogen <i>Acinetobacter baumannii</i> to lineages spread in hospitals worldwide	103
III. CONCLUSIONS ET DISCUSSIONS	107
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	120
ANNEXES	135
Annexe 1. A <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TIR effector mediates immune evasion by targeting UBAP1 and TLR adaptors	136
Annexe 2. Construction de souches GFP d'Ab	137
Annexe 3. Mise en place du modèle de monocouche épithéliale pulmonaire polarisée : utilisation des Calu3	140
Annexe 4. Mise au point du système rapporteur A549-Dual	143
Annexe 5. Souches utilisées au cours de cette étude	145
Annexe 6. Résistance aux antibiotiques d'Ab	146

I. INTRODUCTION

1. Taxonomie et caractéristiques biologiques

Acinetobacter est un membre de la famille des *Moraxellaceae* appartenant à l'ordre des *Pseudomonadales*, de la classe des *Gammaproteobacteria*. Le genre *Acinetobacter* comprend, à ce jour, 57 espèces ainsi que 15 nouvelles propositions d'espèces dont l'identification n'a pas encore été validée (<http://apps.szu.cz/anemec/Classification.pdf>) (Accès Décembre, 2017) (Figure 1). Les espèces constituant des problèmes au niveau hospitalier font partie d'un regroupement phylogénétique nommé *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* (Acb). Ce complexe comprend cinq espèces pathogènes d'*Acinetobacter* (*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii* et *A. dijkshoorniae*) et une espèce non pathogène (*A. calcoaceticus*). La similarité des caractéristiques phénotypiques et biochimiques des membres du complexe Acb a limité la différenciation précise des espèces. Celle-ci a été possible grâce à l'avancé des technologies de typage génomique, de spectrométrie de masse et de séquençage entier des génomes. De ce complexe, *A. baumannii* (Ab) est, aujourd'hui, l'espèce la plus étudiée dans le cadre de la recherche médicale, car elle est responsable de la majorité des infections nosocomiales.

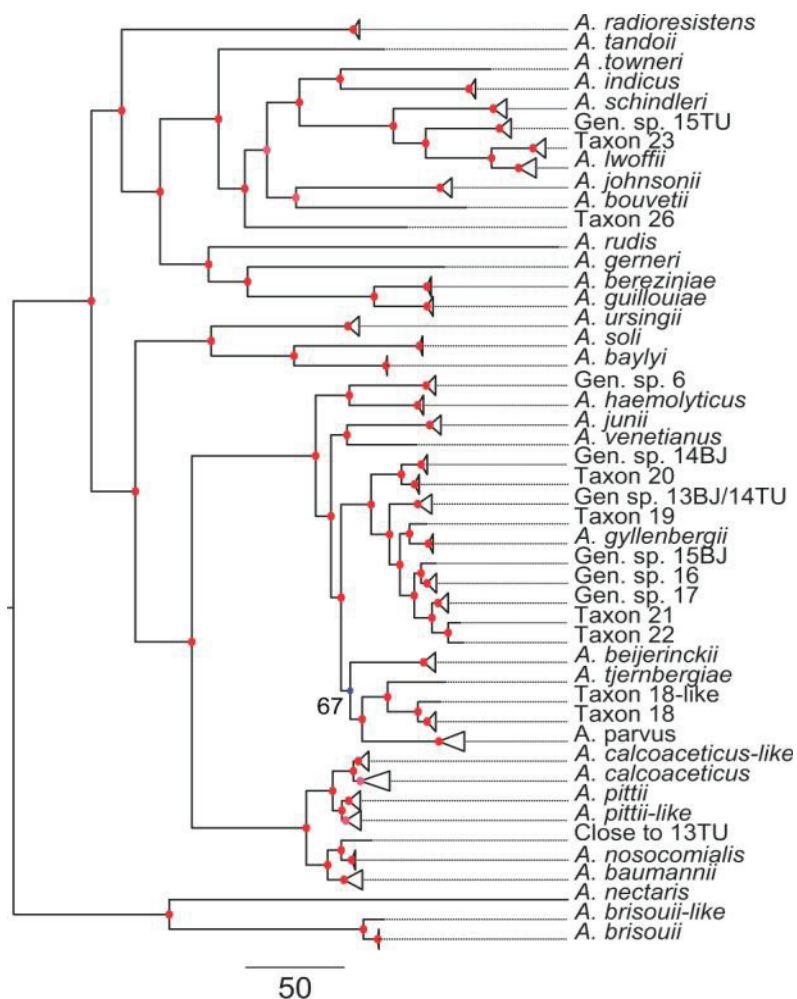


Figure 1. Arbre phylogénétique du genre *Acinetobacter*.

La construction de l'arbre est basée sur l'alignement de séquences (950) des protéines appartenant au génome cœur. Les triangles représentent des groupes de taxon qui appartiennent à la même espèce ou qui ont un pourcentage moyen d'identité nucléotidique (ANI) supérieur à 95%. Les nœuds en rouge ont une valeur de bootstrap supérieure à 95%. L'arbre a été enraciné en utilisant deux génomes des deux genres les plus proches (*Moraxella* et *Psychrobacter*). Figure issue de Touchon *et al.* [81].

L'analyse des éléments répétés palindromiques a permis l'identification de plusieurs lignées clonales internationales (IC) d'Ab. L'étude de ces lignées est importante pour le suivi intra- et inter-hospitalier des souches épidémiques, ainsi que pour l'analyse de leur distribution géographique globale [1]. De plus, elles sont sous-classées en « séquence type » par la méthode de typage de séquence multi locus (MLST pour Multi-Locus Sequence Typing), basée sur le séquençage de différents gènes ubiquitaires (e.g. *recA*, *rpoB*, *rplB*) [2,3]. Deux schémas sont actuellement utilisés : celui de Pasteur et celui d'Oxford. D'autres méthodes sont également importantes pour les études épidémiologiques d'Ab comme l'électrophorèse à champ pulsé (Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)), souvent utilisée en cas d'épidémie hospitalière, ou encore la spectrométrie de masse pour l'identification de composants spécifiques de la membrane externe d'Ab.

Le nom *Acinetobacter* vient du grec [akinetos] qui signifie non-motile car *Acinetobacter* est dépourvue de flagelle. Néanmoins, certaines espèces comme *A. nosocomialis* et Ab sont capables d'effectuer un mouvement lent et irrégulier en surface, appelé « twitching » [4–6]. Ce mouvement fait intervenir des éléments de surface spécifiques, notamment les pili de type IV, qui s'ancrent à un point d'attache puis se rétractent.

Ab est une bactérie à Gram négatif qui prend la forme de bacilles courts ou de coccobacilles dont la taille varie entre 1 et 5 µm. Ab est une bactérie aérobie stricte, non fermentaire, avec une activité catalase, oxydase négative. Elle ne nécessite pas de milieux particuliers pour sa croissance [7]. Ab se cultive sur une large gamme de températures mais la plupart des isolats cliniques se cultivent facilement à 37°C et peuvent se développer à 42°C.

Ab est capable de vivre à l'état libre sous forme planctonique mais également de former des biofilms, qui sont des communautés bactériennes protégées par une matrice d'exopolysaccharides (Introduction 6.1.1). Ces biofilms lui permettent de résister à la dessiccation et d'augmenter sa persistance sur les surfaces jusqu'à deux fois plus longtemps que les souches ne formant pas de biofilms. Ce phénomène de persistance

constitue un problème majeur en milieu hospitalier [8]. La composition de la membrane externe d'Ab, notamment des protéines O-glycosylées, contribue à la formation de biofilms et à leur virulence. La majorité des souches d'Ab produit une capsule extracellulaire, composée d'une grande variété de polysaccharides qui leur permet d'échapper au système immunitaire (SI) de l'hôte et d'augmenter leur résistance à la dessiccation et aux antibiotiques [9–11]. Cette capsule constitue un facteur de virulence majeur chez Ab car les souches dépourvues de capsule sont avirulentes.

2. Réservoir naturel d'*Acinetobacter*

Acinetobacter est une bactérie ubiquitaire. Des espèces « non-*baumannii* » sont retrouvées dans l'environnement, notamment dans les sols, les eaux usées ou encore l'eau de mer. Elles sont également présentes chez les animaux et les végétaux, comme par exemple à la surface de légumes, de poissons, de viandes ou de fromages destinés à la consommation [12–15]. Des animaux de compagnie porteurs d'*Acinetobacter* et notamment de la souche Ab ont également été reportés [16,17]. Cependant, le réservoir naturel d'Ab n'est pas connu. Ab n'est que très rarement isolée dans l'environnement mais reste l'espèce la plus souvent associée à des infections hospitalières.

Plusieurs espèces d'*Acinetobacter* ont été retrouvées sur le corps humain et certaines font même partie du microbiote intestinal. Des bactéries du genre *Acinetobacter* ont été isolées dans 3 à 24,6 % des échantillons fécaux de personnes saines et figurent parmi les principaux genres présents dans le duodénum de volontaires sains [18,19]. *Acinetobacter* est également retrouvée au niveau du colon des souris, en particulier les espèces *A. radioresistens* et *A. modestus* [20,21]. De façon intéressante, ces espèces possèdent différents gènes impliqués dans l'adhésion, la formation de biofilm, le métabolisme des xénobiotiques et des gènes sont également associées aux systèmes de sécrétion qui leur permettrait d'interagir avec l'hôte [21].

Dans un contexte clinique, les parties du corps les plus fréquemment colonisées par le complexe Acb sont les mains, les oreilles et les orteils des personnes hospitalisées mais aussi des personnes saines [22]. Le taux de portage cutané d'Ab reste faible. Cependant plusieurs études démontrent la présence d'Ab chez des individus hospitalisés et de façon

non pathogénique chez des individus sains [18,19,22]. Connaître le réservoir naturel d'Ab permettrait donc une meilleure compréhension de son évolution et de son adaptation à l'Homme.

3. Infections dues à Ab

Ab est un pathogène nosocomial opportuniste qui infecte majoritairement des patients dont l'état de santé est critique, notamment ceux en soins intensifs [23]. Les premières infections épidémiques causées par Ab datent des années 1970 et restaient relativement faciles à traiter. Actuellement, Ab est devenue un problème de santé publique majeur, en grande partie en raison de sa capacité à acquérir des mécanismes de résistance aux antibiotiques. De plus, sa résistance à la dessiccation et aux agents chimiques, utilisés dans les protocoles de désinfection, contribue à sa persistance dans le milieu hospitalier. Par conséquent, des règles strictes d'hygiène doivent être mises en place pour éviter la propagation du pathogène car les gants, les mains ou les vêtements des agents hospitaliers peuvent être colonisés par Ab [24,25]. Le matériel hospitalier peut, lui aussi, être contaminé par Ab, comme les cathéters, souvent à l'origine d'infections du système urinaire (ISU) [26–28].

Ab est principalement à l'origine d'infections nosocomiales du système respiratoire, de bactériémies, d'infections de plaies ou d'ISU. De manière moins fréquente, elle est également associée à des cas de méningites. En dehors du contexte hospitalier, Ab peut être à l'origine d'infections pulmonaires communautaires et d'infections de blessures lors de catastrophes naturelles. Ce contexte clinique et l'importance des infections par Ab sont détaillés dans la partie suivante.

3. 1. Pneumonie

3. 1. 1. Pneumonie nosocomiale acquise sous ventilation mécanique (PNV)

Ab est principalement associée aux infections du système respiratoire, en particulier suite à la mise sous respiration assistée d'un patient au cours de son séjour hospitalier [7]. Ab est l'un des pathogènes les plus fréquemment associés à ces PNV, qui peuvent entraîner un taux de mortalité significatif [29]. En soins intensifs, Ab représente dans certains pays asiatiques, comme la Chine, jusqu'à 15 % de l'ensemble des PNV, dont la majorité des

souches isolées est résistante aux antibiotiques [30,31]. L'implication des autres souches du complexe Acb dans le cadre des PNV n'est pas renseignée dans la littérature.

3. 1. 2. Pneumonie communautaire (PC)

Les PC sont des pneumonies qui n'ont pas été contractées suite à une hospitalisation. Les PC causées par Ab restent rares, cependant leur sévérité les rend particulièrement inquiétantes. Par exemple, les cas d'infections décrits à Taïwan, en Australie ou à Hong Kong font état d'un taux de mortalité d'environ 62 % [32–35]. Des facteurs tels que le sexe, l'âge, le tabagisme, l'alcoolisme ou les antécédents de maladies chroniques sont associés à un risque plus important de contracter une PC provoquée par Ab [32,35]. Il est à noter que les cas de PC apparaissent principalement lors des mois les plus chauds de l'année dans les régions tropicales ou subtropicales [32–35], suggérant une préférence d'Ab pour les environnements chauds et humides.

Les autres espèces d'*Acinetobacter* ne semblent pas impliquées dans des PC ; bien qu'un cas peu sévère causé par *A. pittii* ait récemment été décrit chez une fumeuse de 45 ans [36].

3. 2. Bactériémie

La bactériémie est une infection définie par la présence de bactéries dans le sang. Son origine n'est pas toujours clairement identifiée mais peut être la conséquence de cathétérisations (cathéters intravasculaires centraux, sondes ou drains), d'infections pulmonaires ou d'infections urinaires. La réalisation de gestes invasifs (tels que la ventilation mécanique, la cathétérisation veineuse centrale ou l'utilisation de tube nasogastrique) est associée à un risque plus important de développer une bactériémie [37].

Acinetobacter est responsable de 4,5 % à 12,5 % des bactériémies [38,39]. En soins intensifs, *Acinetobacter* est responsable de 13,4 % à 15,2 % de ces infections, avec un taux de mortalité qui varie entre 29,1 % et 82,3 % [38–44]. La majorité de ces infections sont dues à des souches appartenant au complexe Acb, mais Ab représente jusqu'à trois quarts des souches isolées [43–45]. L'incidence de bactériémies causées par Ab est en augmentation [40]. Les chances de survie du patient dépendent principalement de son état de santé général et de l'antibiorésistance de la souche à l'origine de l'infection.

Une influence saisonnière sur l'apparition des bactériémies attribuées à Ab a également été observée, avec une augmentation de 51,8 % du nombre d'infections causées par Ab durant les mois d'été [46].

3. 3. Infection chez les grands brûlés

La peau est la première défense protégeant notre organisme de l'entrée de pathogènes. Chez les grands brûlés, cette barrière est endommagée : ils deviennent alors plus susceptibles aux infections et, plus particulièrement, à celles par Ab, qui est la deuxième cause d'infection chez ces patients [27,28,47–49]. Ab est la souche retrouvée de façon prédominante puisqu'elle représente 83.4 % à 100 % des isolats appartenant au complexe Acb [27,28,47–49].

Les patients infectés par Ab sont hospitalisés significativement plus longtemps que les autres ; ce qui engendre une augmentation du coût de leur prise en charge. Cependant, l'impact de l'infection par Ab sur le taux de mortalité des patients reste controversé [26,27,47,50].

3. 4. Infection urinaire

Ab entraîne également des ISU, souvent associées à la présence de cathéters au niveau des voies urinaires. Ab est à l'origine de moins de 3 % des cas d'ISU mais reste parmi les 10 pathogènes les plus retrouvés lors de ce type d'infection [51–55].

3. 5. Infection liée à un contexte de guerre ou à un désastre naturel

Ab est aussi associée à des infections sur des terrains en situation de guerre ou de catastrophe naturelle. Les Etats-Unis ont constaté l'émergence de cas d'infections par Ab chez leurs soldats déployés en Irak ou en Afghanistan, après des blessures telles que des fractures liées au combat ou encore aux explosions sur le terrain. Ab a été le pathogène le plus souvent retrouvé lors de biopsies effectuées sur des tissus issus de plaies [56,57].

De façon similaire, une recrudescence d'infections de plaies par Ab a également été observée après des tsunamis ou des tremblements de terre [17,58,59].

L'origine de ces épidémies soudaines n'est pas expliquée mais pourrait donner des informations importantes sur le réservoir naturel d'Ab.

3. 6. Infection nosocomiale rare à Ab

Ab est aussi associée à des infections hospitalières plus rares. Ce pathogène est à l'origine de méningites nosocomiales apparues après des actes de neurochirurgie [7], avec un taux de mortalité souvent élevé [60].

Ab est également un problème de plus en plus important chez les patients bénéficiaires de greffe d'organe. En effet, ces patients sont particulièrement exposés au risque d'infections nosocomiales car ils effectuent plusieurs séjours prolongés à l'hôpital et suivent un traitement d'immunosuppression afin d'éviter tout risque de rejet du greffon. Ab entraîne principalement des infections des voies respiratoires ou des bactériémies chez les patients greffés, avec un taux de mortalité entre 19 et 69 % selon l'efficacité du traitement reçu [61–64].

4. Une urgence sanitaire et économique

Les infections nosocomiales sont un enjeu de santé publique majeur, aussi bien au niveau de la santé et du bien-être du patient qu'au niveau économique, en raison des coûts importants qu'elles représentent. En France, le risque de contracter une infection nosocomiale est la première source d'inquiétude lors d'une hospitalisation. Un rapport de l'office parlementaire d'évaluation des politiques de santé publique a dressé un bilan des infections nosocomiales et de la politique de lutte mise en place contre ces infections en France. Celui-ci estime que 6 % à 7 % des hospitalisations aboutissent à une infection nosocomiale [65]. Ces infections nosocomiales engendrent, en France, un surcoût de prise en charge allant de 340 € à 40 000 € par patient, selon le type d'infection [65–69].

Ab devient donc une menace préoccupante avec l'émergence de souches de plus en plus résistantes aux antibiotiques. En effet, Ab possède différents mécanismes de résistance

aux antibiotiques, comme la dégradation enzymatique des drogues, la modification des cibles et pompes à efflux et la modulation de la perméabilité.

Différentes catégories de résistance peuvent être distinguées pour Ab [2,71,72] :

- « Multi-Drug Resistant » (MDR) : souches résistantes à au moins trois classes d'antimicrobiens (toutes les pénicillines et céphalosporines ; les fluoroquinolones et aminoglycosides).
- « Extensively Drug Resistant » (XDR) : souches résistantes à toutes les classes d'antibiotiques, à l'exception d'une ou deux (résistance identique aux MDR, avec en plus les carbapénèmes).
- « Pan Drug Resistant » (PDR) : souches résistantes à toutes les classes d'antibiotiques disponibles sur le marché (résistance identique aux XDR, avec en plus les polymyxines et tigecycline).

Un rapport de l'Institut de Veille Sanitaire français (InVS) révèle une augmentation significative des signalements d'infections causées, entre 2001 et 2011, par des souches d'Ab résistantes à l'imipénème (ABRI), un carbapénème (Figure 2). Les carbapénèmes sont un sous-groupe des β -lactamines à large spectre inhibant la synthèse du peptidoglycane, un composant essentiel à la paroi bactérienne. Ce sont des antibiotiques de dernier recours, utilisés pour le traitement d'infections aux bactéries à Gram négatif MDR [73].

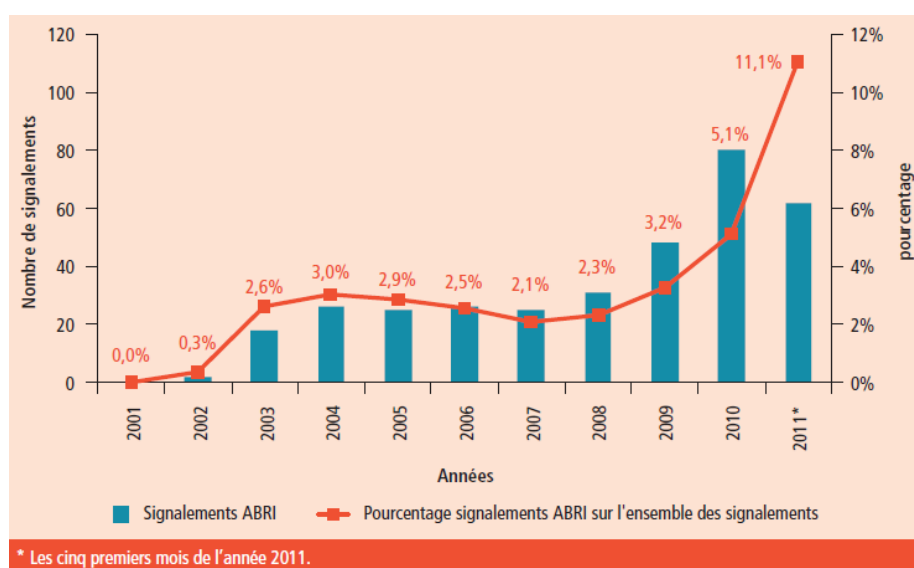


Figure 2. Signalements d'ABRI (N=343) et proportion de signalements d'ABRI rapportée à l'ensemble des signalements pour des cas d'infections nosocomiales reçus à l'InVS en France, entre août 2001 et mai 2011. Figure issue du Bulletin hebdomadaire de l'InVS (Graphique issu de Vaux *S et al.* [73]).

Le signalement croissant d'infections à des souches XDR d'Ab en France mais également à travers toute l'Europe, a conduit, dès 2012, à l'introduction d'Ab dans le programme de surveillance des micro-organismes multirésistants aux antibiotiques par le centre européen de contrôle et de prévention des maladies (ECDC). Leur dernier rapport, paru en 2015, indique que près de la moitié des souches d'Ab isolées lors d'infections sont résistantes aux fluoroquinolones, aux aminoglycosides et aux carbapénèmes [74]. Dans certains pays d'Europe, plus de 85 % des souches d'Ab isolées sont XDR (Figure 3). Ainsi, la Grèce, l'Italie ou encore la Croatie se retrouvent dans une situation alarmante puisque les traitements efficaces en cas d'infections deviennent limités. Aux Etats-Unis, le centre de contrôle et de prévention des maladies dresse un constat similaire avec 63 % des souches d'Ab qui résistent à au moins 3 classes différentes d'antibiotiques [75].

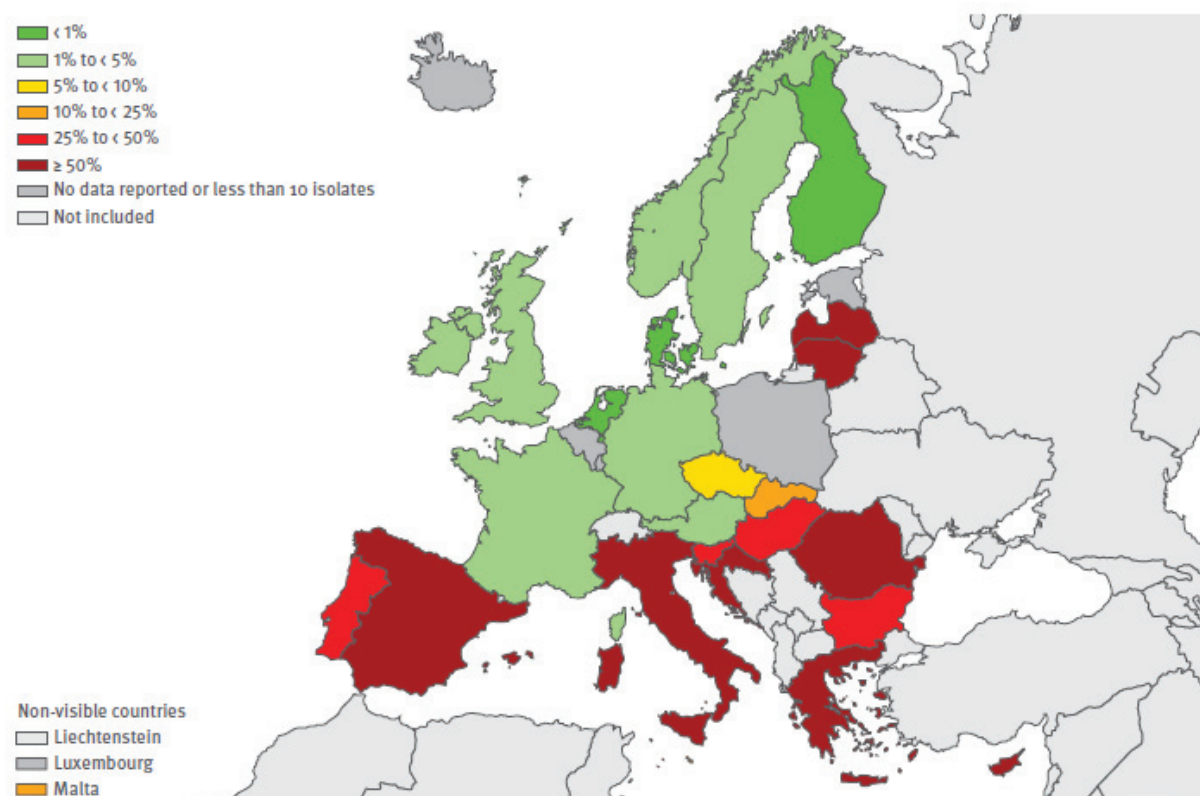


Figure 3. Pourcentage d'infection par des souches d'*Acinetobacter* avec une résistance combinée aux fluoroquinolones, aux aminoglycosides et aux carbapénèmes, par pays en Europe (2014).
Figure issue de l'ECDC [74].

Par conséquent, Ab est classée parmi les pathogènes « ESKAPE », dont l'acronyme correspond aux espèces *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*

pneumoniae, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et aux espèces d'*Enterobacter*. Ces six pathogènes sont ceux les plus souvent impliqués dans les infections nosocomiales à travers le monde et ils « échappent » aux traitements antibiotiques car la plupart des souches isolées sont MDR. Un « plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens » a été adopté en 2015 par l'ensemble des membres de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Ce programme permettra d'obtenir des données fiables, exploitables et comparables entre les différents pays, en introduisant des standards de surveillance, d'identification et de caractérisation [76,77]. En 2017, l'OMS a aussi placé Ab en tête de liste des agents pathogènes pour lesquels la recherche et le développement de nouveaux antimicrobiens est critique [78].

En plus de son antibiorésistance, des nouvelles souches d'Ab particulièrement virulentes, n'appartenant pas aux trois clones les plus répandus au niveau international, ont récemment été identifiées [79]. Elles ont été isolées chez des patients qui ne présentaient pas d'importants risques de mortalité ou de dysfonctionnement physiologique. Néanmoins, l'infection leur a été fatale. Ces souches hypervirulentes entraînent également la mort de souris immunocompétentes à l'inverse des autres souches cliniques [79,80], suggérant l'acquisition de nouveaux mécanismes de virulence.

5. Diversité génomique et plasticité génétique

5. 1. Caractéristiques du génome d'Ab

Le genre *Acinetobacter* est très ancien. Une datation exacte est impossible en raison de l'absence de données fossiles. Néanmoins, son dernier ancêtre commun est proche de celui d'*Enterobacteriaceae*, âgé de près de cinq cents millions d'années. Cette ancienneté contribue à la diversité écologique et métabolique retrouvée au sein du genre [81].

Toutefois, la population d'Ab a subi un effet « bottleneck » qui consiste en une réduction importante de sa population et de sa diversité génétique, suivie d'une rapide expansion d'un nombre limité de clones multi-résistants aux antibiotiques [81,82]. Huit clones se sont propagés au niveau international et sont retrouvés de manière récurrente lors d'infection. Parmi eux, en Europe, trois clones (IC1 à 3) prédominent et sont associés à de nombreux cas d'infections. Le clone IC2 est le plus répandu et le plus fréquemment associé à des épidémies [1,2,83–85].

La taille du génome d'Ab est en moyenne de 3.87 Mb (allant de 2.7 Mb à 4.9 Mb), avec un pourcentage en bases Guanine-Cytosine (G-C) d'environ 39,6 % [81,85]. La densité de séquences codant des protéines est relativement homogène entre les souches étudiées et représente 94 % du génome total. Le séquençage génétique a permis de mettre en évidence une diversité importante au sein du genre *Acinetobacter* mais également entre les souches d'une même espèce [81,82]. Les gènes peuvent être classés en deux catégories appartenant soit au génome « cœur », soit au génome accessoire. Le génome « cœur » est conservé et il contient l'ensemble des gènes ubiquitaires, c'est-à-dire partagés par toutes les souches de l'espèce (gènes orthologues). Chez Ab, ce génome « cœur » est restreint et ne représente que 42 % de l'ensemble des gènes tandis que chez des espèces comme *A. calcoaceticus* ou *A. pittii*, il représente 81 % des gènes (Tableau 1) [81]. Le génome accessoire, lui, comprend des gènes qui ne sont pas partagés par l'ensemble de la population. Ces gènes ne sont pas essentiels à la bactérie mais peuvent lui conférer des avantages sélectifs. Chez Ab, les gènes accessoires représentent près de 35 % des gènes et plus d'un tiers sont des gènes spécifiques à une souche donnée [81,86].

Tableau 1. Proportion du génome « cœur » et accessoire chez différentes espèces du genre *Acinetobacter*.

Species	#	Core-Genome		Pan-Genome	
		Size	%	Size	%
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	4	2,951	81	4,677	128
<i>Acinetobacter indicus</i>	3	2,340	79	3,309	112
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	9	2,161	66	5,557	169
<i>Acinetobacter parvus</i>	8	1,810	64	4,576	162
<i>Acinetobacter pittii</i>	3	2,926	81	4,282	120
<i>Acinetobacter schindleri</i>	3	2,391	76	3,929	125
<i>Acinetobacter ursingii</i>	3	2,458	72	4,353	128
<i>Acinetobacter junii</i>	3	2,293	70	4,292	131
Genomic sp. 13BJ/14TU	3	2,782	73	4,839	128
Genomic sp. 16	3	3,222	78	5,210	125
<i>Acinetobacter baumannii</i>	34	1,590	42	10,849	288

Note : Pour chaque espèce, le nombre de génomes utilisés (# minimum de 3), la taille du génome « cœur » et accessoire, et le pourcentage relatif de chacun par rapport à la moyenne obtenue par comparaison des génomes de l'espèce sont indiqués. Tableau issu de Touchon *et al.* [81].

De façon intéressante, la majorité des facteurs de virulence identifiés jusqu'à présent chez Ab se trouve au niveau du génome « cœur ». Ils sont également présents chez d'autres espèces qu'Ab et notamment chez des espèces non pathogènes [81,87,88]. Cette observation permet d'émettre un doute sur l'importance de ces facteurs de virulence pour expliquer le caractère pathogène d'Ab.

En revanche, le génome accessoire d'Ab est enrichi en gènes codant des transporteurs et des régulateurs transcriptionnels [81,86,89]. Ainsi, la virulence d'Ab pourrait s'expliquer par une importante régulation génomique, contrôlant notamment l'expression de ces différents facteurs de virulence.

5. 2. Diversification génomique d'Ab

La capacité importante de diversification génomique d'Ab est un facteur clé pour l'émergence rapide d'antibiorésistance observée chez ce pathogène. La présence d'îlots génomiques est répandue chez Ab, montrant l'importance de l'acquisition d'éléments génétiques étrangers pour son adaptation et sa propagation. Par exemple, la souche clinique MDR AYE, à l'origine d'épidémies en France, possède un îlot qui rassemble 45 gènes de résistance [90]. Cet îlot est flanqué de régions répétées et son contenu en bases G-C diffère de manière significative du reste du génome, appuyant l'hypothèse de son acquisition par transfert horizontal [90].

Les mécanismes de transferts horizontaux (la transformation, la transduction et la conjugaison) contribuent à l'acquisition de nouveaux matériaux génétiques. Les gènes impliqués dans la transformation naturelle sont présents chez Ab mais toutes les souches ne sont pas naturellement compétentes en conditions de laboratoire. Par exemple, *in vitro*, certaines souches d'Ab sont capables d'acquérir de l'ADN seulement dans des conditions qui permettent le mouvement, c'est-à-dire en milieu spécifique et humide [4]. Concernant la transduction, la présence de prophages, formes latentes de phages intégrées dans le génome, a été détectée chez 82 % des génomes d'*Acinetobacter* et peut représenter jusqu'à 2 % de leur génome [81]. Cela suggère un rôle important de ces virus bactériens dans l'apport de nouveau matériel génétique chez Ab. Enfin, Ab possède aussi plusieurs éléments conjugatifs comme des relaxases et des longs pili, habituellement

associés à des plasmides, qui entraînent une haute fréquence de conjugaison en milieu liquide.

Les séquences d'insertion (IS) sont aussi une source importante de diversité génétique. Elles entraînent des réarrangements génomiques et peuvent conduire à des mutations lors de leur insertion [81,91]. Les IS sont des éléments transposables simples codant la transposase, nécessaire à leur mobilité, et dans certains cas une protéine régulatrice de la transposition. Ces courtes séquences sont souvent bordées de séquences inversées répétées fournissant à la transposase un site de coupure [92,93]. Des prélèvements à différents moments après l'apparition des premiers signes d'infection ont montré que, pour chaque patient infecté par Ab, des événements de transposition ont lieu chez Ab durant l'infection. La plupart de ces événements sont spécifiques à une souche donnée [84]. Cependant, il existe une tendance pour l'insertion de l'ISAb₁, une IS répandue chez Ab, au niveau des régions codantes du génome d'Ab ou dans une orientation qui favorise la surexpression du gène adjacent, en apportant un promoteur fort [84,91]. Les sites d'insertion d'ISAb₁ sont davantage retrouvés au niveau des gènes associés à l'antibiorésistance ou des gènes apportant une adaptation à l'hôte [83,94].

Il est important de mentionner que l'acquisition de diversité peut se faire par l'apparition de mutations, même si ce phénomène apporte des modifications moins drastiques. Les mutations ponctuelles (MP) peuvent, chez les bactéries, altérer la cible et l'affinité des antibiotiques ou encore modifier la régulation d'une fonction de la bactérie ; engendrant ainsi une résistance [95,96]. Par exemple, la mutation du régulateur à deux composants AdeRS, entraîne la surexpression de pompes à efflux et une baisse de la sensibilité d'Ab à différents antibiotiques [85,97]. La mutation du gène *gyrA* chez Ab, codant la topoisomérase de type II impliquée dans l'enroulement de l'ADN et dans les mécanismes de réplication de l'ADN, entraîne une résistance aux quinolones [95]. Des mutations ont été observées chez la population d'Ab au cours de l'infection d'un patient. La majorité des MP sont spécifiques d'une souche donnée, avec une surreprésentation dans les régions codantes du génome associées à l'antibiorésistance ou associées à l'interaction avec l'hôte [84].

En résumé, Ab possède une faculté importante à s'adapter à son environnement, notamment chez les personnes infectées, grâce à l'ensemble de ses mécanismes de diversification génomique et la plasticité génétique qui la caractérise.

6. Mécanismes de virulence d'Ab

Comme mentionné précédemment, *Acinetobacter* a une considérable résistance à la dessiccation mais aussi aux agents de désinfection, ce qui contribue à sa persistance dans le milieu hospitalier [8,98]. A titre d'exemple, lors d'un épisode infectieux en Belgique, un service de grands brûlés a dû fermer après une épidémie d'Ab car malgré le traitement du service par vaporisation de peroxyde d'hydrogène, la procédure préconisée, Ab n'a pas été éliminée [27]. Ab reste donc un pathogène opportuniste qui bénéficie de sa remarquable capacité à résister aux pressions sélectives imposées par les traitements antibiotiques et de la rupture des barrières anatomiques pour infecter un patient. Toutefois, de plus en plus d'études révèlent une virulence accrue d'Ab par rapport aux autres espèces d'*Acinetobacter*. Le séquençage des génomes, l'utilisation de souches cliniques et les cribles à large échelle (par exemple par Tn-Seq) ont initié la caractérisation de potentiels facteurs de colonisation et de virulence spécifiques à Ab. Ceci inclut des mécanismes qui permettent l'adhésion aux surfaces biotiques et abiotiques, l'acquisition de fer, la synthèse de capsule, la formation de vésicules extracellulaires. Les phospholipases, les protéines de la membrane externe et les systèmes de sécrétion d'Ab ont également été identifiés comme de potentiels facteurs de virulence.

Dans les paragraphes suivants, les quatre étapes de l'interaction entre Ab et son hôte seront présentées : l'adhésion, l'internalisation, l'induction de la mort cellulaire et la réponse immunitaire de l'hôte. Ensuite, les systèmes de sécrétions, l'un des sujets centraux de ma thèse sur lequel des avancées récentes majeures ont eu lieu, seront décrits indépendamment.

6. 1. Mécanismes d'adhésion d'Ab

6. 1. 1. Adhésion aux surfaces abiotiques

Ab possède une grande capacité à adhérer aux surfaces abiotiques qui, dans le cas d'Ab, conduit fréquemment à la formation de biofilms. Le biofilm est une structure

multicellulaire tridimensionnelle complexe, où les cellules sont en contact étroit et sont entourées d'une matrice extracellulaire constituée de polysaccharides, de carbohydrates, d'acides nucléiques et de protéines. Ces structures permettent la formation d'une communauté bactérienne protégée des stress environnementaux, des antibiotiques et de la réponse immunitaire de l'hôte. La formation de biofilms se fait en différentes étapes. L'attachement initial à une surface est le premier élément crucial permettant la formation du biofilm : d'abord réversible, il devient irréversible en réponse à des signaux environnementaux [99].

Chez *Ab*, l'attachement initial est dépendant de la formation de pili sous contrôle de l'opéron *csuA/BABCDE*, codant le système d'assemblage chaperonne- « usher ». L'expression de cet opéron est régulée par un système à deux composants : BfmRS [100]. Ces systèmes sont largement répandus chez les bactéries qui perçoivent à travers une kinase membranaire, BfmS chez *Ab*, les signaux extérieurs [100]. BfmS interagit ensuite avec BfmR, un régulateur transcriptionnel de *csuA/BABCDE* [101]. L'absence de BfmS chez *Ab* entraîne une diminution de la capacité des souches à former des biofilms tandis que celle de BfmR abolit leur formation ; suggérant que BfmR peut surement être activé par d'autres kinases [100]. Des cribles récents ont aussi identifié d'autres gènes impliqués dans la formation des pili lors de la formation du biofilm, comme le gène LH92_11085 codant une protéine structurale d'un pilus de type I dont la fonction n'a pas encore pleinement été caractérisée [102].

Certaines protéines, présentes à la surface de la membrane externe d'*Ab* (Omp pour Outer membrane proteins), participent à la consolidation du biofilm. OmpA est la protéine la plus abondante à la membrane externe d'*Ab*. Il s'agit d'une porine de 38 kDa impliquée dans le transport de soluté et dans la résistance d'*Ab* à certains antibiotiques. Elle participe également à la formation de biofilms [103–105], tout comme Bap, une autre Omp [106]. En effet, les mutants d'*Ab* n'exprimant pas OmpA ou Bap forment des biofilms moins importants en biomasse et biovolume. Le même phénotype est observé chez le mutant de l'auto transporteur Ata, présent à la surface d'*Ab* [107].

Les signaux faisant basculer *Ab* d'un mode de vie planctonique à un mode statique restent mal caractérisés. Chez *Ab*, la formation de biofilms est plus importante en conditions de

culture pauvres en fer, associées à une répression des gènes relatifs à la mobilité cellulaire par rapport aux conditions de culture en milieu riche [108,109]. Cette limitation en fer est caractéristique de l'environnement rencontré par Ab, comme lors de l'infection chez l'humain. En effet, chez l'homme, la séquestration du fer est une stratégie de défense immunitaire. La formation de biofilm ne se restreint pas uniquement aux surfaces abiotiques. En effet, certaines souches cliniques de Ab sont capables de former du biofilm sur des plaies infectées, alors qu'aucun biofilm n'a été observé *in vitro* sur les surfaces abiotiques en condition de laboratoire [110]. Au contraire, d'autres souches cliniques ne semblent pas former du biofilm que ce soit *in vitro* ou *in vivo* [111]. L'adhésion aux cellules eucaryotes reste cependant une étape clef de la virulence d'Ab chez l'Homme.

6. 1. 2. Adhésion à la matrice extracellulaire (MEC)

Lors de l'infection de l'hôte, Ab doit adhérer aux cellules épithéliales puis franchir la MEC pour pouvoir ensuite se disséminer dans l'organisme. La MEC est un composant de l'ensemble des tissus. Elle sert de support physique aux constituants cellulaires et participe à la morphogenèse, la différenciation et l'homéostasie tissulaire. La MEC est sécrétée par des cellules spécialisées du tissu et elle est composée principalement de fibres notamment de collagène, de glycoprotéines comme la fibronectine mais aussi de polysaccharides.

Différentes études montrent qu'Ab interagit avec les composants de la MEC. L'auto transporteur Ata, présent chez près de 60 % des isolats cliniques testés et évoqué précédemment dans le contexte de biofilm, est capable de se fixer aux collagènes de type I, III, IV et V ainsi qu'à la laminine [107]. En revanche, il n'interagit pas avec le collagène de type II, la fibronectine, la vitronectine ou le sulfate d'héparane. D'autre part, le mutant d'Ata est avirulent lors de l'infection, révélant son importance pour la pathogénicité d'Ab [107]. L'adhésion à la fibronectine est assurée par les porines OmpA et Omp33 ou encore par un récepteur de cuivre associé au système TonB [112–114]. Les mutants de ces protéines, présentes à la membrane externe d'Ab, ont chacun une adhérence diminuée à la fibronectine. TonB apporte l'énergie nécessaire au changement conformationnel de son récepteur associé pour permettre le transport de son ligand de l'extérieur de la bactérie au périplasme. La souche 19606 d'Ab possède plusieurs protéines TonB, mais elles n'ont

pas toutes la même importance dans l'interaction avec la fibronectine ; suggérant des rôles et fonctions différentes pour les différents TonB [114].

6. 1. 3. Adhésion aux cellules eucaryotes

De façon non surprenante, les protéines ayant été identifiées pour leur implication dans l'adhésion aux surfaces abiotiques ou la formation de biofilm se sont également révélées être impliquées dans l'adhésion aux cellules eucaryotes. C'est le cas, par exemple, de l'auto transporteur Ata qui permet l'adhésion aux cellules endothéliales en conditions statiques et dynamiques [115]. De même, BfmS, OmpA, Omp33, LH92_11085 et Bap participent à l'adhésion aux cellules épithéliales [101–103,106,112]. Enfin, la surexpression de l'ARN non codant sRNA 13753 dont la cible n'a pas encore été identifiée, entraîne une augmentation de la formation de biofilm ainsi qu'une augmentation de l'adhésion aux cellules eucaryotes [116].

L'étude de l'interaction entre Ab et son hôte a beaucoup progressé ces dernières années. Un crible fixant par pontage chimique les interactions protéine-protéine existantes lors de l'infection des cellules épithéliales humaines par Ab, a mis en évidence 46 interactions inter-espèces [117]. Lors de ce crible, l'interaction entre OmpA, TonB et les cellules humaines a été confirmée. De surcroît, de nouvelles interactions avec d'autres partenaires ont été mises en évidence. C'est le cas des intégrines qui interagissent avec des protéines d'Ab. Les intégrines sont des récepteurs membranaires qui permettent l'adhésion des cellules à la MEC et les interactions entre cellules eucaryotes. D'autres interactions, avec des protéines assurant l'organisation du cytosquelette (plectine) ou intervenant dans les jonctions intercellulaires (plectine et desmoplakine), ont été identifiées au cours de ce crible [117]. La plectine est une protéine impliquée dans de nombreuses interactions au sein de la cellule. Elle agit comme une matrice et fait le lien entre différentes protéines du cytosquelette en fixant entre autres l'actine et les microtubules [118]. De même, les desmoplakines sont des protéines indispensables à la formation des jonctions intercellulaires adhésives, appelées desmosomes, qui servent d'ancrage aux filaments intermédiaires formant le cytosquelette de la cellule et qui participent au maintien de l'intégrité du tissu épithéliale [119,120]. Ab, en interagissant avec la plectine ou la desmoplakine, pourrait moduler le cytosquelette, déstabiliser les jonctions cellulaires et ainsi faciliter sa dissémination. Par contre, ce crible ne permet pas d'affirmer si les

29

interactions sont directes ou si elles ont lieu au sein de complexe multipartenaire. Les quarante-six interactions inter-espèces identifiées doivent encore être caractérisées au niveau moléculaire. En effet, le récepteur du facteur d'activation plaquettaire (PAFR) est aujourd'hui le seul récepteur des cellules pulmonaires épithéliales clairement identifié comme interagissant avec Ab, *via* des protéines présentes à sa membrane externe contenant des phosphorylcholines (ChoP) [121]. Ce récepteur contribue également à l'internalisation d'Ab dans les cellules non-phagocytaires (Figure 3).

6. 2. Internalisation d'Ab par la cellule infectée

Ab est un pathogène opportuniste extracellulaire. Cependant, plusieurs études suggèrent qu'Ab a la capacité d'entrer dans les cellules épithéliales lors de l'infection [103,104,106,113,121,122]. Peu d'études ont caractérisé les mécanismes impliqués dans l'internalisation d'Ab. Smani *et al.* ont mis en évidence l'interaction entre le récepteur cellulaire PAFR et les ChoP présentes à la surface d'Ab, qui conduit à l'internalisation d'Ab par les cellules eucaryotes [121]. Le prétraitement de souris par des antagonistes à PAFR leur confère une protection lors de l'infection par Ab. En effet, elles présentent une charge bactérienne moins importante et une inflammation moindre, confirmant l'importance *in vivo* de ce mécanisme pour la virulence d'Ab (Figure 4) [121]. Néanmoins, il reste à démontrer si une internalisation d'Ab a lieu *in vivo* et sa pertinence lors de l'infection car l'interaction entre PAFR et les ChoP induit l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium, entraînant la mort de la cellule infectée [121].

Lors d'infections *in vitro*, l'internalisation n'est pas totalement abolie chez le mutant ne présentant pas de ChoP suggérant que d'autres facteurs sont impliqués [121]. En effet, OmpA et Omp33 semblent intervenir également dans l'internalisation d'Ab par des mécanismes inconnus [103,113]. Enfin, l'utilisation de banques de mutants aléatoires a mis en évidence l'importance des phospholipases dans l'internalisation d'Ab [122]. Les phospholipases sont des enzymes clefs qui interviennent dans le métabolisme et le clivage des phosphatidylcholines, un composant majeur des membranes eucaryotes. Les phospholipases identifiées chez Ab sont toutes impliquées dans l'invasion des cellules épithéliales et ont un effet cumulatif. L'utilisation de modèles mammifères et non

mammifères montre que les phospholipases sont impliquées dans la virulence et dans la dissémination d'Ab [122,123].

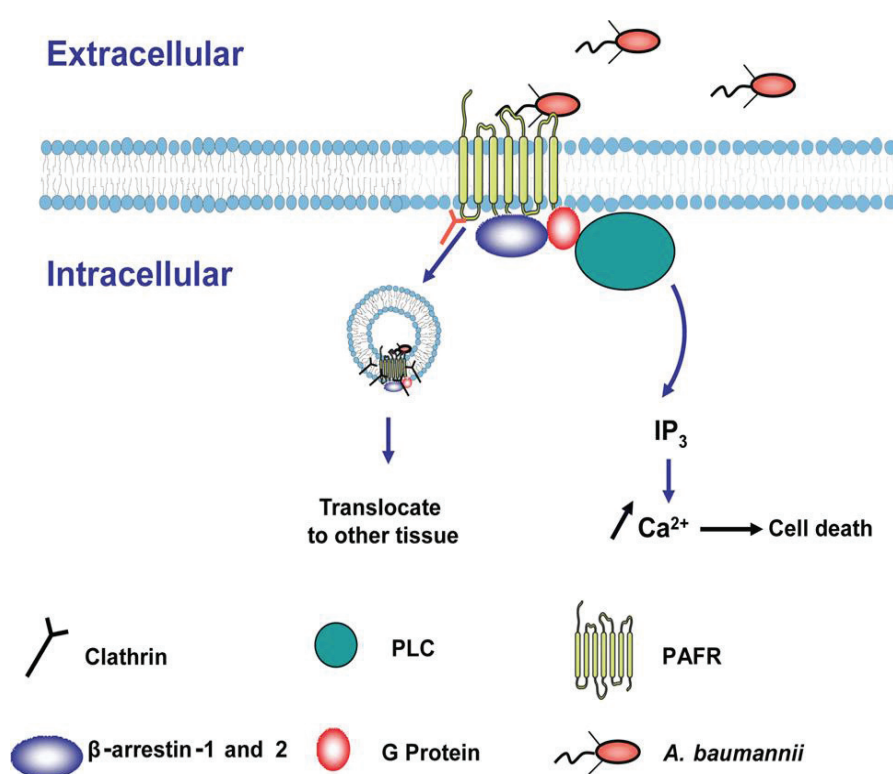


Figure 4. Mécanisme d'adhésion et d'interaction d'Ab avec les cellules épithéliales pulmonaires.

Smani *et al.* proposent que les bactéries interagissent avec les PAFR présentes à la surface des cellules épithéliales pulmonaires *via* les ChoP. Cette interaction entraîne une cascade de signalisation *via* les clathrines, les β arrestines et les protéines G couplées à la phospholipase C. Cette internalisation entraîne une augmentation de la concentration cellulaire en calcium et conduit à la mort de la cellule. Figure extraite de Smani *et al.* [121].

L'activité des filaments d'actine et des microtubules est nécessaire à l'internalisation d'Ab car l'utilisation de drogues telles que la cytochalasine D ou la vinblastine diminue significativement l'entrée d'Ab dans la cellule [103,113,122]. De plus, il semblerait que l'internalisation d'Ab soit également dépendante des clathrines, des β arrestines et des protéines G couplées à la phospholipase C, car leur inhibition empêche son entrée dans la cellule [121]. D'autre part, le prétraitement des souris par un antagoniste de PAFR ne leur confère pas une protection complète contre l'infection par Ab, suggérant que d'autres récepteurs cellulaires sont impliqués dans cette interaction [121].

Une fois dans les cellules, le devenir d'Ab reste non caractérisé. L'observation par microscopie électronique des cellules infectées par Ab montre qu'Ab se situe dans un

compartiment à double membrane, indiquant sa présence dans des autophagosomes [124,125].

Les différents éléments discutés ci-dessus soutiennent l'existence d'une phase intracellulaire d'Ab. Néanmoins, peu d'éléments sont connus concernant le compartiment dans lequel se trouve Ab mais aussi l'ampleur, la nature et la durée de cette phase intracellulaire.

6. 3. Induction de la mort des cellules eucaryotes par Ab

Des facteurs, présents à la surface d'Ab ou sécrétés, perturbant l'homéostasie de la cellule ont été identifiés. Ceux-ci conduisent, pour la plupart, à une cytotoxicité chez les cellules infectées par apoptose, une forme de mort programmée. L'apoptose, dans un contexte physiologique, permet l'élimination de cellules endommagées en limitant les dégâts au niveau tissulaire et donc de maintenir une homéostasie du tissu. Les deux voies intrinsèque et extrinsèque d'apoptose sont induites lors de l'infection par Ab.

6. 3. 1. Voie intrinsèque de l'apoptose

La voie intrinsèque est induite chez les cellules eucaryotes par un signal intracellulaire de stress comme des dommages à l'ADN ou encore un changement de concentration en ions. Ce signal conduit, à travers différentes protéines, à un changement de la perméabilité de la membrane externe mitochondriale et un remodelage des crêtes mitochondriales, entraînant notamment le relargage du cytochrome *c* et de facteurs pro-apoptotiques dans la cellule. Une fois dans le cytosol, le cytochrome *c* recrute la protéine Apaf1 (Apoptotic protease-activating factor 1) et la procaspase-9 formant l'apoptosome, un complexe multiprotéiques clivant les formes pro-enzymatiques des caspases [126–128]. Les formes actives des caspases clivent ensuite des protéines essentielles au fonctionnement de la cellule comme celles du cytosquelette ou celles impliquées dans la réparation de l'ADN ; aboutissant ainsi à la mort de la cellule [129].

L'infection par Ab génère de l'oxyde nitrique (NO) mais aussi une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (Ca^{2+}), qui pourraient être des messagers activant la voie intrinsèque de l'apoptose [121,130,131]. L'augmentation de la

concentration intracellulaire en Ca^{2+} chez la cellule infectée par Ab est la conséquence de l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire et de la libération du Ca^{2+} mitochondrial et du réticulum endoplasmique [121,130]. L'infection par Ab entraîne une diminution du potentiel de membrane mitochondriale, libérant ainsi le cytochrome *c* qui entraîne l'apparition des formes actives des caspases 3 et 9 et d'autres facteurs pro-apoptotiques tel que le facteur AIF [130,132,133].

La mort cellulaire induite par Ab peut également être indépendante de l'activation des caspases. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de l'ensemble des caspases n'abolit pas complètement la mort cellulaire [131,132]. Le facteur AIF libéré lors de l'infection par Ab pourrait dégrader directement la chromatine sans intervention des caspases, aboutissant ainsi à la mort de la cellule [132].

6. 3. 2. Voie extrinsèque de l'apoptose

Lors de l'infection par Ab, il y a apparition de la forme active de la caspase 8, spécifique à la voie extrinsèque. L'activation de cette seconde voie de l'apoptose est dépendante de la fixation du ligand spécifique au récepteur de mort cellulaire présent à la surface des cellules eucaryotes [132]. Le récepteur impliqué n'a pour le moment pas été clairement identifié. Toutefois, le facteur de nécrose tumorale α ($\text{TNF}\alpha$), une importante cytokine pro-inflammatoire, est impliqué dans la mort des cellules épithéliales lors de leur infection par Ab [130]. Le $\text{TNF}\alpha$ est un des ligands majeurs du récepteur de mort cellulaire associé à la voie extrinsèque de l'apoptose.

6. 3. 3. Facteurs d'Ab induisant l'apoptose

En plus de ces différents rôles dans l'adhésion, OmpA est également un facteur de virulence d'Ab impliqué dans l'induction de la voie intrinsèque de l'apoptose. Lors de sa transfection, OmpA localise à la membrane mitochondriale et induit la libération du cytochrome *c* et du facteur AIF [132]. OmpA localise également dans le noyau où elle clive l'ADN grâce à son activité endonucléase [134,135] (Figure 6). Ces études se basant sur la surexpression artificielle d'OmpA, il reste à déterminer si OmpA agit directement sur les cibles lors de l'infection.

OmpA est libérée dans les conditions de culture *in vitro* et *in vivo* lors de l'infection d'un model murin *via* des vésicules (OMV pour Outer Membrane Vesicles) [135,136]. Chez le mutant $\Delta ompA$, l'absence d'OmpA déstabilise la surface membranaire de la bactérie [132,137]. Au vu de l'effet pléiotropique d'OmpA chez Ab, il est possible que certains effets observés puissent être dus à cette déstabilisation et non à un effet direct d'OmpA (Figure 5).

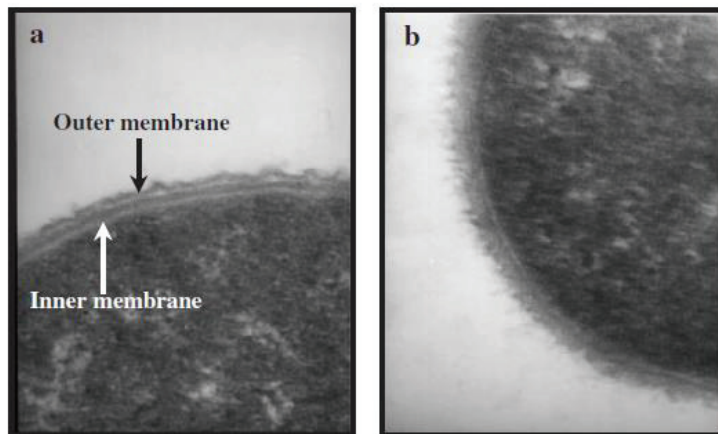


Figure 5. Déstabilisation de la paroi chez le mutant 19606 $\Delta ompA$.

Images de microscopie électronique de la paroi a) de la souche 19606 b) et de son mutant 19606 $\Delta ompA$. Grossissement x40 000. Images issues de Choi *et al.* [132].

Comme dans le cas de OmpA, il y a induction d'apoptose chez les cellules transfectées par Omp33 avec une disparition du potentiel de membrane mitochondriale et un clivage des formes inactives des caspases 3 et 9 [124]. D'autres phénotypes liés à l'apoptose sont aussi observés par microscopie : le marquage des phosphatidylsérines à la surface cellulaire, marqueur spécifique des cellules apoptotiques ; une fragmentation de l'ADN. Une perméabilité des cellules au propidium iodure (IP), un intercalant de l'ADN témoin de la mort cellulaire apoptotique mais également nécrotique est également observée par microscopie. Lors du traitement des cellules avec Omp33, il a également été observé une rétraction des cellules associée à une perte de la structure du cytosquelette d'actine suivi de leur détachement [113].

Une augmentation de la mort cellulaire chez les cellules épithéliales humaines traitées avec les surnageants filtrés de cultures d'Ab suggère la sécrétion d'éléments cytotoxiques par Ab [133]. En effet, Ab libère des OMV dans son milieu comme d'autres bactéries à Gram négatif [136,138–140]. La quantité et la composition des OMV formées sont influencées par les conditions environnementales dans lesquelles évoluent la bactérie, mais aussi par sa phase de croissance [141,142]. Chez Ab, leur formation a lieu principalement durant la phase stationnaire et augmente lors d'exposition sub-léthale au

ceftazidime, un antibiotique interférant avec la synthèse du peptidoglycane. Chez Ab, la formation des OMV a été observée *in vitro* chez de nombreuses souches mais également par microscopie électronique chez des souris infectées [136] (Figure 6).

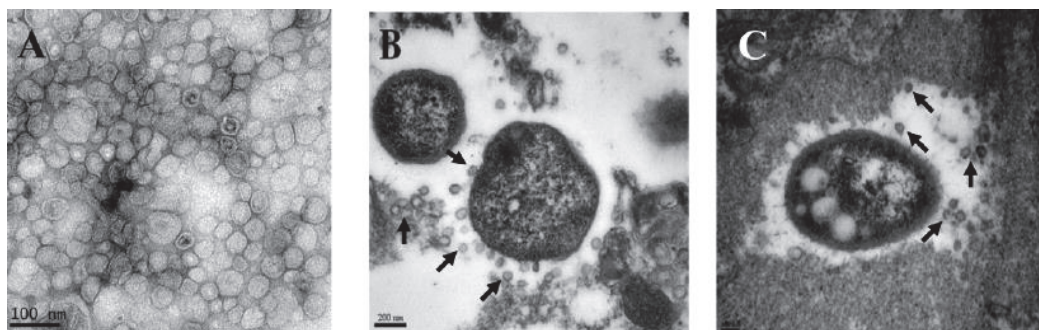


Figure 6. OMV libérées par Ab au cours de sa culture *in vitro* et lors d'infection *in vivo*.

Image de microscopie électronique A) d'une préparation du surnageant de la souche 19606 cultivée en LB_{broth} pendant 24h B-C) de la libération des OMV par la souche 19606 lors de l'infection d'une souris par voie intra-trachéale avec 1×10^7 CFU (Colony Forming Unit), sacrifiées après 48h. Images de microscopie électronique d'une coupe de poumon infecté. Les flèches indiquent les OMV formées par Ab. Images issues de Jin *et al.* [136].

Les OMV sont un moyen de délivrer des molécules aux cellules eucaryotes. L'internalisation par les cellules des OMV d'Ab, ainsi que son contenu protéique, est dépendante des radeaux lipidiques [136] (Figure 7). OmpA, présente à la surface d'Ab, est sécrétée *via* les OMV et participe à leur biogenèse [136,137]. Les OMV de la souche $\Delta ompA$ diffèrent des OMV de la souche sauvage par leur composition en protéines, aboutissant à une absence de cytotoxicité chez les cellules eucaryotes traitées [137].

Il est important de tenir compte de la variation de la composition des OMV d'une souche à l'autre d'Ab. L'étude comparative des OMV de la souche MDR A38 et de la souche non-MDR 5806, toutes deux isolées dans un même hôpital, illustre cela [142]. En effet, les souches A38 et 5806 contiennent respectivement 57 et 47 protéines qui leurs sont uniques malgré des conditions de culture identiques. Les OMV de la souche A38 induisent une cytotoxicité et une réponse immunitaire plus importantes chez les macrophages murins et les cellules épithéliales humaines. Ces OMV sont enrichies en protéines associées à l'acquisition du fer ou à l'antibiorésistance mais aussi en protéines telles que OmpA [142,143].

7. Réponse immunitaire induite lors de l'infection par Ab

Notre organisme a développé deux systèmes de réponse immunitaire (RI) pour se défendre des attaques de pathogènes : une RI innée et une RI adaptative. La RI innée est la première ligne de défense à être mobilisée. Elle conduit à l'activation de diverses cascades de signalisation, initialisant et orientant la réponse inflammatoire qui, par conséquent, active les cellules du système immunitaire adaptatif permettant une protection durable et spécifique.

Les pathogènes sont reconnus par les PRR (Pattern Recognition Receptor) qui reconnaissent des motifs particuliers du non soi. Parmi ces PRR nous retrouvons les TLR (Toll-Like Receptor), des récepteurs transmembranaires présents à la surface de la majorité des cellules eucaryotes. Chez l'Homme, dix TLR permettent la détection de motifs conservés caractéristiques des micro-organismes, les PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns). Chaque TLR a sa spécificité de ligands. D'autres PRR, tels que les NLR (Nucleotide-binding oligomerization domain-Like Receptors ou Nod-Like Receptors), présents dans le cytosol, permettent la reconnaissance de motifs caractéristiques bactériens.

La signalisation *via* les PRR entraîne l'activation de la transcription de gènes par l'intermédiaire de différentes voies comme celles dépendantes des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) [144]. L'activation de différents facteurs de transcription, tels que le NF- κ B (Nuclear Factor- κ B), permet la mise en place de la réponse inflammatoire chez l'hôte et ainsi la lutte contre l'infection. Dans le cytoplasme, le facteur de transcription NF- κ B est présent sous forme inactive, complexé à I κ B- α . Suite à des stimuli, I κ B- α est ubiquitiné et dégradé par le protéasome, libérant le complexe NF- κ B. Après la phosphorylation de p65, un des composants du complexe, NF- κ B est transloqué dans le noyau et permet l'induction de l'expression et la sécrétion de cytokines qui permettent le recrutement et l'activation de cellules immunitaires sur le site d'infection [145].

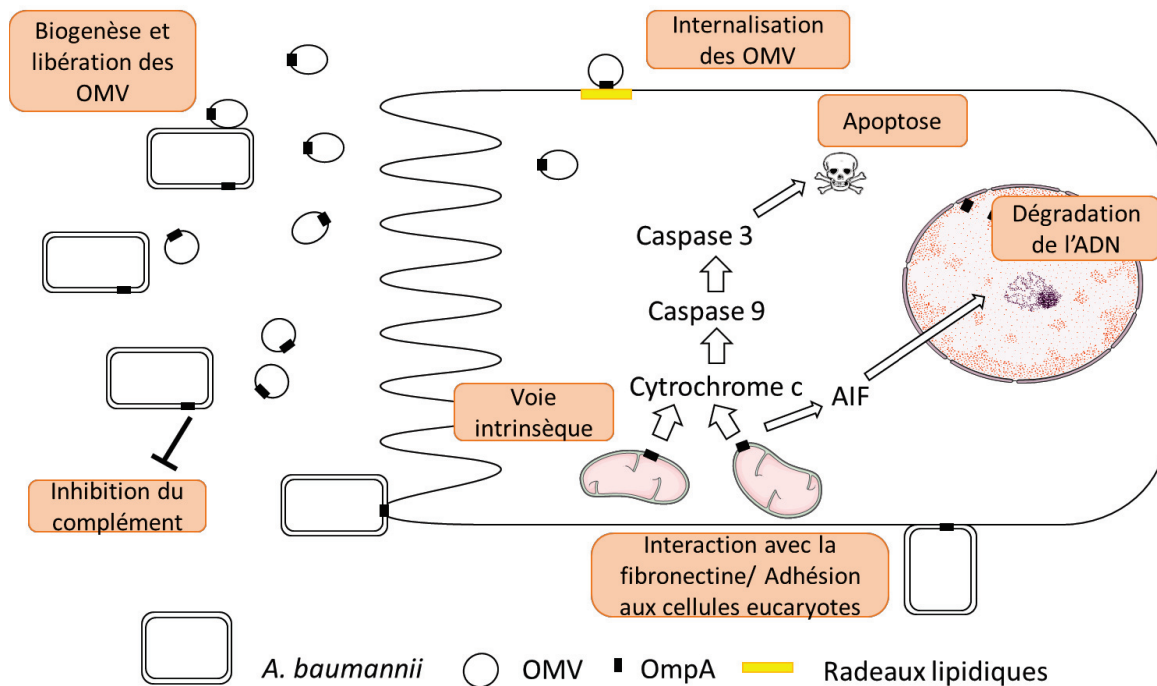


Figure 7. Les fonctions d'OmpA identifiées chez Ab.

Schéma représentant les fonctions de OmpA et son interaction avec les OMV. OmpA est présente à la surface d'Ab. Elle est sécrétée *via* les OMV et participe à leur biogenèse. OmpA permet l'adhésion d'Ab aux cellules eucaryotes. Les OMV sont internalisées au niveau des radeaux lipidiques de la cellule épithéliale pulmonaire. L'internalisation de OmpA induit l'apoptose de la cellule en s'insérant au niveau de la membrane mitochondriale et en la déstabilisant, entraînant une cascade de signalisation. OmpA localise au niveau du noyau et a un rôle d'endonucléase. Schéma inspiré des travaux de Choi *et al.* ; Jin *et al.* ; Moon *et al.* [134,135,135–137].

Dans le cadre de cette introduction, j'ai choisi de détailler la reconnaissance d'Ab par les PRR, l'interaction d'Ab avec les cellules du SI inné les plus sollicitées et la réponse immunitaire induite lors de l'infection par Ab. Néanmoins, la RI adaptative et la mémoire induite sont importantes dans le cadre de la vaccination. Face à la montée du nombre de souches MDR d'Ab, la vaccination pourrait constituer une mesure préventive intéressante.

7.1. Reconnaissance d'Ab par les PRR

7. 1. 1. Reconnaissance par le TLR4

Le TLR4 est un récepteur présent à la surface des cellules eucaryotes qui reconnaît les lipopolysaccharides (LPS), composants majeurs de la membrane externe chez les

bactéries à Gram négatif [146]. Différentes études ont montré l'implication du TLR4 de différents types cellulaires dans la reconnaissance d'Ab et son élimination.

Les souris déficientes en TLR4 infectées par Ab présentent, après 4h et 24h d'infection, une charge bactérienne plus importante au niveau pulmonaire et au niveau sanguin [147]. Ceci s'explique par un délai dans l'induction d'une réponse inflammatoire ainsi qu'une diminution du recrutement des cellules polynucléaires au niveau pulmonaire chez les souris TLR4^{-/-} infectées [147].

L'infection par Ab de cultures primaires de macrophages, de cellules dendritiques murines et de cellules épithéliales pulmonaires humaines conduit également à une signalisation et une production de cytokines *via* le TLR4 (Figure 8) [148,149]. Une augmentation de la phosphorylation de p65 et la dégradation d'I κ B- α , permettant la translocation de NF- κ B dans le noyau, sont observées chez les cellules stimulées par Ab *via* le TLR4. Une phosphorylation des protéines de la famille des MAPK, p38, JNK et ERK dépendante de TLR4 est aussi observée lors de l'infection [148,149].

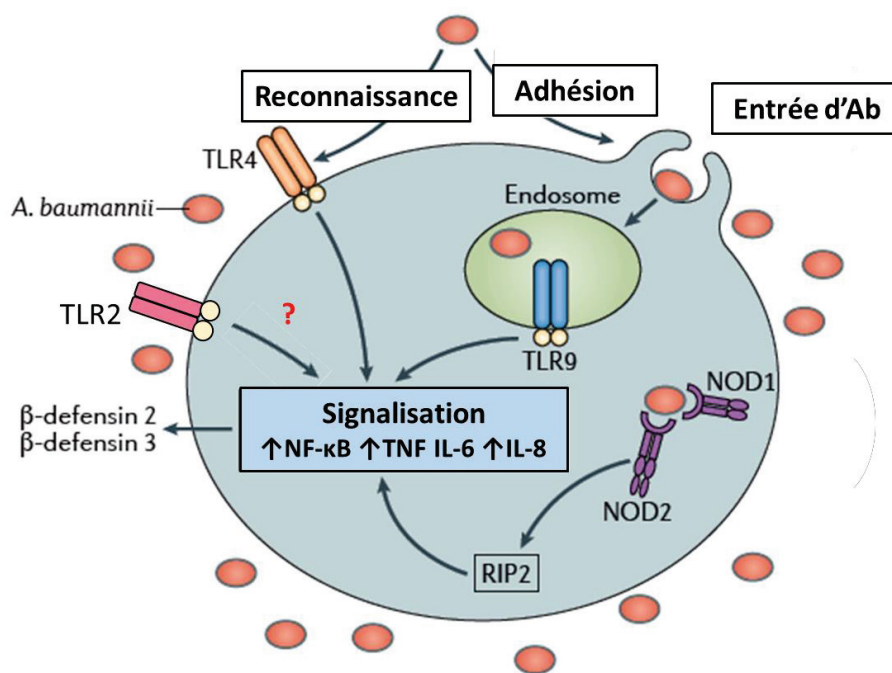


Figure 8. Reconnaissance et réponse immunitaire induite par Ab lors de l'infection d'une cellule épithéliale.

Ab est détectée à la surface de la cellule épithéliale par le TLR4. Cette reconnaissance entraîne, *via* la signalisation par les MAPK et le facteur transcriptionnel NF- κ B, la transcription de gènes cibles, notamment pro-inflammatoires. La reconnaissance d'Ab par le TLR2 est controversée. Les récepteurs intracellulaires TLR9 et NOD1/NOD2 via Rip2 entraînent également la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation.

Schéma adapté de la revue de Harding et al. [151].

L'élimination d'Ab par le macrophage est directement dépendante de la signalisation *via* le TLR4, impliqué dans l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible. Le NO produit joue un rôle significatif dans les phases précoces de l'infection par Ab [149,150].

7. 1. 2. Reconnaissance par le TLR2

Le TLR2 est principalement impliqué dans la reconnaissance des bactéries à Gram positif puisqu'il est impliqué dans la reconnaissance du peptidoglycane et des lipoprotéines. Néanmoins, quelques études suggèrent un rôle du TLR2 dans la reconnaissance et la protection de l'hôte lors de l'infection par Ab mais cela reste controversé.

Les souris TLR2^{-/-} infectées par Ab présentent une charge bactérienne pulmonaire moins importante à 24h ou, à l'inverse, un délai dans l'élimination d'Ab, selon la souche inoculée et la charge bactérienne [147,152]. *In vitro*, chez les cellules épithéliales, l'expression d'IL-8 fait suite à la stimulation du TLR2 par Ab (Figure 8) [148]. En revanche, aucune différence dans l'induction de cytokines n'est observée entre les cultures primaires de macrophages murins sauvages et celles déficientes pour le TLR2 [149]. Tandis que les souches d'Ab déficientes en LPS stimulent de manière moins importante l'activation de NK- κ B et la production de TNF α *via* le TLR2 de macrophages murins [153].

7. 1. 3. Reconnaissance par le TLR9

Le TLR9 est un récepteur intracellulaire localisé à la membrane endosomale. Il reconnaît les motifs CpG non méthylés de l'ADN d'origine bactérienne [154]. Ab est reconnue par le TLR9 et induit l'activation de NF- κ B chez les cellules HEK (Figure 8) [155]. *In vivo*, l'absence de TLR9 chez les souris infectées entraîne une charge bactérienne plus importante au niveau pulmonaire ainsi que l'augmentation du recrutement de cellules immunitaires alors qu'une diminution de la production de TNF α et d'IFN- γ est observée. Ab se dissémine au sein de l'organisme avec une charge plus importante dans le rein et le foie chez les souris TLR9^{-/-}. L'utilisation du modèle murin montre que le TLR9 est important pour la maîtrise de l'infection et de la dissémination d'Ab [155].

7. 1. 4. Reconnaissance par les NLR

La famille des NLR comprend 22 membres chez l'Homme. Les NLR les plus étudiés appartiennent aux sous-groupes NLRC et NLRP.

Nod1 et Nod2, membre des NLRC, sont deux récepteurs cytoplasmiques reconnaissant des motifs du peptidoglycane [156]. Rip 2, l'adaptateur de Nod1/2, est impliqué dans le contrôle de la phase intracellulaire d'Ab, par l'augmentation de la sécrétion d'IL-8 et de TNF α *via* le NF- κ B. Cette stimulation entraîne la production de β -défensines hBD2, un peptide antimicrobien spécifique aux cellules épithéliales pulmonaires (Figure 8) [157]. La diminution de l'expression de Rip 2 entraîne l'augmentation du nombre de bactéries intracellulaires chez les cellules épithéliales jusqu'à 48h après infection [157]. A l'inverse, chez les macrophages, la voie Nod1/Nod2-Rip2 n'intervient pas dans le contrôle de la survie intracellulaire d'Ab mais dans la production de cytokines (TNF α et IL-8) [157].

NLRP3 et NLRC4 participent à la formation de l'inflammasome, un complexe multiprotéique qui clive la procaspase 1 et conduit à la formation des formes matures d'IL-1 β et d'IL8. Ab seul est capable d'induire les signaux de « priming » et d'activation conduisant à la formation de l'inflammasome [130,158,159]. L'infection des macrophages murins par Ab induit la production d'IL-1 β , dépendante de la présence de NLRP3 et des caspases-1/11 mais pas de NLRC4 [158]. Suite à leur stimulation par Ab, les neutrophiles produisent également de l'IL-1 β , de façon dépendante de NLRP3 et des caspases-1/11 [158].

In vivo, dans les lavages broncho-alvéolaires des souris NLRP3^{-/-} et caspases-1/11^{-/-} infectées par Ab, une diminution de la quantité d'IL-1 β est observée par rapport à celle retrouvée chez les souris sauvages. En revanche, les concentrations en TNF α , IL-10, et chémoattractants restent inchangées et aucune différence dans la charge bactérienne n'est observée [158]. NLRP3 ne semble donc pas requis, *in vivo*, pour l'élimination d'Ab. Néanmoins, ces données sont à nuancer avec l'étude menée par Dikshit *et al.* qui ont comparé l'impact de la réponse NLRP3 lors d'infection par une souche de laboratoire et deux isolats cliniques XDR d'Ab [159]. Après 24h, les souris infectées par les souches cliniques XDR ont une concentration en IL-1 β et IL-18, dépendante de NLRP3, significativement plus importante que les souris infectées par la souche de laboratoire.

De même les souches cliniques XDR ont une charge bactérienne, au niveau pulmonaire et sanguin, plus importante à 24h, 48h et jusqu'à 72h après infection. Cette différence de charge peut s'expliquer par les délais observés dans le recrutement des neutrophiles chez les souris infectées par les souches cliniques XDR. En conclusion, NLRP3 est impliqué dans le contrôle de la charge bactérienne et dans le recrutement des neutrophiles chez les souris infectées par les souches cliniques XDR [159]. L'inflammasome joue donc un rôle dans l'élimination efficace de certaines souches d'Ab en permettant la production d'IL-1 β et d'IL-18, ainsi que le recrutement de neutrophiles pour combattre l'infection.

7. 1. 5. Reconnaissance par d'autres PRR : RAGE

RAGE est un récepteur appartenant à la famille des PRR reconnaissant différents ligands grâce à leurs propriétés électrostatiques [160]. Dans les conditions physiologiques, RAGE est présent au niveau de tous les tissus mais est très fortement exprimé au niveau pulmonaire. Celui-ci est présent sur différents types cellulaires dont certaines cellules du SI. La reconnaissance par RAGE, tout comme celle par le TLR9, peut être bénéfique ou délétère pour l'hôte [160].

Actuellement, peu d'informations sont disponibles concernant l'implication de RAGE dans la détection et la RI contre Ab. En effet, seule une étude a tenté d'élucider son rôle. Dans le cadre de l'infection pulmonaire d'un modèle murin par Ab, la présence ou l'absence de RAGE n'entraînerait aucun effet sur la résolution de l'infection. En revanche, dans le cadre d'une infection systémique, RAGE aurait un effet délétère en diminuant la production d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire. Le traitement préalable des souris sauvages avec de l'IL-10 augmente significativement leur survie. De même, les souris RAGE^{-/-} traitées avec des antagonistes à l'IL-10 voient leur mortalité augmenter significativement [160].

7. 2. Effecteurs de la RI innée impliqués dans l'infection à Ab

7. 2. 1. Sérum et complément

Le sang est composé de cellules (les globules rouges et blancs et les plaquettes) et de plasma contenant le sérum et les facteurs de coagulation. Les éléments composants le complément sont présents de manière basale dans le plasma. Le complément permet l'opsonisation d'éléments du non soi, c'est-à-dire le recouvrement du corps étranger pour en permettre une reconnaissance plus efficace par les cellules phagocytaires du SI. Il

permet aussi, s'il est activé, d'induire la formation du complexe d'attaque membranaire qui s'insère au niveau de la membrane du pathogène, entraînant la formation d'un pore et la mort du pathogène. Les anticorps participent aussi à l'opsonisation des bactéries et agissent en synergie avec le complément.

Après incubation de différentes souches d'Ab (virulentes et hypervirulentes) avec du sérum humain, seulement 5 à 10 % de l'inoculum initial est éliminé [161]. En effet, Ab est peu sensible au sérum car il a développé différents mécanismes afin d'échapper à son élimination. L'utilisation de banques de mutants aléatoires a permis l'identification de 50 gènes essentiels à la survie d'Ab dans le sérum et le complément. Ces études mettent en évidence la complexité des mécanismes mis en œuvre par Ab pour échapper à son élimination [122,162]. Plus particulièrement, les phospholipases impliquées dans la résistance au sérum et identifiées lors d'un même crible sont essentielles pour la dissémination *in vivo* d'Ab [122,123]. Ab sécrète également dans son milieu une protéase à sérine qui inhibe l'action du complément [163]. CipA, une protéine à la surface d'Ab, dégrade le fibrinogène en se fixant au plasminogène. Elle dégrade également certains des éléments présents dans le sérum et C3b, inhibant la voie alternative d'activation du complément. [164]. Tuf, une autre protéine présente à la surface d'Ab, montre un mode de fonctionnement identique à celui de CipA [165].

OmpA jouerait également un rôle dans la résistance au complément en fixant le facteur H, un régulateur de l'activation du complément [166]. Cependant, son rôle est controversé. En effet, la fixation du facteur H par OmpA à la surface d'Ab n'a pas pu être démontrée en utilisant d'autres souches [167]. La fixation du facteur H pourrait alors être un mécanisme spécifique à certaines souches.

Un des facteurs majeurs participant à la pathogénie d'Ab est sa capsule extracellulaire, qui est aussi responsable de sa résistance au sérum [9]. L'importance de cette capsule a été confirmée en la surexprimant chez une souche de laboratoire, entraînant une augmentation de la résistance d'Ab au complément et de sa virulence *in vivo* [11].

Toutefois, Ab reste sensible à des facteurs solubles antimicrobiens sécrétés par différentes cellules de l'hôte comme le peptide LL-37 sécrété par les neutrophiles et les

cellules épithéliales ou les β -défensines hBD2 et hBD3 sécrétées par les cellules épithéliales [148,168,169] (Figure 9).

7. 2. 2. Les neutrophiles

Les neutrophiles sont des cellules du SI inné essentielles au contrôle et à l'élimination d'Ab lors de l'infection de l'hôte [170].

Dans le cas d'infections de souris sauvages, les neutrophiles sont retrouvés dès 4h après infection dans les lavages broncho-alvéolaires. Leur nombre augmente jusqu'à 3 jours après l'infection. Puis, après 5 jours, il diminue jusqu'à atteindre leur taux initial (avant infection) [150,171]. Chez les souris sauvages, Ab n'est plus détecté après 3 jours suite à son élimination par les neutrophiles.

La déplétion des neutrophiles, *in vivo*, entraîne un retard dans l'expression des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, le TNF α ou encore les chémoattractants des macrophages, monocytes ou kératinocytes [170]. Cette déficience en neutrophiles est à l'origine de la nette diminution du taux de survie des souris infectées. Selon les études et l'inoculum injecté, un taux de mortalité entre 70 % et 100 % est observé chez les souris préalablement déplétées de leurs neutrophiles, après 3 jours d'infection par Ab [170,171]. L'absence de neutrophiles rend l'infection par Ab létale.

Les souris A/J sont plus sensibles à l'infection par Ab que les souris C57BL/6. En effet, chez les souris A/J une mortalité et une inflammation plus importante sont observées [172]. Cette vulnérabilité est la conséquence d'un délai dans le recrutement de neutrophiles. De plus, leur nombre est moins important sur le site de l'infection jusqu'à 24h après inoculation [172]. Cette étude confirme que les neutrophiles sont essentiels à l'élimination d'Ab et montre l'importance de leur recrutement précoce sur le site de l'infection (Figure 9).

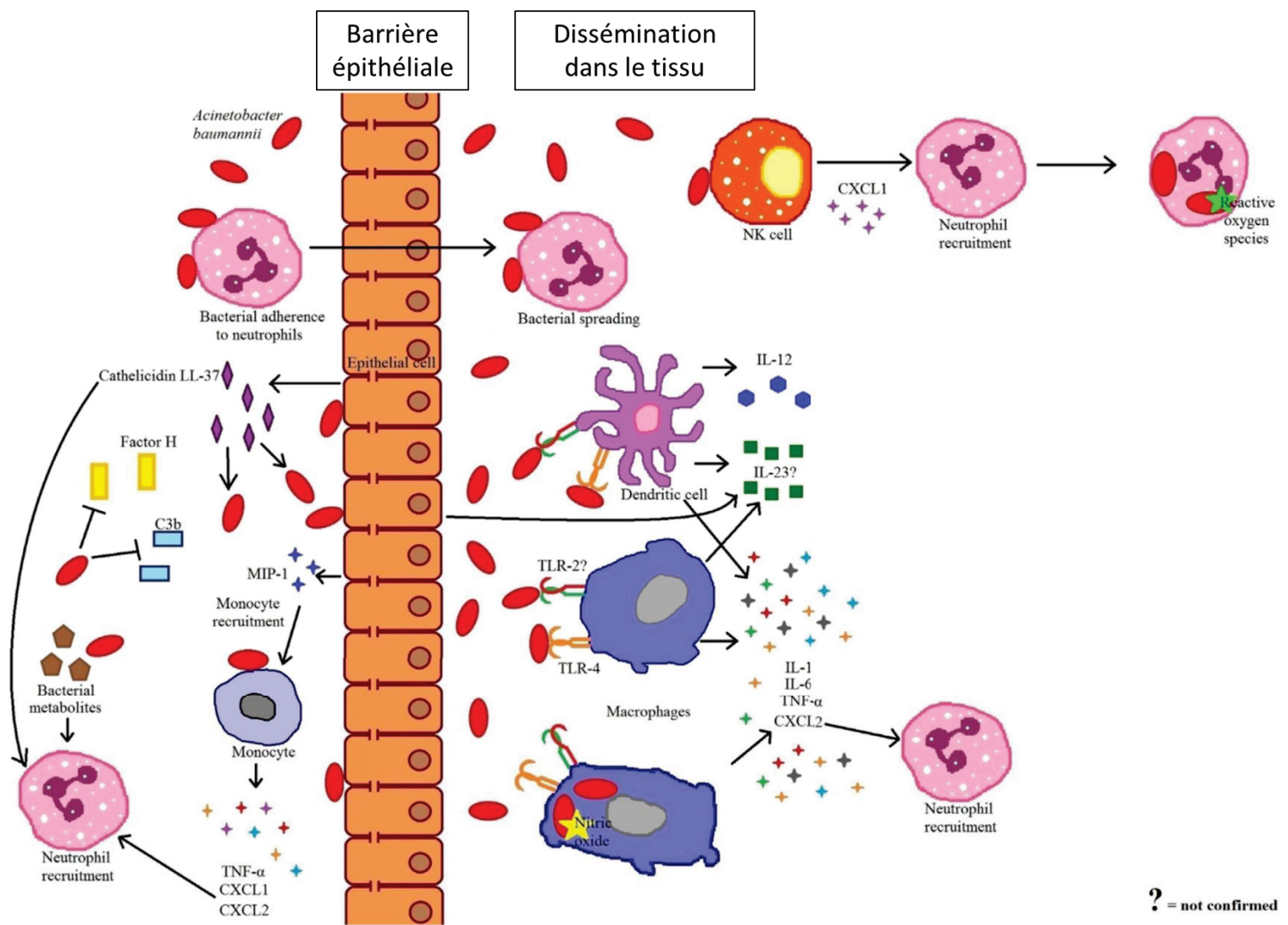


Figure 9. Réponse immunitaire induite lors de l'infection par Ab.

Ab, sur le site d'infection, résiste et inhibe les fonctions du complément. La production de métabolites par la bactérie joue le rôle de chémoattractant pour les neutrophiles. La reconnaissance d'Ab par les cellules épithéliales entraîne la production de cytokines permettant le recrutement des cellules immunitaires et d'antimicrobiens qui participent à la neutralisation d'Ab. Les neutrophiles éliminent Ab, cependant une faible partie des bactéries survit et utilise les neutrophiles pour passer la barrière épithéliale. Les macrophages ayant reconnu Ab, *via* leurs TLR, sécrètent des cytokines, phagocytent et éliminent les bactéries grâce à la production de NO. Même après l'élimination d'Ab, bien que le taux de neutrophiles diminue rapidement jusqu'à son taux initial, le nombre de macrophages revient plus lentement à son niveau de base. Les cellules dendritiques qui reconnaissent Ab, *via* leurs TLR, ainsi que les cellules NK, sécrètent des cytokines. La sécrétion de ces cytokines entraîne un recrutement plus important de neutrophiles pour combattre l'infection. Figure adaptée de la revue García-Patiño *et al.* [178].

En comparaison avec à *P. aeruginosa*, Ab survit davantage aux neutrophiles en les activant moins et en entraînant la formation retardée de NET (Neutrophil Extracellular Trap) [173]. Ces pièges apparaissent après l'activation et la mort des neutrophiles qui

relarguent, dans le milieu extracellulaire, des fibres de chromatine décondensées associées à diverses protéines issues de différents compartiments cellulaires [174,175]. Les neutrophiles sont attirés sur le site d'infection par l'acétate de phényle, un produit intermédiaire du catabolisme de l'acide phénylacétique produit par Ab [176]. La co-culture de neutrophiles en présence d'Ab a montré qu'Ab adhère et interagit directement avec les neutrophiles, même lorsque leurs capacités de mouvement et de phagocytose sont inhibées [177]. Ab étant non-motile, ce mécanisme pourrait être un moyen de dissémination à travers l'organisme.

7. 2. 3. Les macrophages

Le macrophage est également un acteur important pour l'élimination efficace d'Ab. En effet, les macrophages sont les premières cellules immunitaires présentes sur le site d'infection [150,170]. L'examen des lavages broncho-alvéolaires de souris infectées par Ab a montré que les macrophages sont initialement présents au niveau pulmonaire et représentent 98,7 % des cellules après 2h d'infection [150]. Après 4h d'infection, les macrophages restent les cellules prédominantes. Ce n'est qu'après 24h d'infection que les neutrophiles représentent 90 % des cellules retrouvées dans les lavages (Figure 9) [171]. La déplétion des macrophages entraîne un retard dans l'élimination d'Ab. Ce retard est dû à un délai dans la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, qui permettent le recrutement des cellules immunitaires sur le site d'infection, sans qu'aucun impact sur la survie des souris infectées ne soit observé [150].

7. 2. 4. Les cellules NK (Natural Killer)

Les cellules NK sont des cellules qui permettent à l'organisme de reconnaître et d'éliminer les cellules infectées par des pathogènes en libérant des enzymes perforantes. Les cellules NK participent également à la RI en sécrétant des cytokines. Elles jouent un rôle dans l'infection d'Ab en permettant son élimination mais surtout en permettant le recrutement de neutrophiles et de macrophages [171] (Figure 9). La déplétion des cellules NK entraîne 50 % de mortalité alors que l'infection de souris sauvages à un même inoculum n'entraîne aucune mortalité. L'absence des cellules NK entraîne une diminution du nombre de neutrophiles et de macrophages chez les souris infectées en raison de l'absence de la protéine chimio-attractante KC [171].

8. Les Systèmes de Sécrétion (SS) chez Ab

8. 1. Introduction

Les SS permettent aux bactéries de sécréter des molécules dans le milieu extracellulaire. Cette sécrétion permet la dégradation et l'utilisation de composés présents dans l'environnement ou au sein d'une cellule cible (procaryote ou eucaryote) ; entraînant ainsi sa mort ou la modulation de fonctions cellulaires spécifiques.

Les SS peuvent être répartis en différentes catégories selon le nombre et le type de membranes qu'ils traversent (membrane interne et externe de la bactérie ou de la cellule cible). Les SS de type I et II (SST1 et SST2) permettent à l'effecteur sécrété de traverser les membranes internes et externes de la bactérie pour rejoindre le milieu extracellulaire. Le SST5, lui, permet le passage d'effecteurs à travers la membrane externe de la bactérie. Cependant, il nécessite un autre transporteur pour que ces effecteurs soient au préalable transportés du cytoplasme vers le périplasme. Quant aux SST3, SST4 et SST6, ils permettent l'injection de molécules (ADN ou protéines) directement dans la cellule cible. Enfin, les SST7 et SST9, les plus récemment identifiés, permettent la sécrétion de protéines dans le milieu extracellulaire ou dans des cellules cibles. Pour une partie de ces systèmes (SST1, SST2, SST5), la sécrétion se fait en plusieurs étapes tandis que pour l'autre (SST3, SST4 et SST6), il n'y a qu'une seule unité qui permet la sécrétion directement dans une cellule cible.

Acinetobacter possède plusieurs SS (Figure 10). Ces systèmes et leur régulation chez Ab sont détaillés ci-dessous.

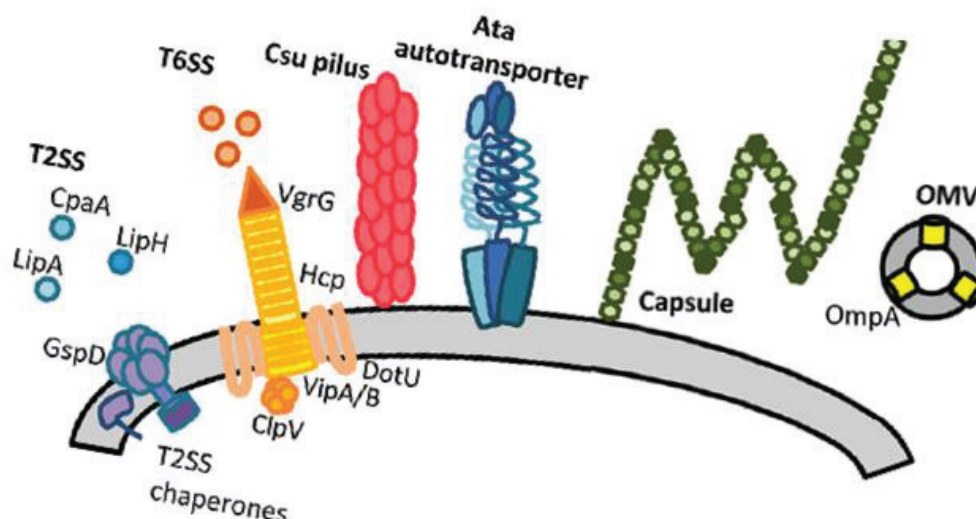


Figure 10. Cartographie des systèmes essentiels à la virulence d'Ab et présents à sa surface.

Ab sécrète dans le milieu extracellulaire des effecteurs (LipA, CpaA et LipH) *via* son SST2 qui est essentiel à sa virulence. Le SST6 joue un rôle dans la compétition bactérienne et permet l'injection d'effecteurs dans la cellule cible. Ab présente à sa surface des pili jouant un rôle dans l'adhésion aux surfaces abiotiques et biotiques. Ata est l'auto transporteur (appartenant au SST5) impliqué dans l'adhésion aux cellules eucaryotes. La capsule produite par Ab lui permet de résister au sérum et est importante pour la virulence d'Ab. OmpA, qui est présent à la surface, est sécrétée notamment à travers les OMV : elle a un rôle essentiel dans la virulence d'Ab. Figure adaptée de la revue de Weber *et al.* [9].

8. 2. Le SST1

Le SST1 forme un canal permettant la sécrétion d'une grande variété de protéines de tailles et de fonctions diverses, du cytoplasme vers le milieu extracellulaire [179].

Des composants du SST1 chez *A. nosocomialis* et Ab ont été identifiés par homologie de séquences avec ceux présents chez *E. coli* [180]. L'analyse des protéines sécrétées par les souches sauvages et mutantes dépourvues du SST1 a confirmé qu'*A. nosocomialis* possède un SST1 fonctionnel et qu'il permet notamment la sécrétion de Bap. Ainsi, une importante réduction de la formation de biofilm a été observée chez le mutant du SST1 [181]. Cependant, bien qu'aucune étude n'ait encore mis en évidence la fonctionnalité de ce système chez Ab, la proximité génétique entre Ab et *A. nosocomialis* laisse supposer qu'Ab posséderait un SST1.

8. 3. Le SST2

La sécrétion à travers le SST2 se déroule en 2 étapes. Dans un premier temps, la protéine à exporter passe à travers la membrane interne par les systèmes Tat ou Sec, sous sa forme repliée ou dépliée, pour rejoindre le périplasma. Dans un second temps, le substrat est inséré et poussé à travers un canal, formé de sécrétine, par le pseudo-pilus afin de passer la membrane externe [179].

Par des analyses de recherche d'homologies de séquences avec des composants du SST2 chez *P. aeruginosa* et *V. cholerae*, l'ensemble des gènes associés au SST2 chez Ab a été mis en évidence [182,183]. Le mutant de *gspD*, le composant du SST2 ancré à la membrane externe de la bactérie, présente un défaut dans la colonisation des souris par rapport aux souches sauvages. Le même phénotype est observé pour le mutant de *lipA* d'Ab, une lipase sécrétée par le SST2. LipA et sa chaperonne LipB permettent la dégradation et l'utilisation des lipides par Ab [184]. L'expérience *in vivo* montre l'importance du SST2 mais aussi de LipA dans la colonisation de l'hôte [184]. Bien que la régulation de ce système ne soit pas connue, le SST2 est exprimé dans des conditions de laboratoire et davantage en phase exponentielle ainsi qu'en présence de sérum humain [185]. CpaA et LipH ont récemment été identifiés comme deux nouveaux effecteurs du SST2. De manière surprenante, le couple CpaA et sa chaperonne CpaB est absent des souches de laboratoire d'Ab. Cela montre l'importance de l'acquisition de gènes de virulence par les souches cliniques d'Ab [181].

L'ensemble de ces données suggère que le SST2 est conservé et qu'il a une importance clinique chez *Acinetobacter*. C'est pourquoi il paraît aujourd'hui indispensable d'étudier la virulence d'espèces bactériennes en associant souches de laboratoire et souches cliniques.

8. 4. Le SST5

Le SST5 est composé de deux sous familles : les systèmes à deux partenaires et les autotransporteurs. Un autotransporteur est composé d'une protéine à exporter et d'un transporteur, formant un seul et même polypeptide. Sa sécrétion requiert une translocation de sa forme dépliée par le système de transport Sec, du cytoplasme vers le périplasma [179]. Une fois dans le périplasma, le transporteur s'insère au niveau de la

membrane externe et forme un pore permettant le passage de sa protéine vers l'extérieur de la bactérie.

Ata, décrit précédemment (parties 6. 1. 1- 6. 1. 3), est un auto transporteur récemment identifié chez Ab [107,115]. Il confère à Ab des propriétés d'adhésion aux cellules eucaryotes et aux surfaces abiotiques par la fixation à différents types de collagène et par la formation de biofilm. Ata est présent chez la majorité des isolats cliniques et son importance *in vivo* a été démontrée [107].

Ab possède également les gènes codants les systèmes à deux partenaires de type CDI (Contact-Dependent growth Inhibition), qui sont des systèmes d'inhibition de la croissance contact dépendant. Ces systèmes entraînent l'inhibition de la croissance des bactéries adjacentes, suite à la sécrétion de toxines. La présence de la protéine d'immunité, chez la cellule cible, empêche sa mort en neutralisant ces toxines. Le système CDI a d'abord été mis en évidence chez *A. nosocomialis*, puis chez une souche de laboratoire et une souche clinique d'Ab par analyses bio-informatiques. Par différentes combinaisons de mutations, les couples effecteurs-protéines d'immunité et leur rôle dans l'inhibition de la croissance des bactéries cibles ont été confirmés chez Ab [181]. La compétition bactérienne *via* les CDI pourrait favoriser la colonisation de l'hôte en permettant l'élimination des cellules compétitrices. Depuis la découverte du rôle joué par les systèmes CDI dans l'inhibition de la croissance, d'autres fonctions portées par ces systèmes ont été identifiées. Chez Ab, c'est le cas de AbFhaB qui est impliqué dans des processus d'adhésion aux cellules eucaryotes [186,187]. En effet, le système AbFhaB/FhaC n'a pas été identifié en tant que système CDI mais des analyses bioinformatiques réalisées au laboratoire l'ont confirmé. AbFhaB/FhaC permet l'adhésion à la fibronectine et joue un rôle dans la virulence d'Ab *in vivo*. En effet, le mutant $\Delta fhaC$ présente une virulence atténuée lors de l'infection de *C. elegans* et de souris [187].

8. 5. Le SST6

8. 5. 1. Généralités

Le SST6, décrit à partir de 2006, est répandu chez les bactéries à Gram négatif et, plus particulièrement, chez les Protéobactéries dont fait partie Ab et de nombreux pathogènes

pour l'Homme [179,188,189]. Un ensemble contenant au minimum treize gènes conservés et spécifiques au SST6 est nécessaire à la formation d'un système fonctionnel. Aux gènes essentiels à l'assemblage du système, s'ajoutent des gènes accessoires pouvant être classés parmi trois catégories suivant leur rôle : 1) les gènes permettant un fonctionnement efficace du système ; 2) les gènes permettant une régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle ; 3) les gènes codant les effecteurs et les protéines d'immunité [190].

Le SST6 se décompose en deux parties : une partie permettant l'ancrage à la membrane interne bactérienne et une partie constituant le tube contractile. Le SST6, par sa structure et son fonctionnement, s'apparente à un bactériophage et est souvent décrit comme un bactériophage inversé [179,188] (Figure 11).

Le complexe membranaire du SST6 est constitué des sous-unités TssL, TssM et TssJ. TssM fait le lien entre les sous-unités TssL et TssJ, qui localisent respectivement à la membrane interne et externe de la bactérie (Figure 11). TssE et VgrG forment la base du système permettant la polymérisation correcte de Hcp, composante majeure de la structure tubulaire. Les protéines TssB et TssC, elles, interagissent entre elles et forment une gaine autour de la structure tubulaire afin de la stabiliser. Suite à la détection d'un signal extracellulaire, il s'opère un changement conformationnel des composants de la gaine du tube entraînant sa contraction et l'injection des effecteurs au sein d'une cellule cible. Le SST6 est un système dynamique qui s'assemble et se désassemble rapidement [189]. L'étape de désassemblage du tube, dépendante de l'ATPase ClpV, permet un recyclage des composants du système et la formation de nouveaux SST6 (Figure 11) [179,188,189]. Un seul évènement de contraction permet de traverser la membrane de la cellule cible et l'injection de plusieurs effecteurs.

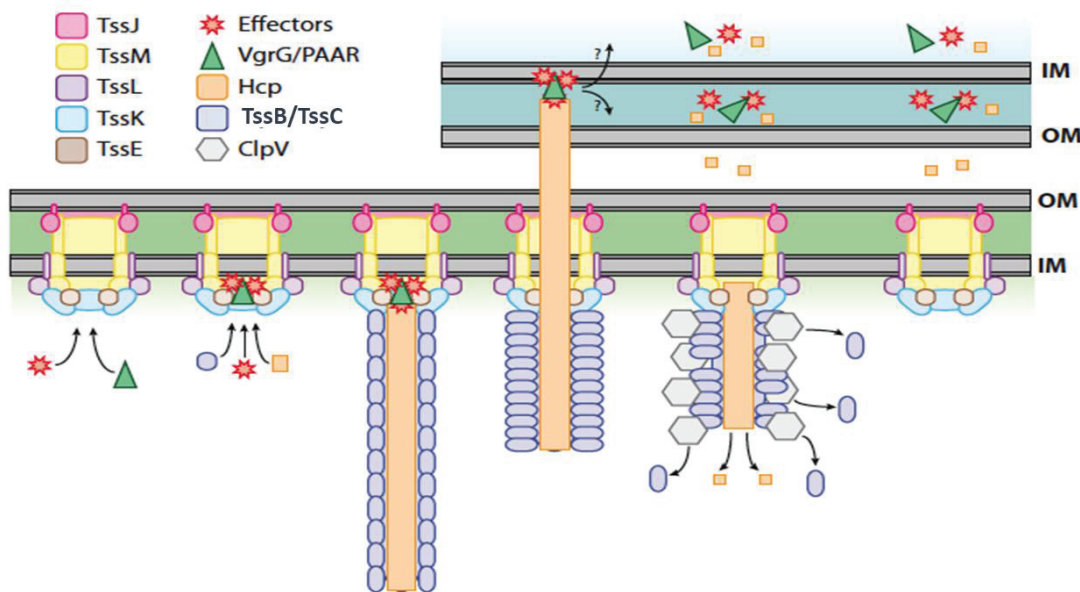


Figure 11. Modèle illustrant les différentes étapes d'assemblage, de translocation d'effecteurs vers la cellule cible et de recyclage des composants du SST6.

A) Les protéines TssE, TssJ, TssK, TssL et TssM, composantes majeures du SST6, sont ancrées à la membrane et forment le socle du SST6. B) VgrG, PAAR et les effecteurs sont recrutés à la base du SST6. VgrG forme un trimère au niveau de la base. L'interaction entre VgrG et PAAR ou les effecteurs contribue à la stabilité de la structure. C) Hcp polymérise et forme un tube autour duquel polymérise TssB/C et forme une gaine qui consolide la structure. D) Un changement de structure de la gaine conduit à la contraction de celle-ci et permet le passage du tube constitué d'Hcp à travers les membranes cellulaires jusqu'à la cellule cible. E) ClpV utilise de l'ATP pour désassembler le fourreau. Les éléments constituant la machinerie du SST6 sont relargués dans le cytosol et peuvent être recyclés pour reformer le tube. F) La base du SST6 est prête à être réutilisée ou recyclée selon l'état d'activation du SST6. Modèle issu de la revue de Ho *et al.* [189].

Les effecteurs du SST6 sont souvent retrouvés en amont des gènes codant les protéines Hcp ou VgrG [189,191]. L'effecteur est fusionné ou interagit directement avec VgrG, permettant ainsi sa sécrétion à travers le SST6. De même, PAAR, un composant formant une structure conique interagissant avec VgrG, peut également servir d'adaptateur entre VgrG et les effecteurs ; ce qui permet leur sécrétion [189,191].

Le SST6 est principalement décrit pour son implication dans la compétition bactérienne et permet aux bactéries de protéger leurs ressources nutritives, notamment en éliminant les bactéries alentours (Figure 12). Chaque bactérie possède un panel d'effecteurs ayant chacun différentes cibles possibles. Ces effecteurs peuvent être classés selon en trois grandes catégories, selon qu'ils visent : 1) la paroi bactérienne ; 2) la membrane interne ou 3) les acides nucléiques [191,192]. Les premiers effecteurs identifiés, Tse1-3 chez *P.*

aeruginosa, hydrolysent le peptidoglycane et permettent de détruire la paroi bactérienne ; induisant la mort de la bactérie cible. Depuis, d'autres effecteurs ciblant le peptidoglycane ont été identifiés et sont classés en 2 familles selon leur activité enzymatique : Tae (Type VI secretion Amidase Effectors) et Tge (Type VI secretion Glycoside hydrolase Effectors). Il existe également des effecteurs ciblant la membrane interne. Ces effecteurs sont des lipases et sont regroupés dans la famille Tle (Type VI Lipase Effector). Ces lipases sont sécrétées *via* le SST6 au niveau du périplasma et hydrolysent la paroi interne [191]. Enfin, la dernière catégorie contient des effecteurs ayant une activité nucléase leur permettant de cibler les acides nucléiques de la cellule cible.

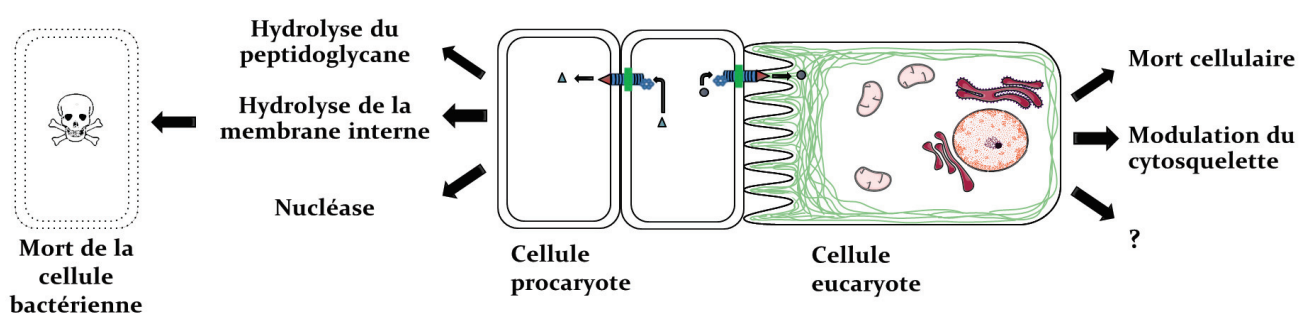


Figure 12. Fonctions du SST6.

Le SST6 se présente comme une seringue qui permet l'injection d'effecteurs dans la cellule cible. Cette cible peut être procaryote ou eucaryote. L'injection de l'effeteur va souvent conduire à la mort de la cellule cible ou à la modulation des fonctions des cellules eucaryotes (?) comme par exemple du cytosquelette d'actine. Figure inspirée de différents travaux [179,189,193,194].

Les modifications permises par l'injection d'effecteurs par un pathogène *via* son SST6 chez les cellules eucaryotes peuvent favoriser son invasion (Figure 12). Lors de l'infection par *P. aeruginosa*, l'injection dépendante du SST6 de deux phospholipases D est nécessaire à l'invasion des cellules non phagocytaires [194]. Pour *Aeromonas hydrophila* l'injection de l'effeteur VgrG1, *via* son SST6, conduit à une destruction du cytosquelette de la cellule cible et à sa mort [191,193].

8. 5. 2. Le SST6 chez Ab

Au début de ma thèse, peu de données étaient disponibles concernant l'activité ou l'implication du SST6 en contexte d'infection chez Ab. Weber *et al.* ont identifié, par bio-informatique, la présence des gènes nécessaires à la constitution du SST6 chez de

nombreuses espèces d'Ab [195]. La protéine Hcp (Hemolysin co-regulated protein), témoin de la présence d'un SST6 actif, est présente dans le surnageant de culture d'Ab sauvage alors qu'elle est absente chez la souche $\Delta tssM$ [195]. Ab possède donc un SST6 fonctionnel dans les conditions de culture de laboratoire. En effet, la protéine TssM a été identifiée chez d'autres bactéries à Gram négatif comme un composant essentiel à la formation du SST6. Cependant, le SST6 de la souche de laboratoire 17978 n'était ni impliqué ni dans la compétition bactérienne, ni dans la virulence d'Ab dans des modèles d'infection *in vivo* [195]. La même année, une autre étude portant sur le SST6 de la souche M2 a été publiée. La souche M2, aujourd'hui membre de l'espèce *A. nosocomialis*, sécrète Hcp dépendamment du SST6. Le SST6 de la souche M2 est impliqué dans la compétition bactérienne puisqu'il est requis pour éliminer *E. coli* [196]. Pour conclure, avant le début de notre étude, le rôle du SST6 chez Ab restait inconnu, en particulier dans un contexte d'infection par des souches cliniques. Pour cela, le premier objectif de ma thèse a été de caractériser le SST6 chez Ab.

Objectifs de la thèse

Ab est un pathogène préoccupant par l'augmentation du nombre infections dont il est à l'origine et par sa grande capacité à résister à la désinfection et la dessiccation. De plus, l'émergence de souches MDR et XDR, font de lui un véritable problème de santé publique. Peu d'éléments sont connus sur son interaction avec son hôte.

La majorité des études est faite sur des souches cliniques anciennes. Les souches de référence de laboratoire d'Ab, 17978 ou 19606, ont été isolées dans les années 1950. Or, Ab est un pathogène qui évolue rapidement grâce notamment à son importante capacité à acquérir des gènes par transfert horizontale [81,82]. Les souches de référence de laboratoire ne possèdent pas de phénotype MDR et ne sont pas aussi virulentes que les souches isolées aujourd'hui, lors de l'infection de patients [79,80,85,90,197].

Nous avons donc décidé d'étudier des souches cliniques d'Ab isolées plus récemment. La souche 17978 servant de souche de référence, permettra de comparer nos résultats à la littérature. Nous avons également décidé d'ajouter à nos expériences, la souche environnementale DSM30011, représentative des souches de la période pré-antibiotique.

L'étude conjointe de souche de référence, de souche environnementale et de souches cliniques hypervirulentes a pour but d'identifier un ou plusieurs mécanismes qui permettent de comprendre la virulence accrue de ces dernières.

Ainsi au cours de ces travaux de thèse, nous avons eu pour objectifs de définir :

- 1) L'implication du SST6 dans la virulence d'Ab. Le SST6 intervient dans la compétition bactérienne et dans l'interaction avec les cellules hôtes chez d'autres pathogènes, nous avons donc voulu savoir si celui d'Ab jouait un rôle dans sa virulence.
- 2) L'interaction d'Ab avec les cellules hôtes en cherchant à identifier des mécanismes permettant d'expliquer l'hypervirulence des souches étudiées par rapport à la souche de référence de laboratoire et à la souche environnementale.

Ces travaux seront détaillés dans les deux premiers chapitres ; le premier contient l'article publié dans lequel je suis co-premier auteur [198] et le deuxième comprend l'ensemble de mes résultats non publiés qui seront prochainement regroupés afin d'être soumis sous forme de manuscrit dans lequel je serai premier auteur (Gagné *et al.* en préparation). Le troisième chapitre inclus un article tentant d'identifier un réservoir environnemental d'Ab auquel j'ai contribué [199]. Enfin, en annexe (Annexe 1) vous pourrez retrouver un autre papier auquel j'ai participé portant sur la modulation de la RI par le pathogène *P. aeruginosa* [200]. Un résumé a été inclus pour tous les chapitres et la publication en annexe.

II. Résultats

Chapitre 1

Differential Role of the T6SS in *Acinetobacter baumannii* Virulence.

Repizo GD*, Gagné S*, Foucault-Grunenwald ML, Borges V, Charpentier X, Limansky AS, Gomes JP, Viale AM, Salcedo SP

* Co-premier auteur

PLoS One. 2015 ;10(9) : e0138265.

Le SST6 est connu comme un facteur de virulence majeur chez de nombreux pathogènes comme chez *P. aeruginosa* ou *V. cholerae*. Au début de ma thèse, l'étude du SST6 chez Ab n'en était qu'à ses débuts et sa fonction semblait dépendre de la souche étudiée. Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à la fonction du SST6 chez différentes souches d'Ab.

Le SST6 de la souche modèle de laboratoire 17978, une souche clinique isolée en 1950 lors de l'infection fatale d'un enfant atteint d'une méningite, est fonctionnel mais n'intervient pas dans la compétition bactérienne [201]. Cependant la souche 17978 n'a pas un phénotype MDR et a été isolée avant l'utilisation intensive des antibiotiques. L'évolution importante dont est victime Ab suggère que cette souche n'est plus représentative des souches cliniques isolées aujourd'hui chez les patients.

Nous avons également utilisé la souche DSM30011 d'Ab isolée en 1944 lors du processus de dégradation du guayule permettant la séparation du caoutchouc et de la résine, employé lors de la production industrielles du latex [202]. Elle possède une résistance aux antibiotiques comparable à celle de la souche 17978 mais elle est aussi virulente que des souches cliniques d'Ab lors de l'infection [4].

Enfin nous nous sommes intéressés aux souches cliniques MDR 242, 244 et 825, toutes trois isolées au sein du même hôpital à Rosario en Argentine. Elles ont une Séquence de Type 104 (ST104) et appartiennent à l'IC104, peu fréquent. Ces isolats cliniques, proches génétiquement, diffèrent essentiellement par la présence ou l'absence de la protéine

CarO. Cette OMP forme un canal impliqué dans le transport de l'acide aminé ornithine et dans la résistance à l'imipénème [203,204]. Chez la souche 244, sensible à l'imipénème, CarO est présente au niveau de la membrane externe, alors qu'elle est absente ou modifiée chez les souches résistantes 242 et 825. En effet, la souche 242 possède une forme allélique variable du gène *carO* alors que la souche 825 possède une insertion au niveau du gène l'inactivant [203,205]. L'absence ou la modification de CarO ainsi que la présence chez ces deux souches de plasmides codant des gènes de résistance aux antibiotiques conduisent à leur résistance à l'imipénème.

Le premier objectif de ma thèse a été de comparer la fonction et le rôle du SST6 chez les souches Ab de référence, environnementale et cliniques MDR. Nous avons montré que toutes les souches étudiées possèdent les gènes correspondants aux composants structuraux permettant la formation du SST6. Dans les conditions expérimentales utilisées, la souche 17978 a une faible capacité à tuer *E. coli* tandis que la souche DSM30011 élimine efficacement *E. coli*. De manière surprenante les souches cliniques 242, 244 et 825 sont incapables de tuer *E. coli* bien que ces souches transcrivent les gènes *hcp* et *tssM*, indispensables au SST6. Pour s'assurer de la fonctionnalité du SST6, la sécrétion de Hcp dans le surnageant des souches d'Ab étudiées a été contrôlée par gel SDS-Page et par Western Blot. La sécrétion de la protéine Hcp dans le surnageant des cultures bactériennes est caractéristique de la fonctionnalité du SST6 [206–208]. Comme attendu, les souches 17978 et DSM30011 sécrètent Hcp. Bien que Hcp soit présente dans les extraits totaux de l'ensemble des souches, elle n'est pas retrouvée dans les surnageants des souches cliniques 242, 244 et 825. L'incapacité des souches cliniques MDR à éliminer *E. coli* est due à l'absence d'un SST6 fonctionnel ou actif.

Pour confirmer que le SST6 est responsable de l'élimination d'*E. coli*, nous avons construit les souches 17978 et DSM30011 mutantes pour la protéine TssM et leurs souches complémentées. Dans les modèles proposés chez d'autres bactéries, TssM est associée à d'autres composants du SST6 (TssL et TssJ) formant un complexe inséré au niveau de la membrane interne (Figure 10 de la Partie I. Introduction). Ce complexe permet l'ancrage des autres composants du SST6 [188,209]. Ainsi l'absence de TssM rend impossible la formation du SST6. La construction des mutants chez les souches 242, 244 et 825 n'a pas pu être réalisé avec les outils en notre possession en raison du phénotype MDR des

souches. Les mutants $\Delta tssM$ des souches 17978 et DSM30011 ne sécrètent pas Hcp reflétant l'inactivité du SST6. Aucune différence dans l'élimination d'*E. coli* par les souche 17978 et son mutant n'a été observée. Ce résultat est en adéquation avec ce que Weber *et al.* ont décrit [195]. Néanmoins l'inhibition de croissance d'*E. coli* nécessite le contact avec la souche 17978 ou la souche 17978 $\Delta tssM$. La souche Ab 17978 semble utiliser un autre système que le SST6 pour éliminer *E. coli*.

En revanche *E. coli* est éliminée par la souche DSM30011 grâce à son SST6. Le mutant DSM30011 $\Delta tssM$ est incapable de tuer *E. coli* et sa complémentation restaure son phénotype sauvage. La souche DSM30011 est capable de tuer d'autres souches d'Ab à l'aide de son SST6 mais aussi *P. aeruginosa* ou *K. pneumoniae*, des pathogènes souvent retrouvés en contexte de co-infection avec Ab [210,211].

Le SST6 a été impliqué dans la formation de biofilm chez d'autres pathogènes [212–214]. La souche DSM30011 forme des agrégats et une fine pellicule à la surface des tubes de culture. De plus, la souche DSM30011 est adhérente au polystyrène et forme les plus importants biofilms de toutes les souches testées. C'est pourquoi, le rôle du SST6 dans la formation de biofilm a été évalué. La comparaison des biofilms formés par la souche DSM30011, son mutant et sa souche complémentée indique que le SST6 n'est pas impliqué dans la formation de biofilms en conditions statique.

Le SST6 pourrait aussi représenter un avantage pour la colonisation de l'hôte. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué une infection systémique mixte des souches DSM30011 et de son mutant chez des souris. Après 18h d'infection, la souche mutante présente un défaut de colonisation des souris par rapport à la souche DSM30011 sauvage, suggérant l'implication du SST6 *in vivo*. Cependant il n'a pas été possible de compléter le mutant et de confirmer que ce défaut était effectivement dû au SST6. Néanmoins, nous avons montré son implication *in vivo* lors de l'infection de *Galleria mellonella*, un modèle non mammifère largement utilisé et décrit dans la littérature comme un modèle d'étude pour Ab [215,216]. *G. mellonella* vit à 37°C ce qui permet d'observer une toxicité à une température comparable à celle du corps humain.

En conclusion, lors de cette étude nous avons montré qu'Ab possède un SST6, cependant celui-ci n'est pas fonctionnel ou actif chez toutes les souches. Les souches cliniques MDR 242, 244 et 825 transcrivent les éléments constitutifs du SST6 mais elles ne semblent pas posséder un SST6 fonctionnel dans les conditions testées. En revanche le SST6 de la souche DSM30011 est nécessaire à la compétition bactérienne et à la virulence de la souche.

J'ai contribué à ce projet en qualité de co-premier auteur *via* la réalisation de différentes expériences et en participant à l'analyse des résultats sous la supervision de Guillermo Repizo, post-doctorant dans le laboratoire. Au cours de ces travaux j'ai réalisé les gels SDS page et les Western blot permettant la visualisation d'Hcp dans les surnageants et extraits totaux des bactéries. J'ai également effectué les expériences de compétition bactérienne et les infections des *G. mellonella* ainsi que la microscopie confocale sur les biofilms.

Le SST6 est inactif chez les souches cliniques 242, 244 et 825 dans les conditions testées et suggère donc une régulation différente de celle des souches 17978 et DSM30011. Cette hypothèse n'est pas incompatible avec la possibilité que ce système soit impliqué dans la virulence des souches cliniques. Lors de la soumission de notre premier papier, l'équipe de M. Feldman a élucidé le mécanisme de régulation du SST6 chez certaines souches cliniques qui repose sur un système de régulateurs transcriptionnels plasmidiques (voir Partie III. Conclusions et Discussion) [217].

RESEARCH ARTICLE

Differential Role of the T6SS in *Acinetobacter baumannii* Virulence

Guillermo D. Repizo¹*, Stéphanie Gagné¹*, Marie-Laure Foucault-Grunenwald², Vitor Borges³, Xavier Charpentier², Adriana S. Limansky⁴, João Paulo Gomes³, Alejandro M. Viale⁴, Suzana P. Salcedo¹*

1 Bases Moléculaires et Structurales des Systèmes Infectieux, CNRS UMR 5086, Université Lyon 1, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Lyon, France, **2** Unité de Microbiologie, Adaptation et Pathogénie, CNRS UMR 5240, Université Lyon 1, Villeurbanne, France, **3** Bioinformatics Unit, Department of Infectious Diseases, National Institute of Health, Lisbon, Portugal, **4** Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR, CONICET), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina

* These authors contributed equally to this work.

* suzana.salcedo@ibcp.fr



OPEN ACCESS

Citation: Repizo GD, Gagné S, Foucault-Grunenwald M-L, Borges V, Charpentier X, Limansky AS, et al. (2015) Differential Role of the T6SS in *Acinetobacter baumannii* Virulence. PLoS ONE 10(9): e0138265. doi:10.1371/journal.pone.0138265

Editor: Erh-Min Lai, Academia Sinica, TAIWAN

Received: June 2, 2015

Accepted: August 27, 2015

Published: September 24, 2015

Copyright: © 2015 Repizo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The genome sequences of the strains are available from GenBank by Accession Numbers KT334324, KT334325, KT334326, KT334327, and KT334328.

Funding: This work was supported by a FINOVI Young Researcher Grant. SS is supported by an INSERM researcher contract and SG by Région Rhône-Alpes ARC1 Santé fellowship. XC and MLG are supported by grants from the CNRS-Inserm ATIP-Avenir program and Sanofi (awarded to XC). AV is a Staff Member of CONICET, Argentina, and AL a Staff Member of the Universidad Nacional de Rosario, Argentina. Both researchers are supported by grants from ANPCyT, CONICET, and Secretaría

Abstract

Gram-negative bacteria, such as *Acinetobacter baumannii*, are an increasing burden in hospitals worldwide with an alarming spread of multi-drug resistant (MDR) strains. Herein, we compared a type strain (ATCC17978), a non-clinical isolate (DSM30011) and MDR strains of *A. baumannii* implicated in hospital outbreaks (Ab242, Ab244 and Ab825), revealing distinct patterns of type VI secretion system (T6SS) functionality. The T6SS genomic locus is present and was actively transcribed in all of the above strains. However, only the *A. baumannii* DSM30011 strain was capable of killing *Escherichia coli* in a T6SS-dependent manner, unlike the clinical isolates, which failed to display an active T6SS *in vitro*. In addition, DSM30011 was able to outcompete ATCC17978 as well as *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*, bacterial pathogens relevant in mixed nosocomial infections. Finally, we found that the T6SS of DSM30011 is required for host colonization of the model organism *Galleria mellonella* suggesting that this system could play an important role in *A. baumannii* virulence in a strain-specific manner.

Introduction

The *Acinetobacter* genus comprises a heterogeneous group of strictly aerobic Gram-negative bacterial organisms endowed with large metabolic versatility and including pathogenic and non-pathogenic environmental species. *Acinetobacter baumannii* is frequently associated with disease in the context of hospital-acquired infections, implicated in severe ventilator-associated pneumonia, bacteraemia and surgical site or wound infections [1]. Infections due to multi-drug resistant (MDR) *A. baumannii* strains, in particular carbapenem-resistant, are an increasing burden on health care facilities. *A. baumannii* shows a remarkable ability to acquire genetic elements [2] and is inherently resistant to disinfection and desiccation [3]. Biofilm formation

de Ciencia, Tecnología e Innovación, Provincia de Santa Fe, Argentina. 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.

enables its persistence on abiotic surfaces such as medical equipment, a true impediment to its eradication in the clinical setting [4]. Numerous factors have been implicated in formation of biofilm in *A. baumannii* and adherence to abiotic surfaces, namely the CsuA/BABCDE chaperone-usher pili assembly system [5]. The O-glycosylation system has also been implicated in early stages of biofilm formation as well as virulence in model organisms commonly used to assess virulence of *A. baumannii* strains, such as the larvae from the insect *Galleria mellonella* and a mouse model of peritoneal sepsis [6,7]. Additional factors have been associated with biofilm formation such as the outer membrane protein A [8], which also plays a role in adherence to host cells during infection [8]. The ability of *A. baumannii* to adhere to biotic surfaces such as lung epithelial cells also constitutes an essential aspect of its virulence [9].

Recently, several groups have shown the presence of functional T6SS in different *Acinetobacter* species [10–12]. The T6SS, known to inject protein effectors across both prokaryotic and eukaryotic target cell membranes [13], provides a colonization advantage in the environment or during infection for many pathogens. More recently, T6SS-mediated killing has also been shown to lead to DNA release and enhanced horizontal gene transfer events which may contribute to spread of antibiotic resistance [14]. The T6SS consists of a contractile bacteriophage sheath-like structure, an assembly of different proteins forming a needle or spike structure used to penetrate the target cell. In the T4 bacteriophage this structure encompasses the gene products gp5 and gp27, which associate into a huge complex in which the distinctive needle-like shape is provided by the C-terminal domain of gp5 [13]. In bacterial T6SSs the equivalent proteins are fused into a large protein known as VgrG, in which the gp27 and gp5 folds are represented by the N-terminal and C-terminal domains, respectively [13]. The dynamic activity of the T6SS leads to the secretion of proteins that comprise the spike/tube complex, VgrG and Hcp, with the concomitant disruption of the envelope of the target cell with potentially lethal effects. Some VgrG proteins, designated as evolved VgrGs, also display a number of C-terminal domains that may act as effectors or bind specific effector proteins adding more diversity to the T6SS roles in cell-cell interactions [12,13,15].

The role of T6SS in *Acinetobacter* is still unclear: while the T6SS of the pathogenic species *A. nosocomialis* M2 and the environmental strain *A. baylyi* were shown to mediate killing of *Escherichia coli* laboratory strains [11,12] in the case of *A. baumannii* ATCC17978 this system was neither implicated in bacterial competition nor virulence [10]. Recent comparative analysis of the genomes of phylogenetically- and epidemiologically-related MDR *A. baumannii* clinical strains indicated the complete loss of the T6SS genomic locus in isolates of a particular clade [16,17]. This additionally suggests that this system is not absolutely necessary in the conditions prevailing in the clinical setting.

In this study we carried out a comparative analysis of *A. baumannii* strains ATCC17978 and DSM30011 as well as MDR clonally-related strains implicated in outbreaks in hospitals in Argentina [18]. We found significant differences between these strains regarding T6SS functionality. Interestingly, although apparently endowed with all necessary gene components in their genomes, it does not seem that the MDR clinical strains tested have a fully active T6SS. In contrast to the ATCC17978 and clinical strains, the T6SS of DSM30011 mediated killing of *E. coli*, other *A. baumannii* and several pathogens often associated with nosocomial infections and was found critical for virulence *in vivo* in the *Galleria mellonella* model organism.

Materials and Methods

Bacterial cultures

Bacteria were routinely cultured in liquid Tryptic Soy Broth (TSB) or Tryptic Soy Agar (TSA). Antibiotics, when appropriate, were added to *Acinetobacter* culture media at the following

concentrations: apramycin 30 µg/ml, gentamicin 50 µg/ml, kanamycin 50 µg/ml, and tetracycline 10 µg/ml. For *E. coli* cultures antibiotics were added at the following concentrations: ampicillin 100 µg/ml, apramycin 50 µg/ml, nalidixic acid 20 µg/ml, and kanamycin 20 µg/ml. Bacterial strains used are summarized in [S1 Table](#).

Biofilm assays

Adherence assays were performed in 24-well polystyrene microtitre plates, as previously described [19]. Bacteria were grown in BM2 minimal medium [20] supplemented with 10 mM potassium glutamate (BM2G) as the carbon source. Cultures performed in quadruplicates were inoculated at an initial Abs₆₀₀ of 0.1 from an overnight culture grown in TSB, and subsequently incubated under static conditions for 24 h at 37°C. One of the wells for each strain was thoroughly resuspended and used to measure Abs₆₀₀. Attached bacteria to the plastic surface on the three remaining wells were stained with 1% Crystal Violet for a period of 15 min and rinsed twice with water. The dye attached to the bacteria was solubilized in 400 µl 70% ethanol, to which 600 µl of water were added and Abs₅₈₀ was measured to quantify the levels of Crystal Violet. The Abs₅₈₀/Abs₆₀₀ ratio was used to normalize the amount of biofilm formed to the total cell content of each sample tested, to account for biofilm variations due to differences in bacterial growth. All assays were done in triplicates using fresh samples each time.

For biofilm imaging, overnight cultures of *A. baumannii* strains were re-inoculated into glass-bottom 24-well plates containing BM2G medium. The plates were incubated at 37°C for 24 h under static conditions and then labelled with anti-*A. baumannii* antiserum or DAPI. Images were taken with a confocal Zeiss 710 microscope (z-stacks) and analysed with ImageJ.

RNA isolation and RT-PCR

For total RNA isolation, *A. baumannii* strains were grown overnight in 2 mL of TSB medium and then sub-cultured (1/100 dilution) up to Abs₆₀₀~1. The cells were then harvested by centrifugation at 4°C and total RNA was extracted with the RNeasy Mini kit. Subsequently, the QuantiTect Reverse Transcription kit was used to remove DNA from the samples, and synthesize the corresponding cDNAs from 1 µg of total RNA. HcpF/HcpR and TssMF/TssMR primers sets ([S2 Table](#)) were used to detect transcripts corresponding to *hcp* and *tssM* genes, respectively. The RNA not subjected to RT was also run in PCR (negative control) to ensure that PCR positive reactions were due to the presence of transcripts and not to contaminating DNA. The *rpoB* transcripts were used as endogenous control ([S2 Table](#)).

Construction of mutant and complemented strains

All plasmids and primers used in this study are listed in [S1](#) and [S2](#) Tables. Two DNA fragments encompassing each 500 bp flanking the *A. baumannii* ATCC17978 *tssM* gene were PCR-amplified using primers 17UpF and 17UpR (upstream region) and 17DoF and 17DoR (downstream region), which were designed after the sequences of *tssM* and neighboring regions of this strain available on databases (A1S_1302 and A1S_1303). These segments were cloned into a SmaI pre-digested pEX100T/Kan plasmid using the In-Fusion commercial kit (Clontech) and following manufacturer indications. The resulting plasmid, pEX-TssM17 was electroporated into *A. baumannii* ATCC17978 and unmarked *tssM* deletion mutants were obtained following the protocol described by Hoang & Schweizer [21]. Deletion of the *tssM* gene was verified by PCR using primers 17ChUp and 17ChDo.

For the construction of a *tssM* (DSM30011_11660) deletion mutant of *A. baumannii* DSM30011, fragments of 2 kb flanking this gene were amplified using the primers DSMUpF and DSMUpR for the upstream region, and DSMDoF and DSMDoR for the downstream

region. Subsequently, the amplimers were digested with EcoRV (restriction sites are carried in the sequence of DSMUpR and DSMDof), blunt-ligated through this site and cloned into pGEM[®]-T Easy using A-overhangs remaining at the other side of each amplimer, originating pGEM-2.1. In parallel, an apramycin resistance cassette was amplified from *E. coli* MFDpir chromosomal DNA (accession number X01385) using primers ApraF and ApraR. The PCR product was digested with EcoRV and ligated to pGEM-2.1 plasmid, producing pGEM-2.2, which carries the flanking regions of DSM30011 *tssM* gene interrupted by an apramycin resistance cassette. The whole construct was next excised from pGEM-2.2 by restriction with SmaI and directly electroporated into DSM30011 competent cells followed by selection on apramycin-containing TSA plates. Proper replacement of the *tssM* gene with the apramycin resistance cassette was confirmed by PCR using primers DSMChUp and DSMChDo. For the construction of a *tssM*-expressing plasmid for complementation purposes, the *tssM* gene from *A. baumannii* DSM30011 was amplified using primers CTssMF2 and CTssMR2. The PCR product was cloned into the BamHI site of pX5K, so that the *tssM* is placed under control of the *Ptac* promoter. The pTssM resulting plasmid was introduced by electroporation into the DSM30011 $\Delta tssM$ strain for complementation studies. All constructions were verified by sequencing at the GATC-Biotech service.

Hcp Secretion analysis

A. baumannii strains were inoculated into 50 ml of TSB or L-broth at an Abs₆₀₀ of 0.08 and incubated at 37°C until Abs₆₀₀~1.0 or prepared as described for the competition assays (see below). Supernatants were obtained by centrifugation of cultures at 4,000 x g followed by filtration (0.22 μ m) and a 50-fold concentration using an Amicon Ultracel 3K centrifuge filters. Concentrated cell supernatants and whole cell lysates were resuspended in 40 mM Tris pH 8, 200 mM NaCl, 5% glycerol and analyzed by 18% SDS-PAGE. The identity of excised 19 KDa bands assigned to Hcp from the SDS-PAGE analysis of supernatants or total cell extracts was done by LC-MSMS at the Protein Science Facility, SFR Biosciences Lyon. When needed, the resolved proteins were detected with an anti-Hcp antibody against *Pseudomonas aeruginosa* Hcp [22] at a dilution of 1/ 500, provided by A. Filloux (Imperial College London, UK) or anti-EF-Tu at 1/1000, given by R. Voulhoux (CNRS UMR7255 and Aix-Marseille University, Marseille, France).

Bacterial competition assays

Experiments were done essentially as described previously [11]. Briefly, the different *A. baumannii* and *E. coli* strains were grown overnight in 2 mL of L-broth (10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract and 0.5 g/l NaCl) medium and then sub-cultured in the same medium (1/100 dilution) up to Abs₆₀₀~1. Cultures were then diluted in L-broth to Abs₆₀₀ of 0.4 and the different bacterial strains were mixed in 1:1 or 10:1 ratios (predator:prey), as indicated. Aliquots of 20 μ l of these mixtures were laid on the surface of L-medium supplemented with 1.5% Agar and incubated at 37°C for 4 h. The bacterial spot on the agar surface was subsequently removed, vigorously resuspended in PBS, serially diluted and plated onto solid selective media. For *E. coli* DH5 α , selective medium contained 20 μ g/ml nalidixic acid or 50 μ g/ml apramycin for strains transformed with pGEM-2.2. For *Acinetobacter* strains, the selective media employed are indicated in the figure legends. A mini-Tn7 [23] was used to incorporate a cassette conferring gentamicin resistance into the chromosome of the DSM30011 strain whereas the mini-CTX1 harbouring a tetracycline resistance cassette [21] was used to confer tetracycline resistance to the ATCC17978 strain. For selection of *P. aeruginosa* strains PAK (a gift from A. Filloux, Imperial College London), PA14 and PA7 (given by Romé Voulhoux, CNRS UMR7255 and Aix-

Marseille University, France) selective *Pseudomonas* PIA media was used. For *Klebsiella pneumoniae* strain 52145 (kindly provided by J. Bengoechea, Queen's University, Belfast, UK) media with rifampicin at 25 µg/ml was used. All strains grew to similar population densities regardless of co-incubation with *E. coli*; starting inocula were always verified by CFU counts (data not shown). In order to test the dependence of killing on contact, assays were also performed by interposing a 0.22 µm pore-membrane in between *A. baumannii* strain 17978 laying on the solid medium and *E. coli* DH5α on the top of the filter. After incubation, the membrane was lifted from the plate and treated as described above.

For all bacterial competition experiments one representative image is shown and CFU counts included for a minimum of 3 independent assays to enable accurate assessment of experimental variation.

Galleria mellonella infection assays

G. mellonella larvae were purchased from Sud Est Appats (<http://www.sudestappats.fr/>) and were used the day after arrival. Groups of twenty randomly picked larvae were used for each assay condition. The different *A. baumannii* strains tested were grown overnight in TSB and then diluted with PBS to obtain the CFU/ml titers (as indicated in the corresponding figure legends), which were verified by colony counts on TSA for all inocula. A Hamilton microliter syringe was used to inject 10 µl of the bacterial suspensions into the hemolymph of each larva via the second last left proleg. As a control, one group of *G. mellonella* was injected with 10 µl of PBS. After injection, the larvae were incubated in plastic plates at 37°C and the numbers of dead individuals were scored regularly. Survival curves were plotted using PRISM software, and comparisons in survival were calculated using the log-rank Mantel-Cox test and Gehan-Breslow-Wilcoxon test.

Competitive index

The DSM30011 strain and its $\Delta tssM$ mutant were separately grown overnight in 5 ml of TSB medium at 37°C with shaking. Bacterial cultures of parental (apramycin-sensitive) and mutant (apramycin-resistant) strains were subsequently diluted in PBS to 10^8 CFU/ml, mixed in equal volumes and 10^7 CFU in 100 µl aliquots were inoculated intraperitoneally into 6 week-old C57BL/6 female mice. Input ratios (apramycin-resistant versus apramycin-sensitive bacteria) were determined by plating ten-fold sequential dilutions on TSA. After 18 h post-inoculation spleens were aseptically removed, weighed and homogenized in 1 ml of PBS. Several dilutions were plated on TSA with or without apramycin to determine the output ratios. The competitive index (CI) corresponds to the ratio between the output of $\Delta tssM$ mutant and the wild-type DSM30011 strain divided by the ratio between the input of the mutant and the wild-type strain. Animals were purchased from Charles River and housed in the PBES animal facility. The care and use of experimental animals complied with local animal welfare laws and guidelines. Euthanasia was carried out by cervical dislocation when necessary, if established early end-points were reached (loss of mobility and more than 20% weight loss) during the experiment with animals monitored every 4 h. The protocols were approved by the CECCAPP ethical committee (Comité d'Evaluation Commun au Centre Léon Bérard, à l'Animalerie transit de l'ENS, au PBES et au laboratoire P4).

Accession numbers

The GenBank accession numbers of the *tss* locus and the four putative *vgrG* genes of the Ab244 clinical strain are KR109191, KR155241, KR155242, KR155243 and KR155244, respectively. The corresponding DNA sequences of the Ab242 and Ab825 strains are identical to those of

Ab244. The GenBank accession numbers of the *tss* locus and the four putative *vgrG* genes of the DSM30011 strain are KT334324, KT334325, KT334326, KT334327, and KT334328, respectively (see S3 and S4 Tables for details). The DNA sequence of the DSM30011 genome is currently under deposit in GenBank. RAST annotation server and NCBI databases were used for homologues searches and conserved domain detection. Pfam homology searches were done at <http://pfam.xfam.org/search>

Statistical analysis

All statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 6.0 for Mac, GraphPad Software, La Jolla, California, USA. The *Galleria* survival statistical analysis was done using the log-rank Mantel-Cox test and the Gehan-Breslow-Wilcoxon test; for biofilm assays one-way ANOVA was carried out to compare all means. CI was analysed using a homoscedastic and 2-tailed Student's t-test, with the null hypothesis: mean index is not significantly different from 1.0. $P < 0.05$ were considered significant and coded as follows: **** for $P < 0.0001$, *** for $0.0001 < P < 0.001$, ** for $0.001 < P < 0.01$ and * for $0.01 < P < 0.05$.

Results

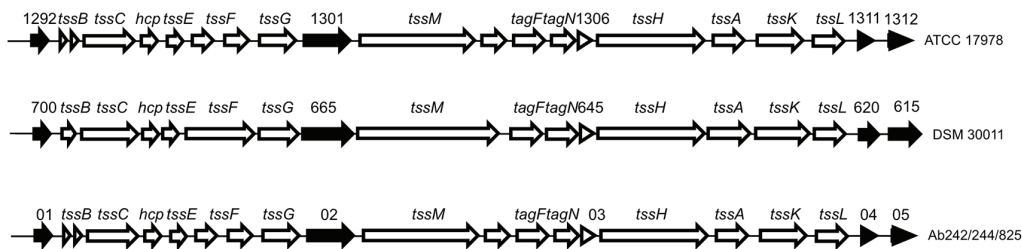
Identification of genes encoding a T6SS and associated components in the strains under study

In view of the importance of T6SS in bacterial competition and as a virulence factor in a number of opportunistic pathogens, we investigated its role in a panel of *A. baumannii* strains currently being studied in our laboratory: ATCC17978, an extensively used *A. baumannii* strain which was initially isolated from the cerebrospinal fluid of a hospitalized patient more than 60 years ago [24]; DSM30011, a poorly characterized environmental strain which was shown to be naturally competent and to efficiently kill *G. mellonella* larvae [25]; and Ab242, 244 and 825, three clonally-related MDR *A. baumannii* clinical strains implicated in outbreaks in hospitals of Argentina [18]. The main difference described for these three clinical strains is the presence of different alleles of the outer membrane protein CarO (including a disrupted allele for Ab825), which mediates the influx of carbapenem β -lactams and basic amino acids through the outer membrane [18,20,26].

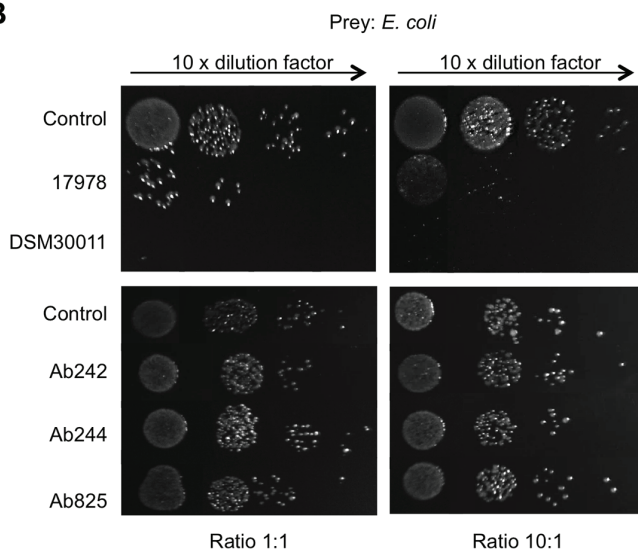
The genomes of the DSM30011 and the MDR strains were sequenced and analysed for T6SS genes. This search revealed the presence in the genome of each of these strains a single cluster of 18 T6SS genes similar to that previously described in other *Acinetobacter* species [10,11], from which four are specific to the genus (Fig 1A, black arrows, see also S3 Table). The DNA sequence of the *tss* loci of the Ab242/244/825 clinical strains were identical between them. Sequence comparison analyses indicated that the homologous polypeptides encoded by 17 out of the 18 genes of the *tss* clusters of DSM30011, ATCC17978, and the *A. baumannii* clinical strains shared an overall identity of $>97\%$ between them. The least homologous polypeptides encoded by DSM_11700/A1S_1292/Ab244_01 (Fig 1A) shared an identity of $\sim 81\%$ and all contained a predicted signal peptide at their N-terminal regions, but no homology could be revealed to protein domains described in databases (data not shown).

In addition to the *tss* clusters, 4 independent loci containing genes encoding putative VgrG proteins generally secreted via T6SS were found in each of the analysed *A. baumannii* strains (S1 Fig and S4 Table). All of these polypeptides are generally composed by N-terminal (N-t) and C-terminal (C-t) domains (S1A Fig) characteristic of VgrG proteins [12,13,15], followed in all cases by a conserved domain of unknown function (DUF) of ~ 150 amino acids length of the DUF2345/PF10106 family and, depending on each VgrG, of C-terminal stretches of variable

A



B



C

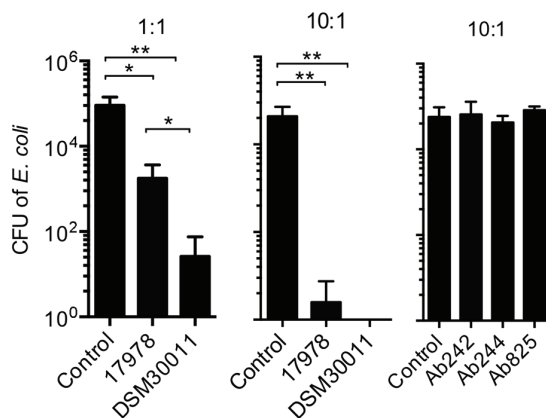


Fig 1. Ability of different *A. baumannii* strains to out-compete *E. coli*. A) Comparative analysis between the T6SS gene loci of *A. baumannii* ATCC17978, DSM30011 and clinical strains. Black arrows indicate genes specific to *Acinetobacter*. B) Survival of DH5α *E. coli* after incubation in growth medium (control) or with *A. baumannii* ATCC17978 or DSM30011 at the indicated *A. baumannii*: *E. coli* ratios (top panel). Bottom panel corresponds to survival of apramycin-resistant DH5α *E. coli* after incubation in growth medium (control) or with Ab242, Ab244 or Ab825 strains at the indicated ratios. Images correspond to one representative experiment from a minimum of three independent assays quantified in C) to visualize experimental variation, expressed as means ± SDM plotted in a logarithmic scale.

doi:10.1371/journal.pone.0138265.g001

amino acid composition and length. Two exceptions are formed by Ab_788 and 17978_933 VgrGs, in which these C-terminal additions are absent and part of the DUF2345 domains also contain deletions of various extents (S1B Fig). Notably, while most of the analyzed *vgrG* loci encoded full-length VgrG proteins endowed with all the above-described domains in a single polypeptide, in both ATCC17978 and the *A. baumannii* clinical strains one *vgrG* locus was split into two genes separately encoding N-t and C-t domains (S1B Fig). Regarding the variable extensions attached to the C-terminal domains of *A. baumannii* VgrGs (S1A Fig) no sequence homology could be detected at these regions (S1B Fig). This suggests that these may have additionally evolved differential functions in the different *A. baumannii* strains under study [12,13,15], adding further levels of complexity to the *A. baumannii* T6SS repertoire.

Analysis of *A. baumannii* ability to compete against *E. coli*

Given that previous work has shown clear differences in the ability of different *Acinetobacter* species to out-compete *E. coli* [10–12], we investigated this phenotype for our *A. baumannii* strains. The different *A. baumannii* strains were mixed with *E. coli* at 1:1 and 10:1 ratios and after 4 h of incubation, bacterial dilutions were spread in nalidixic acid plates which select for *E. coli*. We observed that both *A. baumannii* ATCC17978 and DSM30011 strains are able to kill *E. coli* (Fig 1B and 1C). This assay was repeated using the clinical strains at 1:1 and 10:1 ratios. However, since the MDR strains are resistant to nalidixic acid we used an *E. coli* derivative strain carrying a plasmid with an apramycin resistance cassette. Surprisingly, we observed that none of the *A. baumannii* MDR strains were capable of out-competing *E. coli* (Fig 1B, bottom panel and C).

T6SS locus expression and differential Hcp secretion between clinical and non-clinical strains

As the different *A. baumannii* strains tested displayed very distinct abilities to outcompete *E. coli* we investigated if the T6SS was functional in these strains. RT-PCR analysis confirmed that *hcp* and *tssM*, two key T6SS genes, are being actively transcribed under growth conditions used for bacterial competition assays (L-broth) in all our strains (Fig 2A). In addition, immunoblots performed with an anti-Hcp antibody [22], showed that this protein is present in whole cell lysates for all the strains (Fig 2C, second panel). The identity of the Hcp bands (19 kDa) excised from Coomassie stained gels was further verified by LC-MS analysis.

As Hcp secretion reflects the functionality of the T6SS, we then analysed supernatants obtained from exponential phase cultures of each strain. A clear Hcp band was detected for ATCC17978 and DSM30011 strains but absent in the corresponding T6SS mutants lacking *TssM* (Fig 2B and 2C, first panel), known to be critical for T6SS activity [10,13]. These results indicate that the T6SS is functional in the ATCC17978 and DSM30011 strains. Surprisingly, this is not the case for the clinical isolates Ab242, Ab244, and Ab825 which, in fact, can synthesize Hcp but are seemingly unable to secrete it, neither in conditions used during the killing assays (Fig 2B and 2C, first panel) nor in standard TSB culture conditions (S2 Fig). It is worth noting that sequence analysis indicated no deletions or mutations in genes coding for T6SS components in these clinical strains as compared to DSM30011 or ATCC17978 (S3 Table) that could explain the observed differences in secretion abilities between them.

A. baumannii DSM30011 T6SS-dependent bacterial competition

In order to determine if the T6SS was responsible for the observed killing, $\Delta tssM$ deletion mutants in the ATCC17978 and DSM30011 backgrounds were tested. We observed no difference in *E. coli* killing for the ATCC17978 $\Delta tssM$ mutant with respect to the wild type (Fig 3A

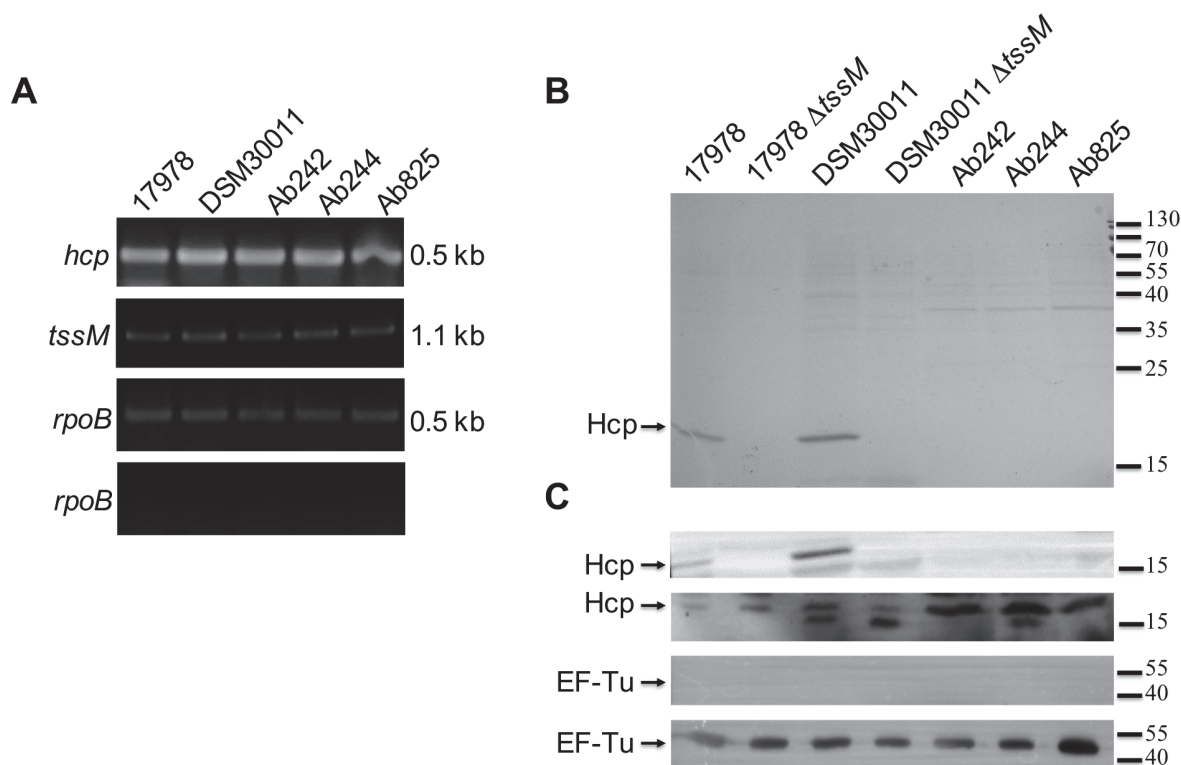


Fig 2. T6SS locus expression. A) RT-PCR transcriptional analysis of *hcp* and *tssM* expression in strains grown in L-broth; *rpoB* gene expression was used as endogenous control. The RNA not subjected to RT was also run in PCR (bottom panel, negative control) to ensure that PCR positive reactions were due to the presence of transcripts and not contaminating genomic DNA. B) The presence of Hcp (arrows) in concentrated culture supernatants of the indicated *A. baumannii* strains grown up to exponential phase in L-Broth was determined by 18% SDS-PAGE and Coomassie Blue staining. C) Control immunoblottings showing the presence of Hcp in the supernatant (first panel) and whole lysates fractions (second panel). A cell-lysis control using antibodies directed against EF-Tu (standard cytoplasmic marker) was performed using supernatant (third panel) or whole lysate (fourth panel) fractions. The final positions of the molecular mass markers (in kDa) are indicated on the right margin.

doi:10.1371/journal.pone.0138265.g002

and 3B) consistent with what has been previously reported [10]. Interestingly, the T6SS-independent killing of *E. coli* by the *A. baumannii* ATCC17978 strain was contact-dependent as introduction of a membrane between the two strains completely abolished this phenotype (Fig 3A and 3B). It is worth noting that neither contact-dependent growth inhibition (CDI) systems nor additional T6SS were found encoded on the genome of ATCC17978.

In sharp contrast to ATCC17978, the introduction of the $\Delta tssM$ mutation into the DSM30011 strain completely abolished its ability to outcompete *E. coli* (Fig 3C and 3D) in correlation with the concomitant loss of Hcp secretion (Fig 3E). The wild-type killing phenotype and the Hcp secretion were fully restored by expressing *tssM* from a plasmid in the DSM30011 mutant strain (Fig 3C, 3D and 3E). In conclusion, *A. baumannii* DSM30011 killing of *E. coli* is dependent on a functional T6SS.

It has recently been shown that different *V. cholerae* strains can out-compete each other in a T6SS-dependent manner [27]. When bacteria from DSM30011 and ATCC17978 strains were co-incubated (1:1 ratio), we observed a reduction in CFU counts for the tetracyclin-resistant prey ATCC17978. This tendency increased when the strains were mixed in a 10:1 ratio (Fig 4A and 4B). This decrease was not observed with the DSM30011 $\Delta tssM$ deficient strain but restored in the complemented *tssM* strain (Fig 4A and 4B), showing that DSM30011 is able to use its T6SS to kill ATCC17978. When the attacker and prey were switched and mixed in a

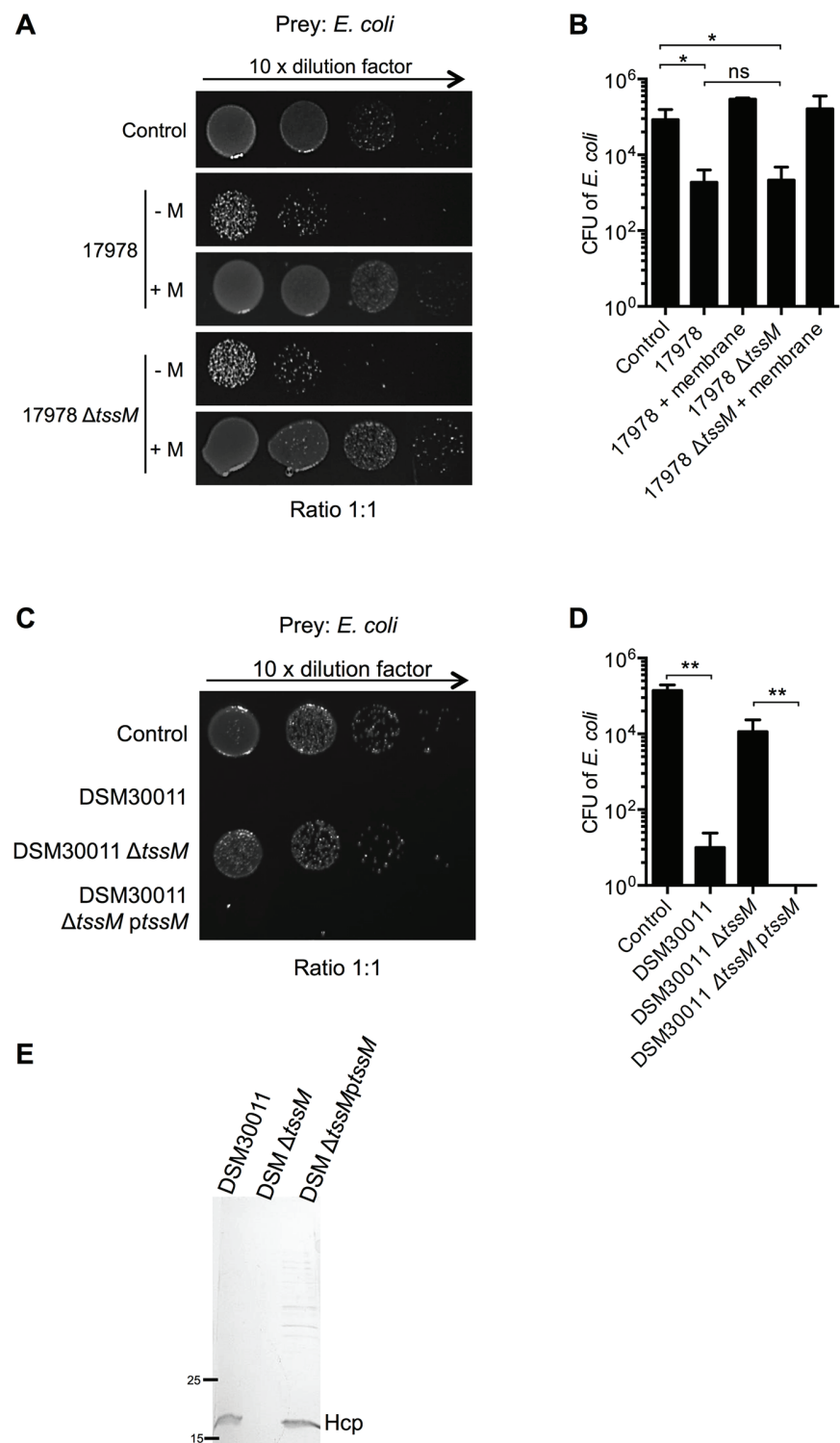


Fig 3. The *A. baumannii* DSM30011 T6SS is required for out-competing *E. coli*. A) Representative image showing survival of DH5 α *E. coli* after incubation in growth medium (control) or with *A. baumannii* ATCC17978 wild type and $\Delta tssM$ strains at a 1:1 ratio with or without the presence of a membrane (+M) and B) corresponding quantification ($N = 6$). C) Survival of DH5 α *E. coli* after incubation in growth medium (control) or with *A. baumannii* DSM30011 wild type, $\Delta tssM$ and $\Delta tssM$ complemented strains at a 1:1 ratio,

with D) corresponding quantification ($N = 4$). E) 18% SDS-PAGE (stained with Coomassie Blue) analysis of Hcp secretion in concentrated culture supernatants of *A. baumannii* DSM30011 wild type, $\Delta tssM$ and $tssM$ complemented strains grown up to exponential phase in TSB. Molecular markers are indicated on the left. All quantifications are expressed as means $\pm$ SDM plotted in a logarithmic scale.

doi:10.1371/journal.pone.0138265.g003

10:1 ratio, a decrease was observed for the gentamicin-resistant DSM30011 prey when mixed with the wild type or $\Delta tssM$ ATCC17978 strain (S3 Fig), indicating that ATCC17978 is able to outcompete the DSM30011 strain by a T6SS-independent mechanism, as observed for *E. coli* (Fig 3A and 3B).

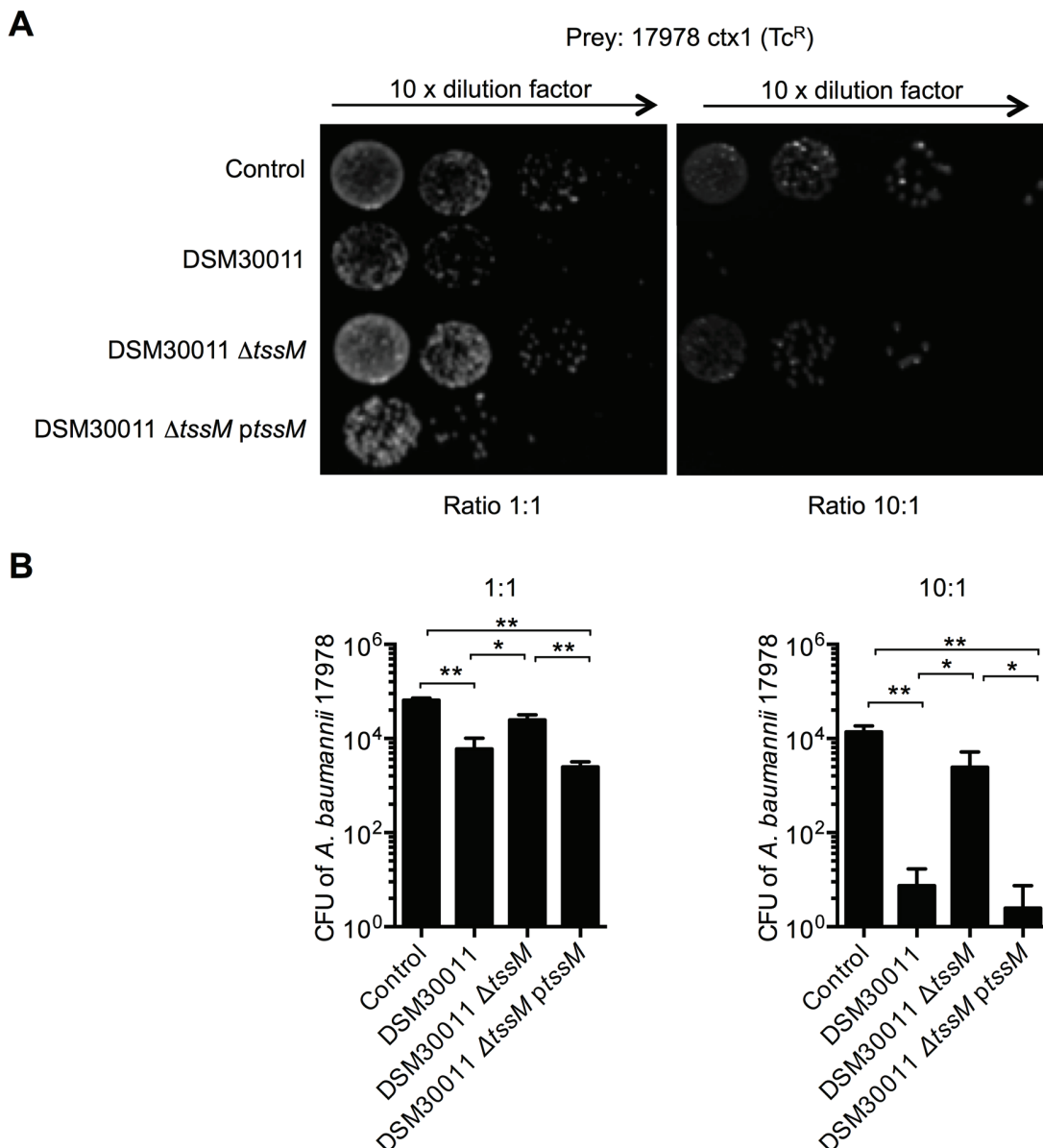


Fig 4. Competition between *A. baumannii* species. A) Survival of tetracycline-resistant (Tc^R) ATCC17978-CTX1 strain after incubation in growth medium (control) or with the DSM30011 wild type, $tssM$ deleted or complemented strains at 1:1 (left panel) or 10:1 (right panel) ratios and B) corresponding quantification ($N = 4$).

doi:10.1371/journal.pone.0138265.g004

T6SS involvement in *A. baumannii* competition with other Gram negative nosocomial pathogens

As hospital-acquired infections are often the result of colonization of patients with a mixed population of bacteria we analysed the ability of *A. baumannii* to kill *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*, two other nosocomial pathogens associated with respiratory infections. For these experiments, we focused on the DSM30011 that showed the strongest ability to outcompete *E. coli*. We found that in our killing conditions, DSM30011 efficiently outcompeted the *P. aeruginosa* PAK strain in a T6SS-dependent manner (Fig 5A and 5B), when present at a ratio of 10:1 against its prey. This was also observed for other *P. aeruginosa* strains, namely PA14 and PA7 (data not shown). More interestingly, the DSM30011 could also outcompete a PAK *retS* mutant in which the T6SS is active [12] and data not shown, [28]. In addition, killing of *K. pneumoniae* was also observed (Fig 5C and 5D). In all cases, we consistently observed enhanced killing for the complemented strain $\Delta tssMptssM$ confirming T6SS dependency (Fig 5B and 5D). Together these data show that the *A. baumannii* DSM30011 strain has the ability to kill other nosocomial pathogens.

The T6SS of *A. baumannii* DSM30011 is not implicated in biofilm formation

When routinely cultivating the analyzed *A. baumannii* strains in liquid culture media we repeatedly observed that DSM30011 cells have a higher tendency to grow on the liquid-air interface forming a thick pellicle on the surface. This observation was confirmed by analyzing their growth characteristics in both rich (TSB) and glutamate supplemented minimal (BM2G) liquid media (Fig 6A). We then investigated the ability of the different *A. baumannii* strains to produce biofilm, thought to provide a reservoir for transmission of *A. baumannii* to susceptible patients in hospital surfaces [4]. Following 24 h incubation, the DSM30011 strain exhibited the highest ability to adhere to polystyrene surfaces suggesting biofilm production (Fig 6A and 6B). In agreement with previous work [29], we observed that ATCC17978 is not a strong biofilm producer, a situation also observed for the clinical strains analysed which produced similar or even lower amounts of biofilm than this reference strain (Fig 6A and 6B). Confocal microscopy confirmed the ability of *A. baumannii* DSM30011 cells to form a biofilm with numerous large bacterial aggregates visible after 24 h (S4 Fig). On the contrary, this was not found for the ATCC17978 strain (S4 Fig) or the clinical isolates (data not shown). Analysis of the depth of bacterial growth (excluding the bacterial aggregates) on the glass-bottom plates under static growth conditions confirmed extensive biofilm formation in the case of DSM30011 in contrast to ATCC17978 cells (Fig 6C). As the T6SS has been implicated in biofilm formation in other bacterial pathogens [30–32] we investigated the ability of the *A. baumannii* DSM30011 $\Delta tssM$ mutant to adhere to abiotic surfaces and form biofilm. Under static growth conditions no significant differences were observed in comparison to the wild-type or complemented strains by neither microscopy analysis of biofilm depth (Fig 6C) nor following crystal violet staining (Fig 6D), suggesting that the T6SS is not required for biofilm formation in this *A. baumannii* strain.

The T6SS of *A. baumannii* DSM30011 is required for virulence *in vivo*

In order to determine if the DSM30011 T6SS fulfils other roles beyond bacterial killing, we further characterized the corresponding $\Delta tssM$ strain. The involvement of the T6SS of *A. baumannii* DSM30011 in virulence was tested *in vivo* basing on previous established protocols [33]. We first inoculated mice with 10^8 CFU of the wild-type DSM30011 strain and their weight and health were monitored for 2 days. We found that intraperitoneal (i.p.) inocula of 10^8 CFU

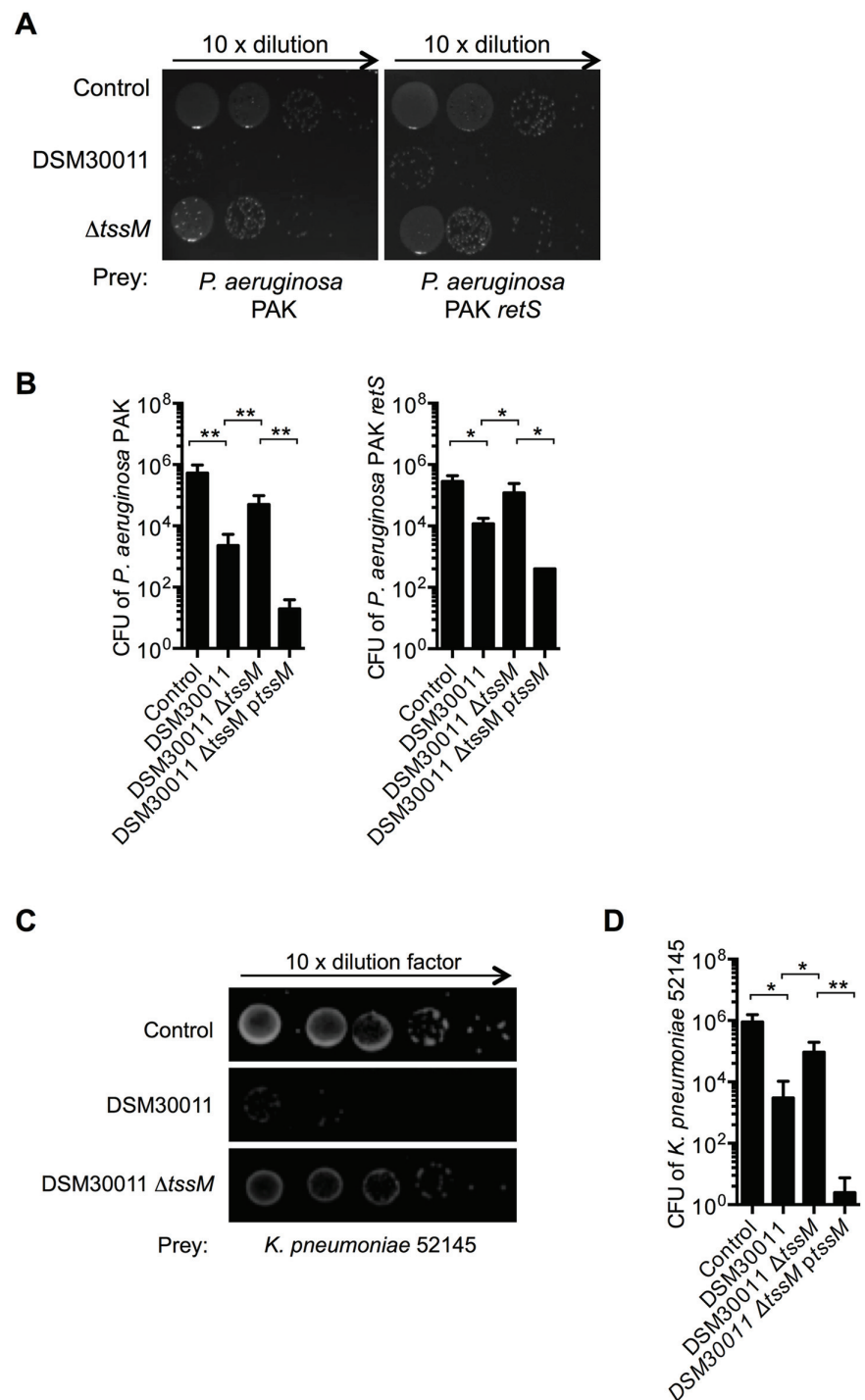


Fig 5. Competition between *A. baumannii* DSM30011 and nosocomial pathogens. Survival of A) different *P. aeruginosa* strains and C) rifampicin-resistant *K. pneumoniae* after incubation in growth medium (control) or with *A. baumannii* DSM30011 wild type, *tssM* deleted or complemented strains at a 10:1 ratio. *Pseudomonas* strains were selected with *Pseudomonas* Isolation Agar (PIA) media. Quantification is shown in B) and D), in which data are expressed as means $\pm$ SDM plotted in a logarithmic scale to visualize experimental variation from 3 independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0138265.g005

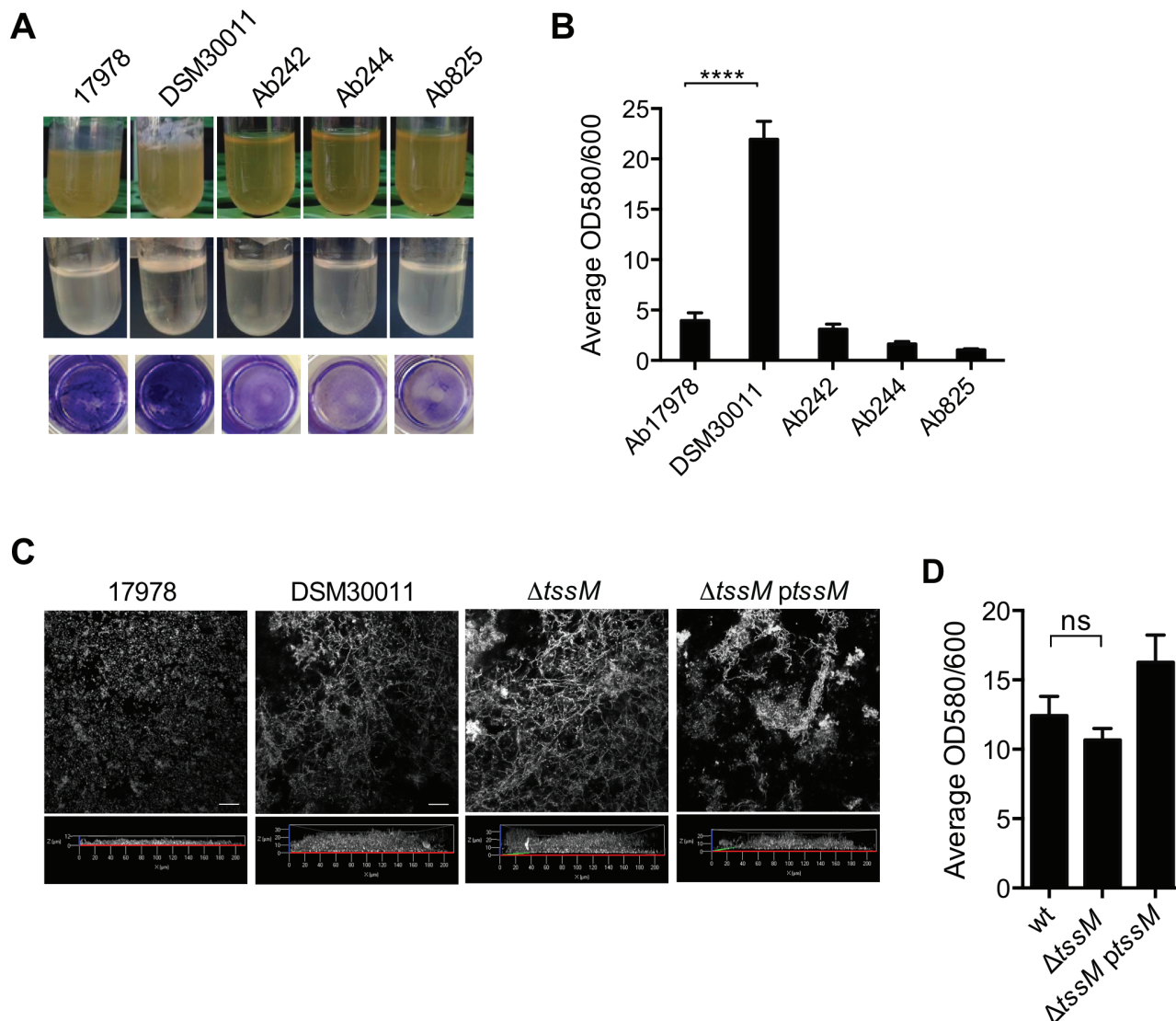


Fig 6. *A. baumannii* strain-specific growth characteristics and biofilm formation. A) The different strains were grown over-night in TSB rich medium (upper panel) or BM2 minimal medium supplemented with 10 mM glutamate (BM2G; middle panel). Bottom panel corresponds to polystyrene wells microtiter plates labelled with crystal violet and quantification is shown in B). The results are expressed as means $\pm$ SEM of experiments performed in triplicate (**** $P < 0.0001$). The difference between the DSM30011 and each of the clinical isolates was also significant (**** $P < 0.0001$) but not shown in the graph for simplicity. C) Confocal microscope 3D reconstruction of biofilm formed by the different strains, formed on glass-bottom slides after 24 h in static conditions. Images correspond to a slice obtained from each biofilm stack, labelled with DAPI. Depth analysis is shown for the 3D reconstruction of the z-stacks obtained for each strain. D) Analysis of the biofilm forming capacities of wild-type DSM30011, $\Delta tssM$, and $\Delta tssM$ ptssM-complemented strains grown for 24 h in BM2G medium following crystal violet staining.

doi:10.1371/journal.pone.0138265.g006

results in death of all mice in less than 24 h most likely from septic shock rather than *A. baumannii* colonization. On the contrary, a 10^7 CFU injection dose was found to be sub-lethal, resulting in most mice sick and showing significant weight-loss at 18 h post-inoculation, followed by gradual recovery in the hours after. We therefore selected this dose to i.p. inject mice with a mixed inocula containing the DSM30011 $\Delta tssM$ and the parental wild-type strain and obtained a CI of 0.328 ± 0.0547 at 18 h post-inoculation (statistically different from 1, $P = 0.008$, $N = 5$). However, due to loss of the plasmid in this model of infection we were not

able to complement the mutant phenotype and therefore we could not determine with certainty the role of the *A. baumannii* DSM30011 T6SS in mice. Therefore, no additional mouse models of infection were tested for ethical reasons and instead, to further evaluate possible roles of the T6SS in *A. baumannii* DSM30011 virulence, we used *G. mellonella* killing assays as an alternative infection model. *G. mellonella* has been widely used for studying the virulence mechanisms of several human pathogens, including *A. baumannii* [7,34–38]. In addition, the DSM30011 strain was previously shown to be virulent in this model organism [25]. We observed a significant attenuation of the DSM30011 $\Delta tssM$ strain that was fully reverted by the expression of *tssM* from a plasmid (Fig 7). Overall, these results show that the T6SS of the *A. baumannii* DSM30011 strain is implicated in virulence in contrast to the ATCC17978 strain [10].

Discussion

This work highlights that the *A. baumannii* T6SS can be implicated in host colonization but in a strain-specific manner. We observed striking differences between the *A. baumannii* strains tested in bacterial competition assays. MDR *A. baumannii* strains were unable to induce killing of *E. coli*, due to an inactive T6SS in our laboratory conditions as demonstrated by lack of export of Hcp. Heterogeneity in Hcp export in *Acinetobacter* has been previously reported by Weber *et al.* [10], and might reflect different mechanisms of regulation of T6SS assembly. It remains possible that additional signals are necessary to induce secretion of Hcp, such as contact with a particular host target or an environmental signal lacking under our laboratory conditions. Alternatively, it may be a specific trait of clinical isolates that would be more adapted to human infection, in which the T6SS would be “turned off” or its function affected by exopolysaccharide production, presence of antibiotic resistance genes or additional regulatory plasmids. In this context, while this manuscript was in revision, Weber and co-workers reported that the T6SS in some *A. baumannii* strains including clinical MDR isolates can be transcriptionally repressed by two plasmid-encoded TetR regulators [39]. Whole genome sequence analysis failed to identify sequence homologues of these regulators in the *A. baumannii* MDR clinical strains analysed in this work and consistently, we observed the presence of Hcp in total extracts of the corresponding cells thus suggesting a different T6SS regulatory mechanism at the level of secretion at play.

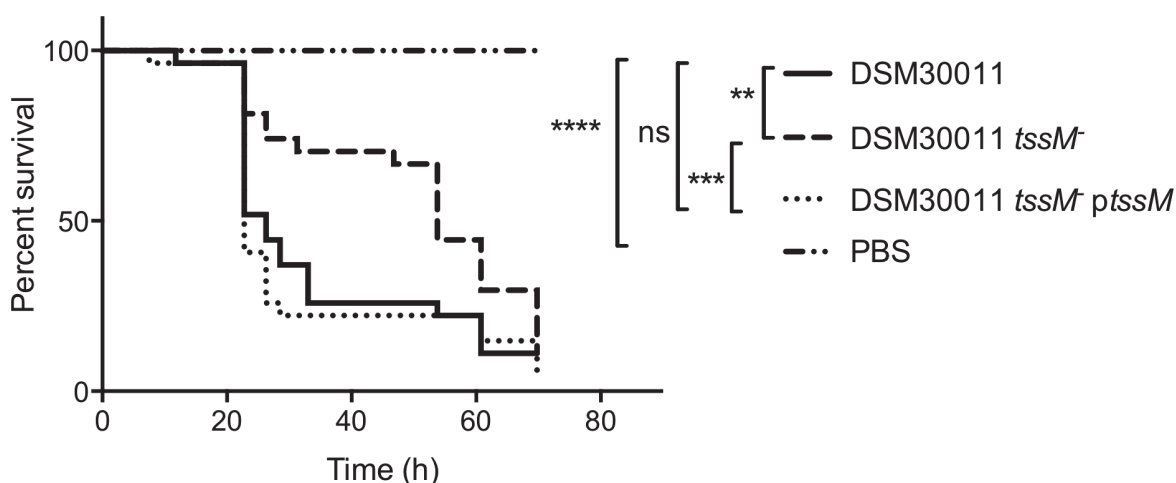


Fig 7. *A. baumannii* DSM30011 T6SS role in virulence. Comparative survival analysis of *G. mellonella* larvae inoculated with 5×10^5 CFU of *A. baumannii* DSM30011 wild type, its isogenic $\Delta tssM$ mutant or complemented strain. Data are representative of three separate survival experiments, each performed with 20 larvae per strain. Survival curves were constructed by the Kaplan-Meier method and compared by log-rank analysis (* $P < 0.05$; n.s.: non-significant).

doi:10.1371/journal.pone.0138265.g007

In contrast to the clinical strains, DSM30011 was able to strongly outcompete *E. coli* and more importantly other Gram-negative pathogens affecting the respiratory tract in a T6SS-dependent manner. This could be particularly relevant in the context of competition for a specific environmental niche but also in nosocomial infections, in which patients are often colonized by multiple bacterial pathogens, which could result in transfer of genetic material and spread of antibiotic resistance [14]. Genomic regions around *vgrG* loci were analysed in search for putative effectors in the DSM30011 strain that could account for its killing capacity. In the genomic region flanking DSM_11755 gene, which is the closest to the T6SS locus, no genes with function related to T6 apparatus were found. In contrast, in the other three *vgrG* loci (S5 Fig) genes encoding for candidate effectors only present in DSM30011 and not in the other strains under study were detected. Downstream the DSM_13300 gene, three ORFs with homology to Rhs proteins were found associated to a putative immunity protein (S5 Fig). Indeed, the ORF closest to the putative immunity protein contains a PxxxxDPxGL peptide motif (PNQWIDPKGL), which sharply demarcates the Rhs C-t region usually harboring a toxin [40]. No characterized domains were found in the C-t, which is conserved in Rhs proteins only encoded by the *Acinetobacter* genus. Close to DSM_18715 and DSM_00475 genes four putative proteins with peptidoglycan-binding domains were detected (PG1_1106, PG2_1106, LysM_932 and LysM_1106) two of them harbouring a LysM motif frequently present in accessory proteins of the T6SS [41]. PG2_1106 also shows homology to enzymes with muramidase activity. Of note, a protein harbouring a MIX (marker for T6 effector) domain and a pre-toxin motif was detected in the DSM_18715 loci. However, no known toxin domains were found in the C-t of this protein. In sum, several genes coding for toxin candidates were found in the analysed loci, which could be responsible for the capacity of DSM30011 to outcompete other bacteria.

In sharp contrast to ATCC17978 [10] we found that the DSM30011 T6SS also mediated virulence towards *G. mellonella*. The molecular mechanisms by which the T6SS modulates DSM30011 host colonization need to be further investigated. Our data suggest that it does not play a role in either bacterial adhesion to abiotic surfaces nor biofilm formation. Interaction with host cells, namely lung epithelial cells and phagocytic cells needs to be investigated in the context of the T6SS. It is possible that the T6SS would enable control of specific cellular responses or enhance resistance to killing by phagocytes, a cell type relevant in the *Galleria* model of infection. The innate immune systems of *G. mellonella* and mammals share a high degree of homology, and the larvae of this insect show both humoral responses with antimicrobial peptide production and basic cellular immune responses mediated mainly by phagocytic cells designated haemocytes [42]. This model organism has in fact been widely used for studying virulence of human pathogens such as *L. pneumophila* and *P. aeruginosa* with good correlation to mammalian models of infection [34–36].

In summary, we have shown that the *A. baumannii* DSM30011 T6SS is operative and critical for outcompeting other bacterial species. Importantly, we show for the first time in the case of this specific environmental *A. baumannii* strain, that the T6SS is also implicated in host colonisation. Additional studies are now needed to identify the secreted molecules involved, determine the role of the T6SS during the course of colonization and if it confers a fitness advantage in mixed infections *in vivo*, as is often the case for *A. baumannii* hospital infections.

Supporting Information

S1 Fig. Alignments of VgrG proteins of the *A. baumannii* strains analyzed in this study.

The different VgrG proteins were predicted from nucleotide sequencing analysis conducted in this work and are indicated after their strain origin (Ab, Ab242/244/825 clinical strains; DSM,

DSM30011; 17978, ATCC 17978) followed by the corresponding content of amino acids. The 17978_914* denomination denotes a hypothetical VgrG of 914 amino acid residues from ATCC 17978 which was inferred from the nucleotide sequence A1S_0082 after correcting for possible frameshift sequence errors on the basis of alignments with other VgrG sequences. The numbers above the sequences indicate the corresponding amino acid position used for comparisons in the text. The alignments were constructed by MUSCLE 3.7 with default parameters using the programs available in <http://phylogeny.lirmm.fr>. Similar residues are colored as the most conserved according to BLOSUM62 (average BLOSUM62 score: max: 3.0 (pale blue); mid: 1.5 (blue); low: 0.5 (gray). The domain of unknown function DUF2345/PF10106 (inferred using <http://pfam.xfam.org>) extends between residues 859–1004 in the alignments and contains deletions of different extents at its C-terminal region in VgrGs 17978_933 and Ab_788. (PDF)

S2 Fig. Hcp secretion under standard culture conditions. A) RT-PCR transcriptional analysis of *hcp* and *tssM* expression; *rpoB* gene expression was used as endogenous control. The RNA not subjected to RT was also run in PCR (bottom panel, negative control) to ensure that PCR positive reactions were due to the presence of transcripts and not contaminating genomic DNA. B) Detection of Hcp (arrows) in concentrated culture supernatants of the indicated *A. baumannii* strains grown up to exponential phase in TSB. Proteins were separated by 18% SDS-PAGE and stained by Coomassie Blue. Immunoblottings showing the presence of Hcp in whole cell lysates are shown at the bottom. (TIFF)

S3 Fig. Competition between *A. baumannii* species. Survival of the DSM30011 mini Tn7 (gentamicin-resistant; Gm^R) strain after incubation in growth medium (control) or with wild-type or Δ *tssM* *A. baumannii* 17978 strains at a 10:1 ratio. (TIFF)

S4 Fig. Aggregate formation by DSM30011 strain. Confocal microscope images of biofilm formed on glass-bottom slides after 24 h in BM2G medium. Top image corresponds to 3D reconstruction to show large bacterial aggregates formed with the DSM30011 strain in contrast to the ATCC17978, with depth analysis below and corresponding surface plots. All scale bars correspond to 20 μ m. (TIFF)

S5 Fig. Genetic organization of *vgrG* loci in *A. baumannii* DSM30011. Hyp, hypothetical protein; Rhs, Rhs homologous protein; Imm, putative toxin immunity protein; MIX, LysM and PG are MIX-, LysM- and peptidoglycan binding-domain containing proteins, respectively; Pre-tox, pre-toxin motif. (TIFF)

S1 Table. Strains and plasmid included in this study. (PDF)

S2 Table. Primers used in this study (PDF)

S3 Table. T6SS locus genes in *A. baumannii* strains under study. (PDF)

S4 Table. Putative VrgG proteins encoded by the *A. baumannii* strains under study. (PDF)

Acknowledgments

We would like to acknowledge M. Feldman (University of Alberta, Canada) and P. Dunman (University of Rochester Medical Center, USA) for providing plasmids and important advice to help initiate our team in working with *Acinetobacter*. We also thank A. Filloux (Imperial College London), R. Voulhoux (CNRS UMR7255 and Aix-Marseille University, France) and J. Bengoechea (Queen's University, Belfast, UK) for strains and antibodies. We thank S. Bigot and S. Garvis for critical reading of the manuscript. This work has benefited from the facilities of the Protein Science Facility of the SFR Biosciences Lyon (<http://www.sfr-biosciences.fr>).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GR JG AMV SS. Performed the experiments: GR SG MLFG VB. Analyzed the data: GR SG VB JPG AMV ASL. Contributed reagents/materials/analysis tools: XC AMV. Wrote the paper: GR AMV SS.

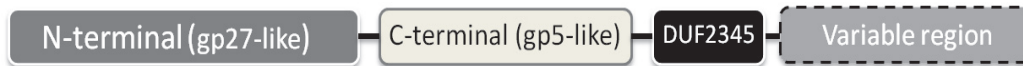
References

- McConnell MJ, Actis L, Pachón J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. FEMS Microbiology Reviews. 2012; 37: 130–155. doi: [10.1111/j.1574-6976.2012.00344.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00344.x) PMID: [22568581](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22568581/)
- Zarrilli R, Pourmaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. Int J Antimicrob Agents. 2013; 41: 11–19. doi: [10.1016/j.ijantimicag.2012.09.008](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.09.008) PMID: [23127486](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23127486/)
- Espinal P, Martí S, Vila J. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. J Hosp Infect. 2012; 80: 56–60. doi: [10.1016/j.jhin.2011.08.013](https://doi.org/10.1016/j.jhin.2011.08.013) PMID: [21975219](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21975219/)
- Longo F, Vuotto C, Donelli G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. New Microbiol. 2014; 37: 119–127. PMID: [24858639](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24858639/)
- Rumbo-Feal S, Gómez MJ, Gayoso C, Álvarez-Fraga L, Cabral MP, Aransay AM, et al. Whole transcriptome analysis of *Acinetobacter baumannii* Assessed by RNA-sequencing reveals different mRNA expression profiles in biofilm compared to planktonic cells. PLoS ONE. 2013; 8: e72968. PMID: [24023660](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24023660/)
- Lees-Miller RG, Iwashkiw JA, Scott NE, Seper A, Vinogradov E, Schild S, et al. A common pathway for O-linked protein-glycosylation and synthesis of capsule in *Acinetobacter baumannii*. Mol Microbiol. 2013; 89: 816–830. doi: [10.1111/mmi.12300](https://doi.org/10.1111/mmi.12300) PMID: [23782391](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23782391/)
- Iwashkiw JA, Seper A, Weber BS, Scott NE, Vinogradov E, Stratilo C, et al. Identification of a general O-linked protein glycosylation system in *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence and biofilm formation. PLoS Pathog. 2012; 8: e1002758. doi: [10.1371/journal.ppat.1002758.t003](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002758.t003) PMID: [22685409](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22685409/)
- Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. Infect Immun. 2009; 77: 3150–3160. doi: [10.1128/IAI.00096-09](https://doi.org/10.1128/IAI.00096-09) PMID: [19470746](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19470746/)
- Mortensen BL, Skaar EP. Host-microbe interactions that shape the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii* infection. Cell Microbiol. 2012; 14: 1336–1344. doi: [10.1111/j.1462-5822.2012.01817.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01817.x) PMID: [22640368](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22640368/)
- Weber BS, Miyata ST, Iwashkiw JA, Mortensen BL, Skaar EP, Pukatzki S, et al. Genomic and functional analysis of the Type VI Secretion System in *Acinetobacter*. PLoS ONE. 2013; 8: e55142. PMID: [23365692](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23365692/)
- Carruthers MD, Nicholson PA, Tracy EN, Munson RS. *Acinetobacter baumannii* Utilizes a Type VI Secretion System for bacterial competition. PLoS ONE. 2013; 8: e59388. PMID: [23527179](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23527179/)
- Basler M, Ho BT, Mekalanos JJ. Tit-for-tat: type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions. Cell. 2013; 152: 884–894. doi: [10.1016/j.cell.2013.01.042](https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.042) PMID: [23415234](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23415234/)
- Zoued A, Brunet YR, Durand E, Aschtgen M-S, Logger L, Douzi B, et al. Architecture and assembly of the Type VI secretion system. Biochim Biophys Acta. 2014; 1843: 1664–1673. doi: [10.1016/j.bbamcr.2014.03.018](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.03.018) PMID: [24681160](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24681160/)
- Borgeaud S, Metzger LC, Scignari T, Blokesch M. Bacterial evolution. The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer. Science. 2015; 347: 63–67. doi: [10.1126/science.1260064](https://doi.org/10.1126/science.1260064) PMID: [25554784](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25554784/)

15. Shneider MM, Buth SA, Ho BT, Basler M, Mekalanos JJ, Leiman PG. PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. *Nature*. 2013; 500: 350–353. doi: [10.1038/nature12453](https://doi.org/10.1038/nature12453) PMID: [23925114](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23925114/)
16. Wright MS, Haft DH, Harkins DM, Perez F, Hujer KM, Bajaksouzian S, et al. New insights into dissemination and variation of the health care-associated pathogen *Acinetobacter baumannii* from genomic analysis. *mBio*. 2014; 5: e00963–13. doi: [10.1128/mBio.00963-13](https://doi.org/10.1128/mBio.00963-13) PMID: [24449752](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24449752/)
17. Jones CL, Clancy M, Honnold C, Singh S, Snesrud E, Onmus-Leone F, et al. Fatal outbreak of an emerging clone of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* with enhanced virulence. *Clin Infect Dis*. 2015; 61: 145–154. doi: [10.1093/cid/civ225](https://doi.org/10.1093/cid/civ225) PMID: [25824815](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25824815/)
18. Mussi MA, Limansky AS, Viale AM. Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 1432–1440. doi: [10.1128/AAC.49.4.1432-1440.2005](https://doi.org/10.1128/AAC.49.4.1432-1440.2005) PMID: [15793123](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15793123/)
19. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology (Reading, Engl)*. 2003; 149: 3473–3484.
20. Mussi MA, Relling VM, Limansky AS, Viale AM. CarO, an *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein involved in carbapenem resistance, is essential for l-ornithine uptake. *FEBS Letters*. 2007; 581: 5573–5578. doi: [10.1016/j.febslet.2007.10.063](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.10.063) PMID: [17997983](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17997983/)
21. Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, Schweizer HP. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene*. 1998; 212: 77–86. PMID: [9661666](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9661666/)
22. Hachani A, Lossi NS, Hamilton A, Jones C, Bleves S, Albesa-Jové D, et al. Type VI secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*: secretion and multimerization of VgrG proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 2011; 286: 12317–12327. doi: [10.1074/jbc.M110.193045](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.193045) PMID: [21325275](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21325275/)
23. Choi K-H, Schweizer HP. mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Protocols*. 2006; 1: 153–161. doi: [10.1038/nprot.2006.24](https://doi.org/10.1038/nprot.2006.24) PMID: [17406227](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17406227/)
24. Piechaud M, Second L. Studies of 26 strains of *Moraxella lwoffii*. *Ann Inst Pasteur (Paris)*. 1951; 80: 97–99.
25. Wilharm G, Piesker J, Laue M, Skiebe E. DNA Uptake by the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces. *J Bacteriol*. 2013; 195: 4146–4153. doi: [10.1128/JB.00754-13](https://doi.org/10.1128/JB.00754-13) PMID: [23852865](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23852865/)
26. Mussi MA, Limansky AS, Relling V, Ravasi P, Arakaki A, Actis LA, et al. Horizontal gene transfer and assortative recombination within the *Acinetobacter baumannii* clinical population provide genetic diversity at the single *carO* gene, encoding a major outer membrane protein channel. *J Bacteriol*. 2011; 193: 4736–4748. doi: [10.1128/JB.01533-10](https://doi.org/10.1128/JB.01533-10) PMID: [21764928](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21764928/)
27. Unterwiesing D, Miyata ST, Bachmann V, Brooks TM, Mullins T, Kostiuk B, et al. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system employs diverse effector modules for intraspecific competition. *Nature Communications*. 2014; 5: 3549. doi: [10.1038/ncomms4549](https://doi.org/10.1038/ncomms4549) PMID: [24686479](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24686479/)
28. Moscoso JA, Mikkelsen H, Heeb S, Williams P, Filloux A. The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP signalling. *Environ Microbiol*. 2011; 13: 3128–3138. doi: [10.1111/j.1462-2920.2011.02595.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02595.x) PMID: [21955777](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21955777/)
29. Mussi MA, Gaddy JA, Cabruja M, Arivett BA, Viale AM, Rasia R, et al. The opportunistic human pathogen *Acinetobacter baumannii* senses and responds to light. *J Bacteriol*. 2010; 192: 6336–6345. doi: [10.1128/JB.00917-10](https://doi.org/10.1128/JB.00917-10) PMID: [20889755](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20889755/)
30. Zhang L, Xu J, Xu J, Zhang H, He L, Feng J. TssB is essential for virulence and required for type VI secretion system in *Ralstonia solanacearum*. *Microb Pathog*. 2014; 74: 1–7. doi: [10.1016/j.micpath.2014.06.006](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.06.006) PMID: [24972114](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24972114/)
31. Enos-Berlage JL, Guvener ZT, Keenan CE, McCarter LL. Genetic determinants of biofilm development of opaque and translucent *Vibrio parahaemolyticus*. *Mol Microbiol*. 2005; 55: 1160–1182. doi: [10.1111/j.1365-2958.2004.04453.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04453.x) PMID: [15686562](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15686562/)
32. Aschtgen M-S, Bernard CS, De Bentzmann S, Llobès R, Cascales E. SciN is an outer membrane lipoprotein required for type VI secretion in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2008; 190: 7523–7531. doi: [10.1128/JB.00945-08](https://doi.org/10.1128/JB.00945-08) PMID: [18805985](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18805985/)
33. Lopez-Rojas R, Dominguez-Herrera J, McConnell MJ, Docobo-Perez F, Smani Y, Fernandez-Reyes M, et al. Impaired virulence and in vivo fitness of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Infectious Diseases*. 2011; 203: 545–548. doi: [10.1093/infdis/jiq086](https://doi.org/10.1093/infdis/jiq086) PMID: [21216865](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21216865/)

34. Peleg AY, Jara S, Monga D, Eliopoulos GM, Moellering RC, Mylonakis E. *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53: 2605–2609. doi: [10.1128/AAC.01533-08](https://doi.org/10.1128/AAC.01533-08) PMID: [19332683](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19332683/)
35. Harding CR, Schroeder GN, Reynolds S, Kosta A, Collins JW, Mousnier A, et al. *Legionella pneumophila* pathogenesis in the *Galleria mellonella* infection model. *Infect Immun*. 2012; 80: 2780–2790. doi: [10.1128/IAI.00510-12](https://doi.org/10.1128/IAI.00510-12) PMID: [22645286](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22645286/)
36. Jander G, Rahme LG, Ausubel FM. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol*. 2000; 182: 3843–3845. PMID: [10851003](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10851003/)
37. Heindorf M, Kadari M, Heider C, Skiebe E, Wilharm G. Impact of *Acinetobacter baumannii* superoxide dismutase on motility, virulence, oxidative stress resistance and susceptibility to antibiotics. *PLoS ONE*. 2014; 9: e101033. PMID: [25000585](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25000585/)
38. Jacobs AC, Thompson MG, Black CC, Kessler JL, Clark LP, McQueary CN, et al. AB5075, a highly virulent isolate of *Acinetobacter baumannii*, as a model strain for the evaluation of pathogenesis and antimicrobial treatments. *mBio*. 2014; 5: e01076–14. doi: [10.1128/mBio.01076-14](https://doi.org/10.1128/mBio.01076-14) PMID: [24865555](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24865555/)
39. Weber BS, Ly PM, Irwin JN, Pukatzki S, Feldman MF. A multidrug resistance plasmid contains the molecular switch for type VI secretion in *Acinetobacter baumannii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112: 9442–9447. doi: [10.1073/pnas.1502966112](https://doi.org/10.1073/pnas.1502966112) PMID: [26170289](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26170289/)
40. Koskiniemi S, Lamoureux JG, Nikolakakis KC, t'Kint de Roodenbeke C, Kaplan MD, Low DA, et al. Rhs proteins from diverse bacteria mediate intercellular competition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110: 7032–7037. doi: [10.1073/pnas.1300627110](https://doi.org/10.1073/pnas.1300627110) PMID: [23572593](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23572593/)
41. Salomon D, Kinch LN, Trudgian DC, Guo X, Klimko JA, Grishin NV, et al. Marker for type VI secretion system effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111: 9271–9276. doi: [10.1073/pnas.1406110111](https://doi.org/10.1073/pnas.1406110111) PMID: [24927539](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24927539/)
42. Bergin D, Reeves EP, Renwick J, Wientjes FB, Kavanagh K. Superoxide production in *Galleria mellonella* hemocytes: identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils. *Infect Immun*. 2005; 73: 4161–4170. doi: [10.1128/IAI.73.7.4161-4170.2005](https://doi.org/10.1128/IAI.73.7.4161-4170.2005) PMID: [15972506](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15972506/)

A)



B)

	1	60
Ab_1104	MlfnIFsVLEkIGLnaQkRAIHvQFSNelLNhQVFLQRIEGQHqLNgGLmAELICLSTNA	
DSM_1106	MlfnIFsVLEkIGLnaQkRAIHvQFSNelLNhQVFLQRIEGQHqLNgGLmAELICLSTNA	
17978_933	-----mAEIICLSTNA	
Ab_1_463	MlnsThQVIdSLGIspQkRAIrvQFtspiLNdQVFLQRIIdGvHaLNdGLkAELICLSTNA	
Ab_2_601	-----	
17978_1_426	-----	
17978_914*	--msvssilErLGLvSQnRAVHiQFSNqSLNqQVFLQRIEGeHtLNQGSvAELICLSTNA	
DSM_932	MqmsvssilErLGLvSQnRAVHiQFSNqSLNqQVFLQRIEGeHtLNQGSvAELICLSTNA	
17978_2_395	-----	
DSM_875	MshkIFQiIdSLGLvaQnRvIhVQFSNASLNNQVFLQRIEGeHtLNQGSvAELICLSTNA	
Ab_1064	MfnNIFQiLESfGfISQHRsVyLQFSdASLNSQVFLQRIIdGQHLYLNQGMtAELICLSTNA	
DSM_921	MfnNIsQVLESfGfISQHRsVyLQFSdASLNSQVFLQRIIdGQHLYLNQGMtAELICLSTNA	
Ab_788	MfnNIsQVLESfGfISQHRsVHLQFSdASLNSQVFLQRIEGQHLYLNQGMtAELICLSTNA	
17978_921	-----myLQFSdASLNSQVFLQRIIdGQHLYLNQGMtAELICLSTNA	
	61	120
Ab_1104	qIALKQFIGVQVAVDQVTDsGQlFRRTTGIvTEASyGQSDGALTLYKLTIEDaTnLWHKRR	
DSM_1106	qIALKQFIGVQVAVDQVTDsGQlFRRTTGIvTEASyGQSDGALTLYKLTIEDaTnLWHKRR	
17978_933	qIALKQFIGVQVAVDQVTDsGQlFRRTTGIvTEASyGQSDGALTLYKLTIEDaTnLWHKRR	
Ab_1_463	tIqLKsFIGVQaAVDiVTeRGeltRvTGIIThAqQGQSDGSLTLYKLTlEDPTaLWkyRR	
Ab_2_601	-----	
17978_1_426	-----	
17978_914*	HIALKQFIGcQVAVDQVTDtGQFFRTTGIITEASQGQSDGSLTiYnLTlkDPTaLWHKRR	
DSM_932	HIALKQFIGcQVAVDQVTDtGQFFRTTGIITEASQGQSDGSLTiYnLTlkDPTaLWHKRR	
17978_2_395	-----	
DSM_875	HIALKQFIGcQVAIdQVTDtGQFFRTTGIITEASQGQSDGSLTiYnLTlkDPTaLWHKRR	
Ab_1064	HIpLktFIGVQVAVDQVTDrgsFFRTTGIITgASQGQSDGALTLYKLaIsDPTyLWHKRR	
DSM_921	HIpLktFIGVQVAVDQVTDrgsFFRTTGIITgASQGQSDGALTLYKLaIsDPTyLWHKRR	
Ab_788	HIALKtFIGVQVAIdQVTDQGQlFRRTTGIITgASQGQSDGALTLYKLTIsDPTyLWHKRR	
17978_921	HIpLktFIGlQVAVDQVTDrgsFFRTTGIITgASQGQSDGALTLYKLaIsDPTyLWHKRR	
	121	180
Ab_1104	NSRVFMNKSivEItEvLFKEWQeKSPLFAaSLsLDLgGLsQnYDiRPFTMQhNESDYDFL	
DSM_1106	NSRVFMNKSivEItEvLFKEWQeKSPLFAaSLsLDLgGLsQnYDiRPFTMQhNESDYDFL	
17978_933	NSRVFMNKSivEItEvLFKEWQeKSPLFAaSLsLDLgGLsQnYDiRPFTMQhNESDYDFL	
Ab_1_463	NSRVFMNKSvEItwEILFKEWQtKnPLFAaSLsLDLSGLtQTYDVRPFVVMQhNESDwnFL	
Ab_2_601	-----	
17978_1_426	-----MQsNESDYDFL	
17978_914*	NSRVFMNKSvRdISEILFKEWQKSPLFASSiTLdtSGLtkdYDVRPFVVMQsNESDYDFL	
DSM_932	NSRVFMNKSvRdISEILFKEWQKSPLFASSiTLdtSGLtkdYDVRPFVVMQsNESDYDFL	
17978_2_395	-----	
DSM_875	NSRVFMNKSvRdInEILFKEWQKSPLFASSiTLdtSGLskdYDVRPFVVMQsNESDYDFL	
Ab_1064	NSRVFMNKSvKEISEILFqEWQKSPLFASSLTLDLSGLKQTYDVRPFVVMQlNESDYDFL	
DSM_921	NSRVFMNKSvKEISEILFqEWQKSPLFASSLTLDLSGLKQTYDVRPFVVMQlNESDYDFL	
Ab_788	NSRVFMNKSvREITEILFqEWQKSPLFASSLTLDLSGLKQaYDiRPFVVMQlNqSDYDFL	
17978_921	NSRVFMNKSvKEISEILFqEWQKSPLFASSLTLDLSGLKQTYDVRPFVVMQlNESDYDFL	
	181	240
Ab_1104	TRLWRSEgvSWLIDeSELFVphfTApIqaQKLRLIDDNNQYQALARRSIRYHRSSATEYq	
DSM_1106	TRLWRSEgvSWLIDeSELFVphfTApIqaQKLRLIDDNNQYQALARRSIRYHRSSATEYq	
17978_933	TRLWRSEgvSWLIDeSELFVphfTApIqgQKLRLIDDNNQYQALARRSIRYHRSSATEYq	
Ab_1_463	TRLIRSEnISWLIDeaqhiVpStdtSIqaQKLRLIdaNsQYQpLdRktIRYHRSSAveEQY	
Ab_2_601	-----	
17978_1_426	TRLWRSEGINwLvDESqLFVAdpnASIQPQvLRLIDDnqnYQALeRRSIRYqRSSATEQF	
17978_914*	TRLWRSEGINwLvDESqLFVAdpnASIQPQvLfnrpkfirhlnAvaSaitvsSatravp	
DSM_932	TRLWRSEGINwLvDESqLFVAdpnASIQPQvLRLIDDnqnYQALeRRSIRYqRSSATEQF	
17978_2_395	-----	
DSM_875	TRLWRSEGINwLvDESqLFVAdpnASIQPQvLRLIDDnqnYQALeRRSIRYqRSSATEQF	
Ab_1064	TRLWRSEGISWLIDeaElTVAASnmnNIQPKLRLIDDNNQYQALtRRaIRYHRSSATEQF	

DSM_921	TRLWRSEGISWLIDEaEltVASnmdNIQPQKLRLIDDNNQYQALtRRaIRYHRSSATEQF
Ab_788	TRLWRSEGINWLIDEaEltVpSnTdhIQPQKLRLIDDNsQYQALSRRtIRYHRShATEQF
17978_921	TRLWRSEGISWLIDEaEltVASnTdNIQPQKLRLIDDNsQYQtLtRRtIRYHRSSATEQF

	241	300
Ab_1104	DSITgfvAvRSLQPTaVHVQRWQpDALaQEEGNGSVvtThTtHSDNfDsAtLSLEqAWHVS	
DSM_1106	DSITgfvAvRSLQPTaVHVQRWQpDALaQEEGNGSVvtThTtHSDNfDsAtLSLEqAWHVS	
17978_933	DSITgfvAvRSLQPTaVHVQRWQpDALaQEEGNGSVvtThTtHSDNfDsAtLSLEqAWHVS	
Ab_1_463	DSmTRLtAeRSLQPNvmHiQRWQAEiLdQEEGiGSVQSkHqHSEhYDNAtLgLEqAWnYS	
Ab_2_601		
17978_1_426	DtITQvKAeRrLQPTSVHVQRWQADALQEEEGSGSVQgTqKHSEhYDNASLnLEDAAWHVS	
17978_914*	irITQvKAeRrLQPTSVHVQRWQADALQEEEGSGSVQgTqKHSEhYDNASLnLEDAAWHVS	
DSM_932	DtITQvKAeRrLQPTSVHVQRWQADALQEEEGSGSVQgTqKHSEhYDNASLnLEDAAWHVS	
17978_2_395		
DSM_875	DtITQvKAeRrLQPTSVHVQRWQADALQEEEGSGSVQgTqKHSEhYDNASLnLEDAAWHVS	
Ab_1064	DSmTsLmAdRSLQPTSiFvQRWQpDvLQQtDgAGSVQSkHqHStNYDNqSLSLLeAAWHfs	
DSM_921	DSmTsLmAdRSLQPTSiFvQRWQpDvLQQtDgAGSVQSkHqHStNYDNqSLSLLeAAWHfs	
Ab_788	DSmTsLmAnRSLQPTSVfVQRWQsDvLQQtDgAGSVQSTHqHStNYDNqSLSLLeDAWHfs	
17978_921	DSmTsLiAgRhLQPsSVfVQRWQsDvLQQtDgAGSVQSkHeHsSNYDNqSLSLLeDAWHfs	

	301	360
Ab_1104	PAWMQDLkGEDQATASSsSQLEKLNQHftdmHaSraKyFkAyssVRDTQVGYWFNlrEHP	
DSM_1106	PAWMQDLkGEDQATASSsSQLEKLNQHftdmHaSraKyFkAyssVRDTQVGYWFNlrEHP	
17978_933	PAWMQDLkGEDQATASSsSQLEKLNQHftdmHaSraKyFkAyssVRDTQVGYWFNlrEHP	
Ab_1_463	PAWigDLkGEDgvTkSgNqQvErLQNlhnYyEAQaKrFiAqTTVRDayVGYyFELNEHP	
Ab_2_601		
17978_1_426	PAWMQDLNGkDQATASgNSQiEqLNQHINAYHhlsSKQFtvagnVRDaQVGYWFELNdHP	
17978_914*	PAWMQDLNGEDQATASgNSQiEqLNQHINAYHhlsSKQFtvagnVRDaQVGYWFELNdHP	
DSM_932	PAWMQDLNGEDQATASgNSQiEqLNQHINAYHhlsSKQFtvagnVRDaQVGYWFELNdHP	
17978_2_395		
DSM_875	PAWMQDLNGEDQATASgNSQiEqLNQHINAYHhlsSKQFtvagnVRDaQVGYWFELNdHP	
Ab_1064	PAWMQDLNGEDgATsaSNqQIEKfNQNlSAYyDAQSKQFiAkTTVRDTQVGYWFELNEHP	
DSM_921	PAWMQDLNGEDgATsaSNqQIEKfNQNlSAYyDAQSKQFiAkTTVRDTQVGYWFELNEHP	
Ab_788	PAWMQDLkGEDgATsaSNqQIEKfNQNlSAfHDAQSKQFiAqTTVRDTQVGYWFELNEHP	
17978_921	PAWMQDLNGEDgATsaSNqQIEKfNQNlSAYHDAQSKQFvAqTTVRDTQVGYWFELNEHP	

	361	420
Ab_1104	EIDQHEGAdqEFLIIaKnfYNQNNLPKDLhQQVsQLLTQ----SrWDqhgdyDI-ERQG	
DSM_1106	EIDQHEGAdqEFLIIaKnfYNQNNLPKDLhQQVsQLLTQ----SrWDqhgdyDI-ERQS	
17978_933	EIDQHEGAdqEFLIIaKnfYNQNNLPKDLhQQVsQLLTQ----SrWDqhgdyDI-ERQG	
Ab_1_463	EIDQHEssDKsFLIVSKnfNQNLPKDLndQIngLLaQ----SnWaiQNpEnsDERQa	
Ab_2_601		
17978_1_426	ElDQHdsADKEFLIIgSKHYYNQNNLPKELQQQlERLLpQGKLKAaQlDSQNpE---qRhF	
17978_914*	ElDQHdsADKEFLIIgSKHYYNQNNLPKELQQQlERLLpQGKLKAaQlDSQNpE---qRhF	
DSM_932	ElDQHdsADKEFLIIgSKHYYNQNNLPKELQQQlERLLpQGKLKAaQlDSQNpE---qRhF	
17978_2_395		
DSM_875	ElDQHdsADKEFLIIgSKHYYNQNNLPKELQQQlERLLpQGKLKAaQlDSQNpE---qRhF	
Ab_1064	EIDQHEstDKEFLIIgKHYYNQNNLPKDLnQQIQnLvqQ----SdWqasNtd---ERQa	
DSM_921	EIDILHsGADKEFLIIgKsYYNQNLPKDLdQQIQtlTtTQ----ShWqSshtk---ERQG	
Ab_788	EIDQHnGsDKEFLIIgKHYYNQNLPKDLnQQIQaLvrrQ----ShW-SiNnE---ERQG	
17978_921	EIDILHsGADKEFLIIgKHYYNQNLPKDLdQQIQtlTtTQ----ShWqSshtk---ERQG	

	421	480
Ab_1104	NELtLiRRqIKTaPEYNPeQHRPiAyPQRAkVVGPEGEtIHVDewGRIKVRFLFTRSDDH	
DSM_1106	NELtLiRRqIKTaPEYNPeQHRPiAyPQRAkVVGPEGEtIHVDewGRIKVRFLFTRSDDH	
17978_933	NELtLiRRqIKTaPEYNPeQHRPiAyPQRAkVVGPEGEtIHVDewGRIKVRFLFTRSDDH	
Ab_1_463	NqLiLqRRHIpTtPaYNPqiHsPvtHPQRAkVVGPEGEtIyVDeWGay-----	
Ab_2_601		
17978_1_426	aELNvvRRnIKaVPEYNFLEHRPaAHPQARVVGLEGESIHVdQWGRIVKVRFL-----	
17978_914*	c--aecRsshqscailirstdqPlthsa-pRVVGLEGESIHVdpvGR-hsRFLFTRaDDH	
DSM_932	aELNvvRRnIKaVPEYNFLEHRPaAHPQARVVGLEGESIHVdQWGRIVKVRFLFTRtDDH	
17978_2_395		
DSM_875	aELNvvRRnIKaVPEYNFLEHRPaAHPQARVVGLEGESIHVdQWGRIVKVRFLFTRaDDH	
Ab_1064	NqLiLqRRHIpTtPaYNPqiHsPvtHPQRAkVVGPEGEtIyVDeWGRIVKVRFLFTRSDDH	
DSM_921	NqLiLqRRHIKTVPeyqPlQdRpqAsvQARVVGPEGESIHVDQWGRIVKVRFLFTRSnDDH	
Ab_788	NELiLqRRHIKTVPeyqPlQdRpqAsvQARVVGPEGESIHVDQWGRIVKVRFLFTRaDDH	
17978_921	NqLiLqRRHIKTVPeyqPlQdRpqAsvQARVVGPEGESIyVDQWGRIVKVRFLFTRanDDH	

	481	540
Ab_1104	gHDGGAGSNDNDTDSAWVDVLTWPWAGEGYGARFLPRIGEVVVIDFFDGNIDRPFVtGRIH	
DSM_1106	gHDGGAGSNDNDTDSAWVDVLTWPWAGEGYGARFLPRIGEVVVIDFFDGNIDRPFVtGRIH	

17978_933	g	HDGGAGSNDNDTDSAWVDVLTWPWAG	E	GYGARFLPRIGE	V	VVIDFFDGNIDRPF	V	GRIH
Ab_1_463		-----						
Ab_2_601		SHDGGAGT	N	NDTDSAW	i	DVLTPWAG	E	GYGARFLPRIGE
17978_1_426		-----L						
17978_914*		SHDGGAGSNDNDTDSAWVDVLTWPWAG	a	GYGARFLPR	v	GEI	V	VVIDFFDGNIDRPF
DSM_932		SHDGGAGSNDNDTDSAWVDVLTWPWAG	a	GYGARFLPR	v	GEI	V	VVIDFFDGNIDRPF
17978_2_395		-----m						
DSM_875		SHDGGAGSNDNDTDSAWVDVLTWPWAG	a	GYGARFLPR	v	GEI	V	VVIDFFDGNIDRPF
Ab_1064		SHDGGAGT	N	NDTDSAWVDVLTWPWAG	E	GYGARFLPRIGE	I	VVIDFFn
DSM_921		SHDGGAGSNDNDTDSAWVDV	v	TPWAG	k	GYGARFLPR	v	GEI
Ab_788		r	HDGGAGSNDNDTDSAWVDVLTWPWAG	E	GYGARFLPRIGE	I	V	VVIDFFDGN
17978_921		SHDGGAGSNDNDTDSAWVDVLTWPWAG	a	GYGARFLPR	v	GEI	V	VVIDFFDGNIDRPF

	541		600
Ab_1104		EAQRs	PTkFDvKGQLPDTKKLSGIRS
DSM_1106		EAQRs	PTkFDvKGQLPaTKKLSGIRS
17978_933		EAQRs	PTkFDvKGQLPDTKKLSGIRS
Ab_1_463		-----	
Ab_2_601		EAQR	PTkFDnKGkLPDTKKLSGIRS
17978_1_426		s	-----llgqGQv
17978_914*		EAERHPTQ	FDQKQQLPDTKKLSGIRSE
DSM_932		EAERHPTQ	FDQKQQLPDTKKLSGIRSE
17978_2_395		EAERq	PTQFDQKQQLPDTKKLSGIRSE
DSM_875		EAERHPTQ	FDQKQQLPDTKKLSGIRSE
Ab_1064		EAQRHPTk	FDnKGkLPDTKKLSGIRS
DSM_921		EAERHPa	QFDQKQQLPDTKKLSGIRSE
Ab_788		EAERHPTQ	FDQKQQLPDTKKLSGIRSE
17978_921		EAERHPa	QFDQKQQLPDTKKLSGIRSE

	601		660
Ab_1104		LGNLSHPK	eqAtSqGRGEGFELRTDaWGA-VRAGKGmLIST
DSM_1106		LGNLSHPK	eqemSqGRGEGFELRTDaWGA-VRAGKGmLIST
17978_933		LGNLSHPK	eqetSqGRGEGFELRTDaWGA-VRAGKGmLIST
Ab_1_463		-----	
Ab_2_601		LGkL	SHPKDKAES
17978_1_426		tarlw	-----WGvfmkpsanqrS
17978_914*		LGNLSHPKDKAES	DGRGEGFELRTDQWGA-VRAGs
DSM_932		LGNLSHPKDKAES	DGRGEGFELRTDQWGA-VRAGs
17978_2_395		LGNLSHPKDKAES	DGRGEGFELRTDQWGA-VRAGs
DSM_875		LGNLSHPKDKAES	DGRGEGFELRTDQWGA-VRAGs
Ab_1064		LGkL	SHPKDKAES
DSM_921		LGNLSHPKDKAES	DGRGEGFELRTDQWGA-VRAGK
Ab_788		LGNLSHPK	eKAESDGRGEGFELRTDQWGA-VRAGs
17978_921		LGNLSHPKDKAES	DGRGEGFELRTDQWGA-VRAGK

	661		720
Ab_1104		lsq	GyesmKmLSEVAakQQTDaLNVINRLPKFIQSLELKT
DSM_1106		lsq	GyesmKmLSEVAakQQTDaLNVINRLPKFIQSLELKT
17978_933		lsq	GyesmKmLSEVAakQQTDaLNVINRLPKFIQSLELKT
Ab_1_463		-----	
Ab_2_601		lEG	sqtNsKALSdiAKNqkTDei
17978_1_426		maka	ltss
17978_914*		IEGGLNNAKAL	SEVAKNQQTDP
DSM_932		IEGGLNNAKAL	SEVAKNQQTDP
17978_2_395		IEGGLNNAKAL	SEVAKNQQTDP
DSM_875		IEGGLNNAKAL	SEVAKNQQTDP
Ab_1064		IEG	sqtNsKALSdiAKNqkTDei
DSM_921		IEG	sLNNAKALSEVAKNQQTDP
Ab_788		ldGn	LNNAKALSdVAKNQQTDP
17978_921		IEGGLNNAKAL	SEVAKNQQTDP

	721		780
Ab_1104		IHALKDCGGFIQ	DIGALGGNAKGVVDEFNSFFSDAK
DSM_1106		IHALKDCGGFIQ	DIGALGGNAKGVVDEFNSFFSDAK
17978_933		IHALKDCGGFIQ	DIGALGGNAKGVVDEFNSFFSDAK
Ab_1_463		-----	
Ab_2_601			-----
17978_1_426		-----	
17978_914*		-----	
DSM_932		-----	
17978_2_395		-----	

DSM_875	-----dMLENiqTFLEvIkqeDPk-----
Ab_1064	-----FsiEgIKdFasQIqg-----
DSM_921	-----FVLENLKnfLEQIEqqDkD-----
Ab_788	-----FhLENLKTFLFQIEEqDqg-----
17978_921	-----FMLENLKTFIEQIEEqDqD-----

	781	840
Ab_1104	LASIKDRIHKNPFFESIQEVGrVLANVETKDFDLMS	TCGTFSKSGSKLEVSPSKALSSSLQGF
DSM_1106	LASIKDRIHKNPFFESIQEVGKVLANVETKDFDLMS	mCGTFSKSGSKLEVSPSKALSSSLQGF
17978_933	LASIKDRIHKNPFFESIQEVGKVLANVETKDFDLMS	TCGTFSKSGSKLEVSPSKALSSSLQGF
Ab_1_463	-----	-----
Ab_2_601	-----	-----
17978_1_426	-----	-----
17978_914*	-----	-----
DSM_932	-----	-----
17978_2_395	-----	-----
DSM_875	-----	-----
Ab_1064	-----	-----
DSM_921	-----	-----
Ab_788	-----	-----
17978_921	-----	-----

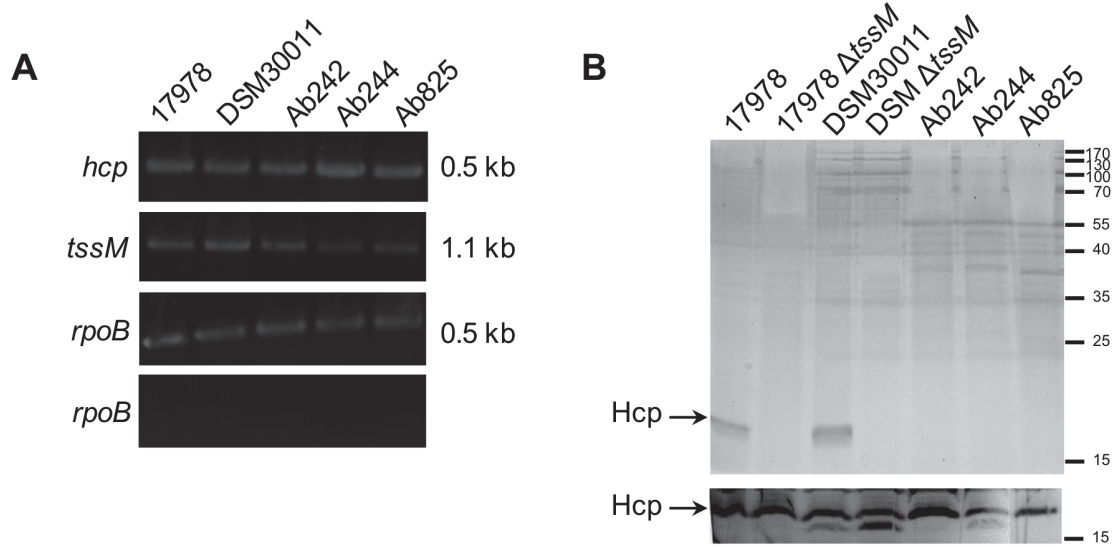
	841	900
Ab_1104	MEGYTQGLESSSDTKQQEgqkiFrQALMLLASPNgIALttpEnIilqAsqdiaeSAsgSI	
DSM_1106	MEGYTQGLESSSDTKQQEgqkiFrQALMLLASPNgIALttpEnIilqAsqdiaeSAsgSI	
17978_933	MEGYTQGLESSSDTKQQEgqkiFrQALMLLASPNgIALttpEnIilqAsqdiaeSAsgSI	
Ab_1_463	-----	-----
Ab_2_601	-----qiAkFekALiLLsSPdgIALsSsEDIHISADaQINQiAGDSI	
17978_1_426	-----vLmtFqaksvpSy-----	
17978_914*	-----KAAaFKQALMiLtaPNSIALASNEDIHLSADGQLNQtAGDSI	
DSM_932	-----KAAaFKQALMiLtaPNSIALASNEDIHLSADGQLNQtAGDSI	
17978_2_395	-----KAAeFqsAvMLLASFPkSIAvsSNEDIHLSAnGQLtQSAGDSI	
DSM_875	-----KAAeFqsAvMLLASFPkSIAvsSNEDIHLSAnGQLtQSAGDSI	
Ab_1064	-----qiAkFekALiLLsSPdgIALsSsEDIHISADaQINQiAGDSI	
DSM_921	-----KAAvFKQAIvLsaPNSVAiASNEDIHLSADGQLsQSAGDSI	
Ab_788	-----KAAaFKQALMvLtaPNSIALASNEDIHLSADGQLsQtAGDSI	
17978_921	-----KAAaFKQALMvLtaPNSIAvASNEDIHLSADGQLsQnAGDSI	

	901	960
Ab_1104	NLSaQKNIigHAQdKISLFAAQkGlsafAAKGpIkVQAQteGieIlsRKNIkILSVEDKI	
DSM_1106	NLSaQKNIigHAQdKISLFAAQkGlsafAAKGpIkVQAQteGieIlsRKNIkILSVEDKI	
17978_933	NLSaQKNIigHAQdKISLFAAQkGlsafAAKGpIkVQAQteGieIlsRKNIkILSVEDKI	
Ab_1_463	-----	-----
Ab_2_601	NiSTQKNVIAHAQNrlSLFAAQsGklkavAAqGKVEIQAQsDalDvlAnKGITIsSTEDCI	
17978_1_426	-----KvampqAs-----	
17978_914*	NLSTQKNLIHAQNKISLFAAQGGARLYAgKGKVEIQAQGDGADLIARKavQvISTEDKI	
DSM_932	NLSTQKNLIHAQNKISLFAAQGGARLYAgKGKVEIQAQGDGADLIARKavQvISTEDKI	
17978_2_395	NmSTQKNIVnHASqKISLFAAQEGARLfaGKGKVEIQAQGDGLDvIARKGIQITSTEDtv	
DSM_875	NmSTQKNIVnHASqKISLFAAQEGARLfaGKGKVEIQAQGDGLDvIARKGIQITSTEDtv	
Ab_1064	NiSTQKNVIAHAQNrlSLFAAQsGklkavAAqGKVEIQAQaDalDvlsklGITIsSTEDKI	
DSM_921	NLSTQKNLIHAQNKISLFAAQGGARLYAgnGKVEIQAQaDADLIARKGIQITSTEDRI	
Ab_788	sLSTQKNLIHAQNKISLFAAQGGARLYAAKGKLEvQAQGe-----	
17978_921	sLSTQKNLIHAQNKISLFAAQGGARLYAgKGKVEIQAQGDGADLIARKGIQITSTEDKI	

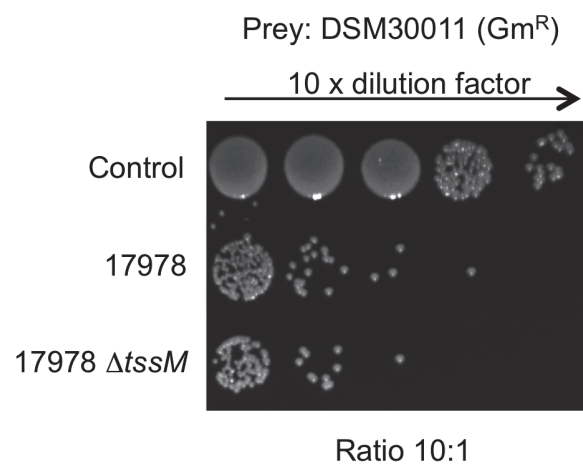
	961	1020
Ab_1104	EIVggKEIIVLnAGGSQltIsdkGvFinTprlFhaKAGQHkFdaGaiINysfPnLPs----	
DSM_1106	ELTSPKEIIVLTAGGSQlKINanGvFstTGGKFEsKAGQHLFtsGatVNaelPkMpe---t	
17978_933	ELTSPKEIIVLTAGGSQlKINanGvF-----	
Ab_1_463	-----	-----
Ab_2_601	EISsPKEIIVITgasSQItlNGSGIFPkTGGKFqVnAGQHvFqGGASasvqsslpPp-pKr	
17978_1_426	-----	-----
17978_914*	EaTaaKEIIVLTAGGSQVKItGSGIFmtTsGKFEVKAGQHLMGGgSVNsslPyLPe--qgk	
DSM_932	EaTaaKEIIVLTAGGSQVKItGSGIFmtTsGKFEVKAGQHLMGGgSVNsslPqLPe--ae	
17978_2_395	fITSPTeInLTAnGSQVKlNGSGIFPVTTGGKLEVKAGQHLMFGGegVt-----pPkkqEn	
DSM_875	yITSPTeInLTAnGSQVKlNGSGIFPVTTGGKLEVKAGQHLMFGGSsINppaldLP----	
Ab_1064	iIsSPKEvkiTgGsSQItlNGSGIFPkTGGKFqVnAGQHLMFAGASaNagaFeLPk-aKp	
DSM_921	EITasKEvViTsGGsQIKINsSGIFPVTTGGKFEVKAGQHLFtsGASVsantPqLPvlgEl	
Ab_788	-----KslIvsvf-----QrLykG-----	
17978_921	EInasKEIIVITsGGsQIKINsSGIFPVTTGGKFEVKAGQHvFMGGAkadyv1PsLPt-qEi	

Ab_1104	-myygnFnitDknnnpig-GqKYkmtlp-sGKeilGftDeNGntvtgtysgednqnIklEi
DSM_1106	gmysMrFdlsqifdtkilknmEYklinhskkieavyefeqessARVysdsvdnveLal--
17978_933	-----
Ab_1_463	-----
Ab_2_601	vqgvLelfheyahGefvK-GgsYrVvdn-fGKevtGkLDdkGfAKVsglatGavKvfFEs
17978_1_426	-----
17978_914*	qkygvwFdvmDkqGnklKpGtEYiIFdehdKierGkLDrtGlvKL-----
DSM_932	npfvLqYlvkNkenqvms-ekpYilldd-eGnihrGttDkdGfmKL-----
17978_2_395	kpcyLtfEitDldGkpaK-nvEYiaFrm-dGsrqkGqtnagGltQr-----
DSM_875	-----dcsakqtqaaqNGsAKVdls-----
Ab_1064	mqgaLellrsyggdnfFK-qnsYkVids-lGKqitGkLDgNGfAQVtgiapGpAKvvvFEk
DSM_921	nqhnLrYllkDkeGipFa-hhKYiaFmp-nGKkleGitDeNGytQL-----
Ab_788	-----
17978_921	ktddLlleylhdGtpvK-GaDYeVlls-dGsirkGkLDasGkAiVsgvpaGrAKiqYge
1081	
Ab_1104	-----iedlyqdiwyqpnstyEyet
DSM_1106	-----vpgvylteikeliseqEaes
17978_933	-----dnrw-----
Ab_1_463	-----
Ab_2_601	DHrdpWdtASDFKRpveWpnkndAdseqsdSllaqMSKtagsklgelskqltnptnimkn
17978_1_426	-----
17978_914*	-----eteepnkqyKihv
DSM_932	-----kttasqrittrvmnmEieq
17978_2_395	-----fetdgseqisihidenask
DSM_875	-----
Ab_1064	DNTsaWlqSSDFKRnytwAepvkSvqglmkNaLeaVgqntmsqlqnnllstdknsfKnlq
DSM_921	-----iktvrpeeisihlynnEein
Ab_788	-----
17978_921	Dq-----SKdefpalevddwftqlgsstktg
1141	
Ab_1104	iDdlElpvnfdkEvdEde-----
DSM_1106	lDdeDidscgcgEehEhd-----
17978_933	-----
Ab_1_463	-----
Ab_2_601	iqtaqsiksegaKalmpmLktqAqglVtdQVksfLpisEagqkignSieltSiqKMndfn
17978_1_426	-----
17978_914*	vn-----
DSM_932	aDeeEagtee-----
17978_2_395	yklaakg-----
DSM_875	-----
Ab_1064	kntLlnlagqtvaqiKngVtntAlntVSkQLnlnIsadOmkslgqmAtnpSqsLEmlkeq
DSM_921	iD-----
Ab_788	-----
17978_921	kEe-----
1201	
Ab_1104	-----
DSM_1106	-----
17978_933	-----
Ab_1_463	-----
Ab_2_601	ksgsLdgnslnvnnLlhqylqSPfKKNS-----
17978_1_426	-----
17978_914*	-----
DSM_932	-----
17978_2_395	-----
DSM_875	-----
Ab_1064	ggdfLsdqmtaklSskstnqdSPiQQGAldtfvrskk
DSM_921	-----
Ab_788	-----
17978_921	-----

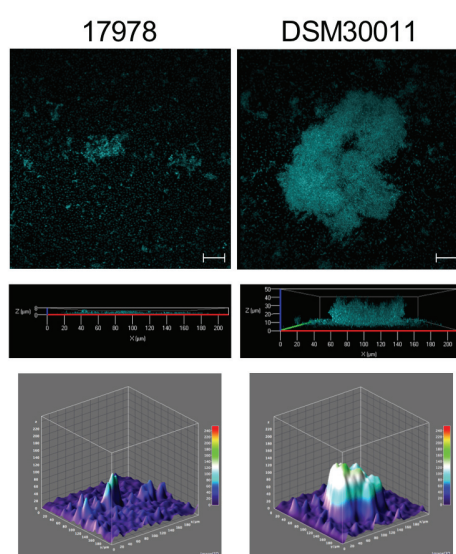
S1 Fig.



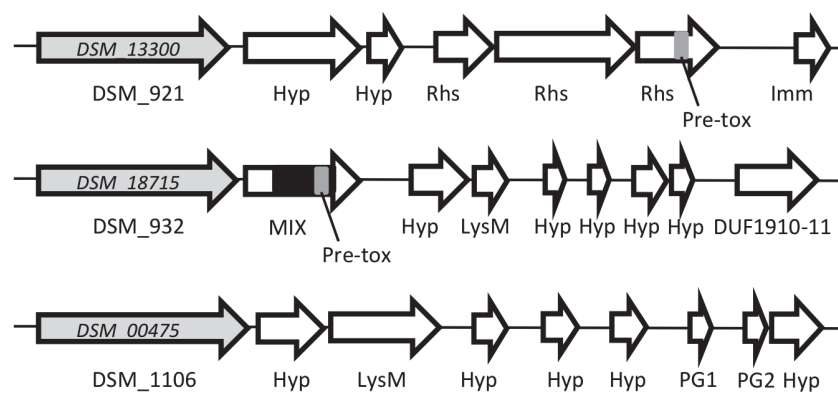
S2 Figure



S3 Figure



S4 Figure



S5 Figure

S1 Table. Strains and plasmids included in this study.

Designation	Relevant characteristics	Reference or source
Strains		
<i>A. baumannii</i>		
ATCC17978	Reference strain	ATCC
17978 $\Delta tssM$	ATCC17978 isogenic derivative <i>tssM</i> unmarked deletion mutant	This study
17978 mini-CTX1	ATCC17978 carrying a chromosomal insertion of mini-CTX1 conferring tetracycline resistance.	This study
DSM30011		ATCC
DSM30011 $\Delta tssM$	DSM30011 isogenic derivative <i>tssM</i> deletion mutant, marked with an apramycin resistance cassette	This study
DSM30011 $\Delta tssM$ <i>ptssM</i>	DSM30011 $\Delta tssM$ complemented strain	This study
DSM30011 mini-Tn7	DSM30011 carrying a chromosomal insertion of mini Tn7 conferring gentamycin resistance.	This study
Ab242	Clinical isolate	[1]
Ab244	Clinical isolate	[1]
Ab825	Clinical isolate	[1]
<i>E. coli</i>		
DH5 α	intermediate host for cloning and nalidixic acid resistant prey in bacterial competition assays. In some cases this strain contained a plasmid carrying apramycin cassette	[2]
<i>P. aeruginosa</i>		
PAK	prey in the bacterial competition assays.	[3]
PAK <i>retS</i>	<i>retS</i> mutant used as prey in the bacterial competition assays	[3]
PA14	prey in the bacterial competition assays and positive control in cell death experiments	
PA7	prey in the bacterial competition assays	[4]
<i>K. pneumoniae</i>		
52145	prey in the bacterial competition assays	[5]
Plasmids		
pGEM [®] -T Easy		Promega
pGEM-2.1	pGEM [®] -T Easy derivative carrying 2 kb upstream and downstream regions of DSM30011 <i>tssM</i> gene	This study
pGEM-2.2	pGEMT-2.1 derivative with DSM30011 <i>tssM</i> gene flanking regions interrupted by an apramycin resistant cassette	This study
pEX100T/Kan	pEX100T derivative carrying a kanamycin resistant cassette	[6]
pEX-TssM17	pEX100T/Kan derivative carrying 0.5 kb upstream and downstream regions of 17978 <i>tssM</i> gene	This study
pX5K	derivative of the RSF1010-derived plasmid pMM2017-Kan14	[7]
pTssM	pX5K derivative carrying DSM30011 <i>tssM</i> gene under the control of a constitutive promoter	This study

pMini Tn7	Used to insert gentamycin resistance into the chromosome for bacterial competition assays	[8]
pMini CTX1	Used to insert tetracyclin resistance into the chromosome for bacterial competition assays	[9]

1. Mussi MA, Limansky AS, Viale AM (2005) Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 1432–1440. doi:10.1128/AAC.49.4.1432-1440.2005.
2. Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557–580.
3. Moscoso JA, Mikkelsen H, Heeb S, Williams P, Filloux A (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP signalling. *Environ Microbiol* 13: 3128–3138. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02595.x.
4. Cadoret F, Ball G, Douzi B, Voulhoux R (2014) Txc, a new type II secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA7, is regulated by the TtsS/TtsR two-component system and directs specific secretion of the CbpE chitin-binding protein. *J Bacteriol* 196: 2376–2386. doi:10.1128/JB.01563-14.
5. March C, Moranta D, Regueiro V, Llobet E, Tomás A, et al. (2011) *Klebsiella pneumoniae* outer membrane protein A is required to prevent the activation of airway epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 286: 9956–9967. doi:10.1074/jbc.M110.181008.
6. Schweizer HP, Hoang TT (1995) An improved system for gene replacement and xyle fusion analysis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 158: 15–22.
7. Segal G, Shuman HA (1998) Intracellular multiplication and human macrophage killing by *Legionella pneumophila* are inhibited by conjugal components of IncQ plasmid RSF1010. *Mol Microbiol* 30: 197–208.
8. Choi K-H, Schweizer HP (2006) mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Protocols* 1: 153–161. doi:10.1038/nprot.2006.24.
9. Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, Schweizer HP (1998) A broad-host-range FLP-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212: 77–86.

S2 Table. Primers used in this study

Name	Sequence (5' to 3')	Restriction site
17UpF	CTGTTATCCCTACCCGGGGCATTTCCTGAACATATCG	SmaI
17UpR	GCTCTTTACGCTGTGCACTATCCTCATATAGTGCTGCGTTCC	-
17DoF	GATAGTGCACAGCGTAAAGAGC	-
17DoR	TAACAGGGTAATCCCGGGCATGTTCTTGTGGATTTCG	SmaI
17ChUp	GGATGGTCAAAGATTATATTCC	-
17ChDo	CACATTACGTTTCAGATAAAACC	-
DSMUpF	CGATACCCGGGGTTGAGTTGTATTTTAAGC	SmaI
DSMUpR	CTGGATATCGAGTTTTGGCAGGATCAGCTGCCCTATTCTCGTTC TAAGTTCAAAG	EcoRV
DSMDoF	GGCAGCTGCTCCTGCCAAAACCTGGATATCCAGTTTCTGC	EcoRV
DSMDoR	CGATACCCGGGGATAATGAATCATTTACTCTTGC	SmaI
ApraF	GCATCGATATCATCAAGGCCCGATCCTTGGAGCCCTTG	EcoRV
ApraR	GCATCGATATCTCATGAGCTCAGCCAATCGACTGG	EcoRV
CTssMF2	ATATGGATCCATGCATACAATTTTAGGCTACTTGTGGCAG	BamHI
CTssMR2	ATATGGATCCTCATGGCTTAAC TCCCGCAGCAG	BamHI
T6ChUp	ATGCATGGGTCGATCCAAATAGCG	-
T6ChDo	GTAACAACCCAATTAATACTTTCGG	-
HcpF	GAAAGATATATACGTTGAGTTTCG	-
HcpR	CTGCGTAAGAAGCTGTATTATTAG	-
TssMF	GCAAAGACGTCTACAACAGTTAGAC	-
TssMR	TTGCTGATCATCACGTTTACGAAC	-
16SF	GTGAGTAATGCTTAGGAATCTG	-
16SR	CATACTCTAGCTCACCAGTATC	-

S3 Table. T6SS locus genes in *A. baumannii* strains under study.

	DSM30011		ATCC17978			Ab242/244/825	
Protein Description	Locus	Length (AA)	Locus	Accession	Length (AA)	Locus	Length (AA)
Conserved hypothetical (Signal peptide)	11700*	229	A1S_1292	YP_001084322	230	Ab244_01	230
TssB	11695	167	A1S_1293	YP_001084323	49	<i>tssB</i>	167
			A1S_1294	YP_001084324	79		
TssC	11690	493	A1S_1295	YP_001084325	443	<i>tssC</i>	493
TssD/Hcp	11685	167	A1S_1296	YP_001084326	167	<i>hcp</i>	167
TssE	11680	158	A1S_1297	YP_001084327	158	<i>tssE</i>	158
TssF	11675	603	A1S_1298	YP_001084328	185	<i>tssF</i>	603
			A1S_1299	YP_001084329	231		
TssG	11670	332	A1S_1300	YP_001084330	298	<i>tssG</i>	332
Putative membrane protein	11665*	470	A1S_1301	YP_001084331	421	Ab244_02	470
TssM	11660	1274	A1S_1302	YP_001084332	1041	<i>tssM</i>	1274
			A1S_1303	YP_001084333	188		
TagF	11655	319	A1S_1304	YP_001084334	275	<i>tagF</i>	319
TagN	11650	255	A1S_1305	YP_001084335	209	<i>tagN</i>	255
PAAR domain containing-protein	11645	87	A1S_1306	YP_001084336	87	Ab244_03	87
TssH/ClpV domain	11640	892	A1S_1307	YP_001084337	896	<i>tssH</i>	896
TssA	11635	364	A1S_1308	YP_001084338	273	<i>tssA</i>	364
TssK	11630	454	A1S_1309	YP_001084339	388	<i>tssK</i>	454
TssL	11625	268	A1S_1310	YP_001084340	268	<i>tssL</i>	268
Hypothetical protein	11620*	200	A1S_1311	YP_001084341	85	Ab244_04	200
Putative D-Ala D-Ala Carboxypeptidase	11615*	317	A1S_1312	YP_001084342	127	Ab244_05	317

* genes detected only in species of the genus *Acinetobacter*

S4 Table. Putative VgrG proteins encoded by the *A. baumannii* strains under study.

Strain	VgrG protein (aa length)	Locus or GenBank accession number
DSM30011	932	KT334325
	875	KT334328
	1106	KT334326
	921	KT334327
ATCC17978	933	A1S_3364
	426 ^a	A1S_1288
	395 ^b	A1S_1289
	914*	A1S_0082
	921	A1S_0550
Ab244	788	AKR15126
	1104	AKR15129
	463 ^a	AKR15122
	601 ^b	AKR15123
	1064	AKR15127

^aProteins encoding VgrG N-terminal domain only.

^bProteins encoding VgrG C-terminal domain only.

*Annotated as a pseudogene .

Chapitre 2

Le second objectif de ma thèse consiste à comprendre les mécanismes de virulence des souches cliniques d'Ab. Nous avons ainsi élargi notre étude aux souches cliniques hypervirulentes récemment isolées.

La souche 5075 est une souche clinique MDR isolée en 2008 lors d'une ostéomyélite dans un hôpital militaire aux Etats-Unis [197]. Le séquençage de son génome et son analyse a montré qu'elle appartient à l'IC I, l'un des trois clones à l'origine de la majorité des épidémies au niveau mondiale. La comparaison entre la souche 5075 et d'autres souches cliniques dont deux autres souches appartenant à l'IC II, montre qu'Ab 5075 est la souche la plus virulente chez *G. mellonella* et présente le taux de mortalité le plus important lors de l'infection pulmonaire d'un modèle murin [197]. La haute virulence de la souche 5075 ainsi que la disponibilité d'outils génétiques fait d'elle un bon modèle pour l'étude de la virulence d'Ab.

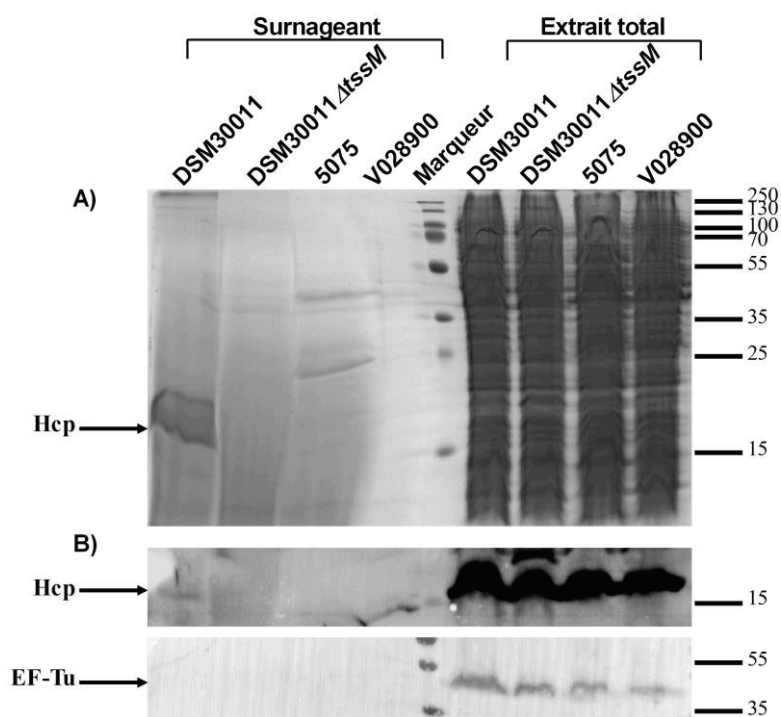
La souche V028900, dont l'étude se fait en collaboration avec Paul Higgins et Harald Seifert (Université de Cologne, Allemagne), a été isolée lors d'un épisode infectieux dans un hôpital à Frankfurt. Tous les patients infectés par cette souche sont décédés et parmi eux, un patient dont le pronostic vital n'était pas engagé à son entrée à l'hôpital. L'analyse du génome de cette souche indique qu'elle fait partie de l'IC4 ou ST15. Les souches appartenant au ST15 sont des clones épidémiques répandus au niveau international avec une grande capacité de persistance dans l'environnement hospitalier [82,83]. La souche V028900 présente une virulence importante chez les patients et constitue un autre clone international dans notre étude.

Dans l'ensemble de ce travail, la souche 17978 sera désignée comme la souche de référence tandis que la souche DSM30011 sera désignée comme la souche environnementale et enfin les souches 5075 et V028900 seront désignées comme les souches hypervirulentes.

Nous nous intéressons donc à la comparaison entre la souche de référence, la souche environnementale et les souches hypervirulentes dans le but de découvrir ce qui caractérisent l'hypervirulence des nouvelles souches cliniques.

Présence d'un SST6 inactif chez les souches cliniques hypervirulentes

D'après les données de notre précédente étude et celles de la littérature, Ab possède un SST6 sans que ce dernier ne soit actif chez toutes les souches [195,198]. Lorsqu'il est fonctionnel, il joue un rôle dans la virulence d'Ab *in vivo* (Chapitre 1 de la Partie II. Résultats, Figure 7 [198]). Nous avons donc évalué si ces nouvelles souches hypervirulentes possèdent un SST6 actif dans les mêmes conditions que celles utilisées lors de l'étude précédente. Après avoir préparé les échantillons cytoplasmiques et les surnageants des souches DSM30011, de son mutant pour le SST6, et des souches hypervirulentes nous avons effectué un gel SDS-Page et un Western Blot afin de détecter la protéine Hcp. Sa présence dans le surnageant témoigne d'un SST6 actif [198].



Nous avons d'abord vérifié la qualité de nos préparations et notamment l'absence de lyse bactérienne pouvant conduire à la contamination des surnageants par la fraction cytosolique. Nous observons la présence d'EF-Tu dans l'extrait totale des quatre souches tandis qu'EF-Tu est absente dans les surnageants (Figure 13B, panel du bas). La protéine EF-Tu étant présente dans le cytosol des bactéries mais n'étant pas sécrétée, nous pouvons conclure que les surnageants ne sont pas contaminés par la fraction cytosolique.

Comme nous l'avons déjà montré, Hcp est retrouvée dans le surnageant de la souche DSM30011 tandis qu'elle est absente dans le surnageant de son mutant du SST6. Néanmoins, Hcp est présente dans l'extrait total de ces deux souches (Chapitre 1 de la Partie II. Résultats, [198]). Nous observons par Bleu de Coomassie et Western Blot que les souches 5075 et V028900 ne sécrètent pas Hcp (Figure 13A) bien qu'elle soit présente au niveau cytoplasmique (Figure 13B, panel du haut).

Ces données indiquent que ces souches ne possèdent pas un SST6 actif dans les conditions de culture testées.

Analyse de la virulence des souches hypervirulentes dans le modèle d'infection *G. mellonella*

Nous avons ensuite évalué la virulence de ces deux nouvelles souches dans un modèle *in vivo*. Pour cela, nous avons inoculé *G. mellonella* avec 1×10^6 CFU ou $1,5 \times 10^6$ CFU des souches 17978, 5075 et V028900. Nous observons que les souches hypervirulentes tuent plus efficacement *G. mellonella* et ce quel que soit la concentration de l'inoculum utilisée (Figure 14).

L'infection des larves avec un inoculum de 1×10^6 CFU, le taux de mortalité est de 50% après 86h pour les larves infectées par la souche V028900 tandis qu'il est de 50% après 48h chez celles infectées par la souche 5075 (Figure 14A).

La souche V028900 présente un phénotype intermédiaire entre celui des souches 5075 et 17978 (Figure 14B). Lors d'infections à un inoculum plus élevé, le taux de mortalité est de 50% après 44h et de 100% après 100h d'infection pour les larves infectées par la souche V028900. Il est de 50% après 29h et de 100% après 44h pour celles infectées par la souche 5075. La souche 17978 entraîne un taux de mortalité de 31% après 100h d'infection, significativement différent de celui des deux autres souches.

Pour chacune de ces expériences, un groupe contrôle de larves a subi une injection de PBS dans les mêmes conditions que celles de l'infection par Ab. Aucune mortalité n'a été observée (données non montrées).

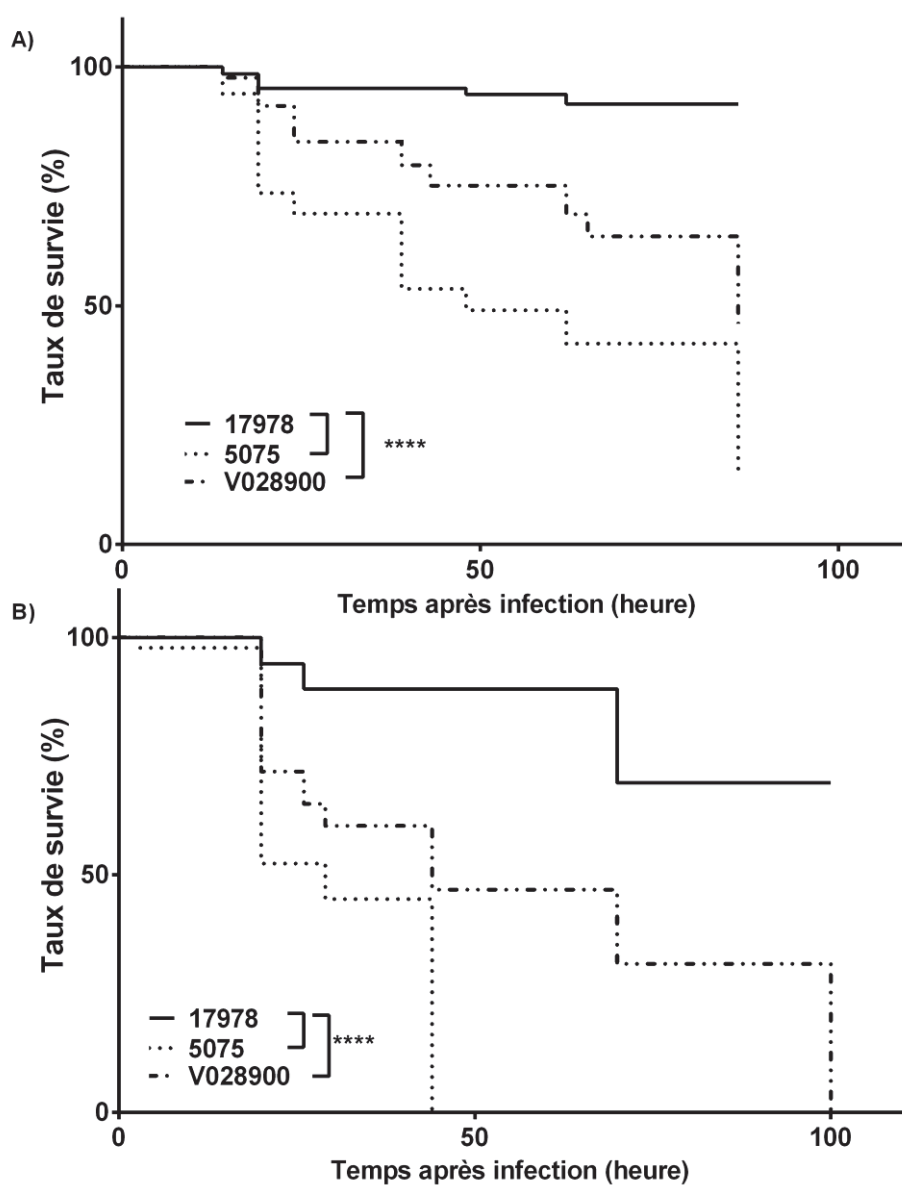


Figure 14. Courbe de survie des *G. mellonella* infectées par Ab.

A) Courbe de survie des *G. mellonella* au cours du temps infectées avec un inoculum de 1×10^6 CFU et B) avec un inoculum de $1,5 \times 10^6$ CFU. Test statistique de Mantel-Cox **** $P < 0,0001$.

Pour conclure, les deux souches cliniques 5075 et V028900 sont plus virulentes dans le modèle d'infection *G. mellonella* que la souche de référence 17978. Cependant, la souche V028900 présente un niveau de virulence inférieur à celui de la souche 5075.

Analyse de la capacité d'adhésion des souches d'Ab aux cellules épithéliales humaines

Après avoir constaté une différence de virulence *in vivo* entre les souches nous avons analysé la capacité des souches hypervirulentes à adhérer aux cellules hôtes, une étape clef de la pathogénicité d'Ab.

La majorité des infections à Ab sont associées au système respiratoire, c'est pourquoi nous avons choisi d'infecter un modèle *in vitro* de cellules épithéliales pulmonaires humaines, les cellules A549 issues d'un adénocarcinome. Elles forment des monocouches présentant les caractéristiques de cultures primaires de pneumocytes de type II du poumon [218] et sont largement utilisées dans la littérature pour l'étude d'Ab [103, 113, 121] .

Les études montrent que la souche 17978 adhère aux cellules épithéliales [101,102,113]. En revanche, malgré un nombre croissant d'études portant sur la souche 5075 aucune donnée n'est disponible sur sa capacité d'adhésion aux cellules eucaryotes [79,110,197,219,220]. Il en est de même pour la souche DSM30011, quant à la souche V028900 elle est utilisée, ici, pour la première fois dans la littérature.

Après une heure d'infection à différentes multiplicités d'infection (MOI) de 1, de 10 et de 100, nous constatons que toutes les souches ont la capacité d'adhérer aux cellules A549 (Figure 15). Toutefois pour chacune d'elles, seule une faible proportion de bactéries adhère aux cellules eucaryotes par rapport à l'inoculum utilisé pour l'infection (Figure 15). De manière surprenante, l'adhésion des souches cliniques hypervirulentes à une MOI de 1 est significativement plus faible que celle des souches 17978 et DSM30011 (Figure 14A). La même tendance est observée à une MOI de 10 (Figure 14B). A une MOI 100, les souches hypervirulentes adhèrent en proportion équivalente aux cellules épithéliales par rapport à la souche 17978. Seule la souche DSM30011 adhère davantage aux cellules eucaryotes (Figure 15C).

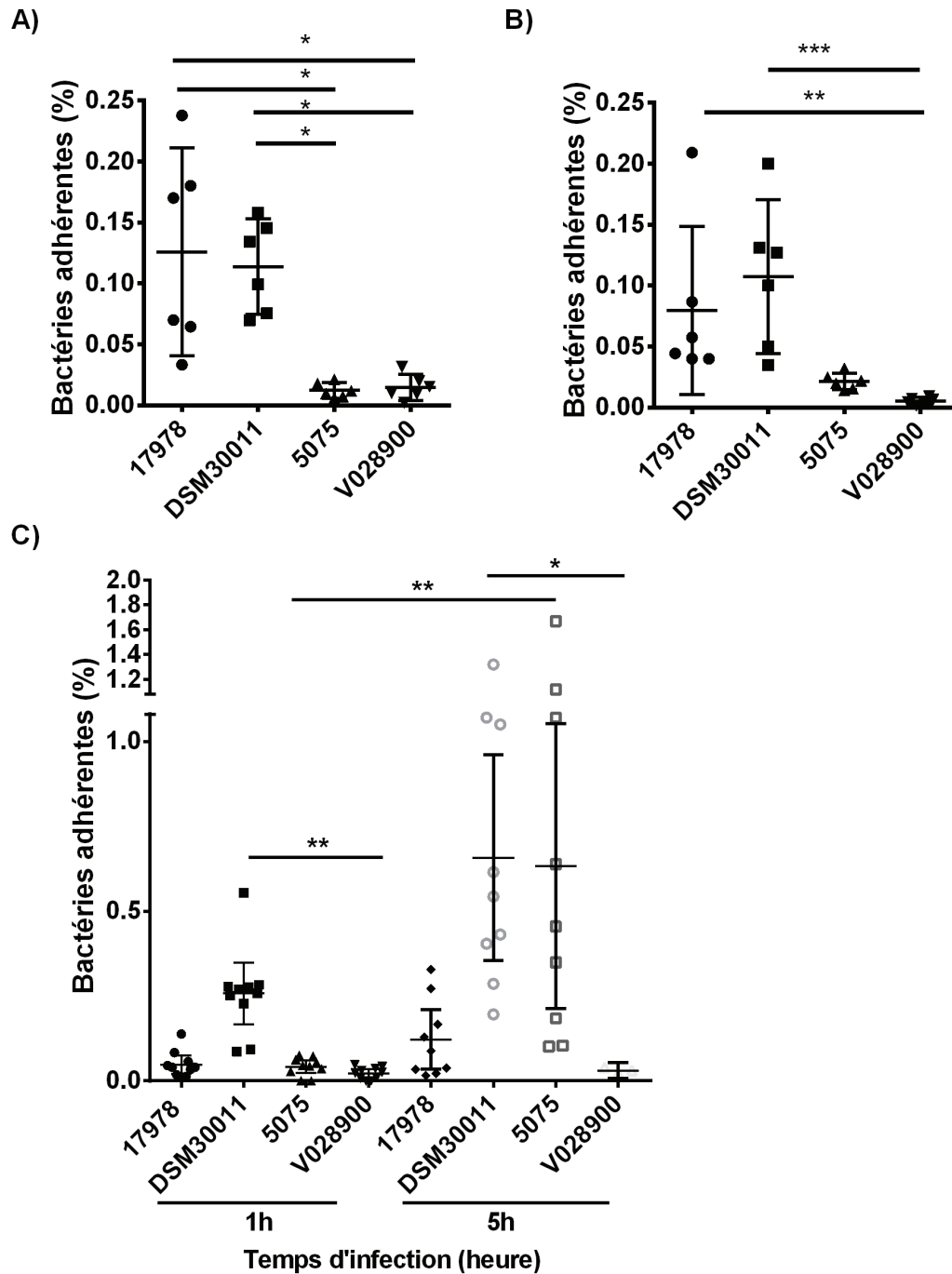


Figure 15. Analyse du pourcentage d'adhésion des différentes souches d'Ab aux cellules épithéliales pulmonaires.

Adhésion des différentes souches d'Ab aux cellules A549 après 1h d'infection à A) une MOI de 1 et B) à une MOI de 10 exprimée en pourcentage d'adhésion. C) Adhésion des différentes souches d'Ab aux cellules A549 après 1h ou 5h d'infection à une MOI de 100 exprimée en pourcentage d'adhésion. Le pourcentage d'adhésion est calculé comme le nombre de bactéries adhérant aux cellules A549 par rapport à l'inoculum de bactéries utilisé pour infecter les cellules A549. Les différences significatives d'adhésion sont indiquées par des astérisques avec un test de Kruskal-Wallis. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; l'absence de statistique indique que les différences sont non significatives.

Dans la littérature, le temps de contact utilisé lors des tests d'adhésion d'Ab peut varier d'1h à 24h selon les études [102,106,121]. Nous avons donc infecté nos cellules durant 5h à une MOI de 100 pour permettre un temps de contact plus important entre Ab et les cellules pulmonaires (Figure 15C). En augmentant le temps de contact seule la souche 5075 adhère davantage aux cellules eucaryotes.

La souche DSM30011 étant la seule à posséder un SST6 actif, nous avons donc recherché si celui-ci pouvait contribuer à l'adhésion aux cellules eucaryotes. Pour cela, nous avons utilisé les souches DSM30011 Δ tssM possédant un SST6 inactif et sa souche complémentée DSM30011 Δ tssMptssM ayant donc un SST6 fonctionnel [198]. Nous avons effectué un test d'adhésion à une MOI de 1 et de 10 et nous n'avons pas observé de différence dans la capacité d'adhésion aux cellules épithéliales pulmonaires entre la souche sauvage, le mutant et la souche complémentée (Figure 16). Le SST6 n'est pas impliqué dans l'adhésion de la souche DSM30011 aux cellules hôtes dans nos conditions d'expérience.

En conclusion, toutes les souches adhèrent aux cellules eucaryotes. La virulence accrue des souches V028900 et 5075 observée *in vivo* ne s'explique pas par une augmentation de la capacité d'adhésion. Aucune différence d'adhésion aux cellules eucaryotes après une heure d'infection n'a été observée. En revanche, un temps de contact plus important permet à la souche 5075 d'adhérer davantage.

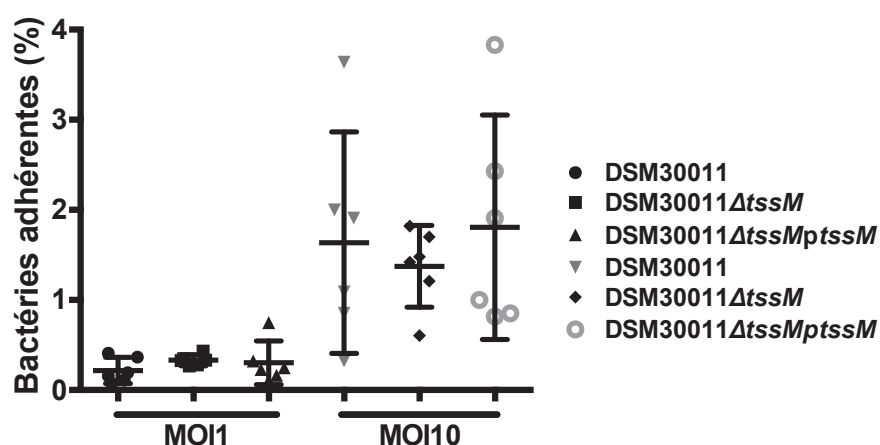


Figure 16. Aucun effet du SST6 d'Ab sur l'adhésion aux cellules épithéliales pulmonaires.

Adhésion des souches DSM30011, de la souche mutante du SST6 (DSM30011 Δ tssM) et de la souche complémentée (DSM30011 Δ tssMptssM) aux cellules A549 après 1h d'infection à une MOI de 1 et 10 exprimée en pourcentage d'adhésion. Les différences statistiques ont été calculées avec un test Anova, aucune différence entre les souches à MOI1 ou à MOI10.

Observation par microscopie de l'adhésion d'Ab aux cellules épithéliales humaines

Les tests d'adhésion indiquant qu'Ab est capable d'adhérer aux cellules eucaryotes (Figure 15), nous avons voulu confirmer ces résultats par microscopie. Dans un premier temps, seule les souches 17978 et DSM30011 étaient visible par microscopie. Pour celles-ci, nous possédions un anticorps les reconnaissant et des souches portant un plasmide codant la GFP. Les cellules épithéliales pulmonaires humaines ont été fixées après avoir été infectées par les souches 17978 et DSM30011 dans les mêmes conditions que celles utilisées lors des tests d'adhésion. Pour localiser Ab au sein de l'environnement cellulaire par microscopie confocale, nous avons marqué d'une part le cytosquelette d'actine et le noyau des cellules infectées et d'autre part les bactéries (Figure 17). La réalisation de « z-stack » consistant à générer plusieurs images d'une même région à différents plans z nous a permis de reconstruire des images en trois dimensions. Grâce à ces différentes reconstructions, nous observons que les bactéries sont attachées à la membrane cellulaire (Figure 17B et 17D). Les images de microscopie confocale confirment que la souche 17978 (Figure 17A-B) et la souche DSM30011 (Figure 17C-D) adhèrent aux cellules.

Les souches cliniques V028900 et 5075 ne sont pas reconnues par l'anticorps utilisé pour les autres souches et les résistances aux antibiotiques portées par les plasmides GFP que nous avons sont présentes naturellement chez ces souches. Plusieurs stratégies pour obtenir des souches 5075 et V028900 fluorescentes ont été mises en place sans succès (voir Annexe 2). Ainsi, nous avons produit de nouveaux anticorps chez le lapin, dirigés contre les deux souches cliniques hypervirulentes 5075 et V028900. Nous avons confirmé par microscopie, à l'aide des nouveaux anticorps, que les souches cliniques adhèrent à la surface des cellules A549 (données non montrées).

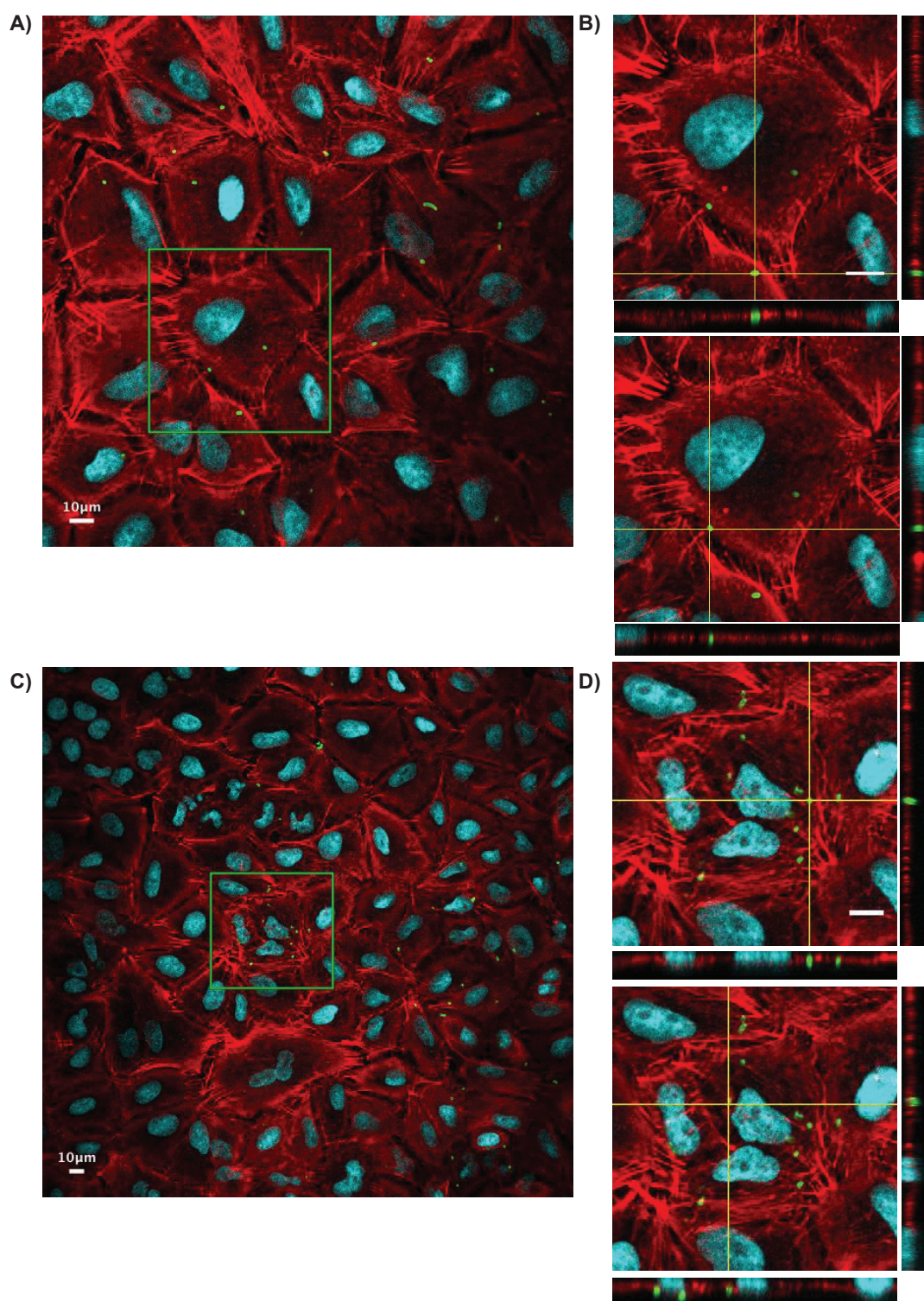


Figure 17. Visualisation de l'adhésion des souches 17978 et DSM30011 d'Ab aux cellules épithéliales pulmonaires humaines.

A-B) Image de microscopie confocale montrant l'adhésion des souches 17978 C-D) et DSM30011. A et C) Images représentant un plan xy ou B et D) montrant un agrandissement de cellules infectées par 17978 ou DSM30011 dans un plan xy et les projections orthogonales xz et yz. Les bactéries sont représentées en vert, l'actine en rouge et le noyau en cyan. Echelle 10 µm.

Analyse de la capacité de perturbation de la monocouche cellulaire par Ab

La perturbation de la monocouche peut permettre à un pathogène le passage de la barrière épithéliale pour coloniser d'autres organes ou rejoindre la circulation sanguine. Par exemple, *Helicobacter pylori* entraîne une perturbation de la monocouche cellulaire visible par une baisse de sa polarisation et l'altération dans la localisation de protéines impliquées dans les jonctions cellulaires [221,222]. *P. aeruginosa* sécrète LasB un effecteur permettant le clivage de protéines impliquées dans les jonctions cellulaires qui joue un rôle dans la dissémination de *P. aeruginosa in vivo* [223]. Ces aspects n'ont pour le moment pas été étudiés chez Ab.

Pour évaluer la capacité des différentes souches d'Ab à perturber et à traverser une monocouche, nous avons utilisés des cellules épithéliales pulmonaires humaines Calu3. Ces cellules forment une monocouche cellulaire polarisée alors que les cellules A549 en sont incapables [224,225]. La monocouche polarisée forme une barrière entre le compartiment apical et basolatéral avec un potentiel de membrane défini. L'évaluation de son intégrité peut se faire par deux méthodes différentes, soit par la mesure de la résistance transépithéliale électrique qui la parcourt (TER), soit par la mesure du passage passif d'une molécule fluorescente du côté apical au côté basolatéral. Les cellules Calu3 ont déjà été utilisées pour l'étude d'autres pathogènes tels que *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Chlamydia pneumoniae* [224,226,227]. Ce modèle permet de se rapprocher de l'environnement propre à celui du système respiratoire et de mimer les caractéristiques physiologiques de la barrière épithéliale pulmonaire [228,229].

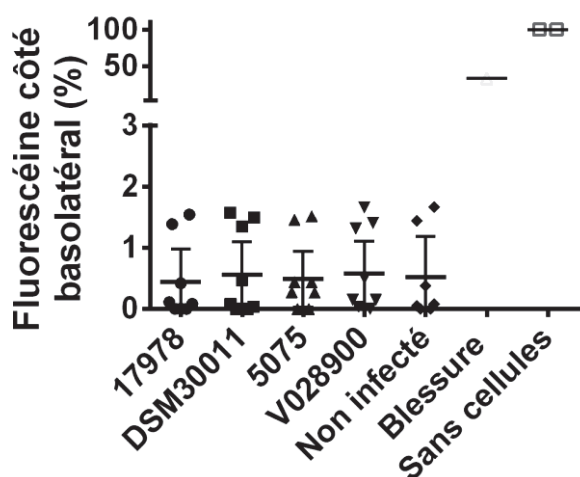


Figure 18. Absence de perturbation de la monocouche de cellules Calu3 polarisée en condition AIC par l'infection d'Ab.

Évaluation du passage passif de la fluorescéine à travers la monocouche de cellules Calu3 polarisée par mesure de la fluorescence du milieu du compartiment basolatéral après 1h d'infection par Ab. Les différences statistiques ont été calculées avec un test de Kruskal-Wallis. Aucune différence significative entre les cellules non infectées et infectées.

Après la mise au point des conditions de polarisation (voir Annexe 3), nous avons infecté les cellules Calu3 polarisées en condition air-liquide « AIC » (Air Interfaced Culture) avec les différentes souches d'Ab. L'intégrité de la monocouche cellulaire a été évaluée en quantifiant le passage de la fluorescéine, une molécule fluorescente, à travers elle (Figure 18). Pour contrôler le passage effectif de la fluorescéine, nous avons artificiellement réalisé une rupture de la monocouche cellulaire en grattant à l'aide d'un cône la monocouche, engendrant alors un passage passif plus important de fluorescéine (Figure 18). Les inserts infectés par Ab ne présentent pas de passage passif de fluorescéine plus important que ceux n'ayant pas été infectés. En effet, moins de 2% de passage de fluorescéine est observé que ce soit à travers la monocouche infectée par Ab ou la monocouche non infectée (Figure 18). Nous avons cependant observé la présence d'Ab après la mise en culture sur boîte de pétri des milieux basolatéraux récupérés après une heure d'infection. Cette croissance ne représentait néanmoins qu'une très faible proportion de bactéries par rapport aux inocula utilisés lors de l'infection (moins de 0,1%), sans qu'il n'y ait de différence entre les souches (données non montrées). Ce résultat suggère qu'Ab pourrait traverser des monocouches cellulaires polarisées mais il n'explique pas la virulence accrue des souches 5075 et V028900 chez les patients.

Comparaison de l'induction de cytotoxicité chez les cellules infectées par les différentes souches d'Ab

Les différences de virulence observées *in vivo* entre les souches cliniques hypervirulentes et celle de laboratoire ne sont pas dues à une différence de capacité à adhérer aux cellules épithéliales, ni à une perturbation de la monocouche cellulaire. Un autre mécanisme de virulence d'Ab est l'induction de mort cellulaire, décrit dans l'introduction. Nous avons donc ensuite analysé les niveaux de cytotoxicité induit lors de l'infection.

Pour évaluer la mort cellulaire induite lors de l'infection par Ab, nous avons réalisé un test colorimétrique mesurant l'activité des lactates déshydrogénases (LDH), une enzyme libérée dans le milieu cellulaire lors de la lyse des cellules. La lyse est souvent une conséquence de la mort cellulaire qui peut être de différentes natures [230]. Ce test permet une appréciation quantitative des dommages cellulaires mais ne permet pas de distinguer ou d'identifier la mort cellulaire qui en est la cause.

Nous avons d'abord testé différentes conditions d'infection pour ce test LDH en utilisant la souche DSM30011 d'Ab et la souche PA14 de *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* est connue pour induire une mort cellulaire importante car elle possède un large répertoire d'effecteurs ayant une activité cytotoxique sur les cellules eucaryotes [200,231,232]. Les cellules A549 ont été infectées par Ab durant une heure puis elles ont été traitées aux antibiotiques afin d'éliminer les bactéries extracellulaires (Figure 19A). La quantification de l'activité de la LDH libérée suite au traitement des cellules par le Triton X-100 représente la valeur maximale théorique de mort cellulaire. En effet, le Triton X-100 entraîne une lyse totale des cellules. En se basant sur cette donnée, PA14 entraîne après 6h d'infection la lyse de près de 40% des cellules jusqu'à induire après 24h d'infection une cytotoxicité d'environ 60% (Figure 19). En revanche la souche DSM30011 d'Ab induit très peu de mort cellulaire après 6h et 24h d'infection.

Au vu de l'absence d'induction de mort cellulaire par Ab, nous avons ensuite évalué l'activité de la LDH de cellules infectées avec les souches d'Ab issues d'une culture en phase exponentielle de croissance. La souche PA14 en phase exponentielle lors de l'infection des cellules eucaryotes est toujours capable d'induire la libération de LDH (Figure 19A). Par contre, aucune cytotoxicité n'est détectée lors de l'infection par la souche DSM30011 issue d'une culture en phase exponentielle.

Ces résultats ne sont pas en accord avec les données de la littérature car des études montrent une cytotoxicité d'Ab *in vitro* [103,121,133], toutefois la plupart de ces études se font après vingt-quatre heures de contact entre les bactéries et les cellules. Nous avons donc infecté les cellules par Ab dans des conditions similaires à l'expérience précédente (Figure 18A) en changeant uniquement une condition expérimentale. Ainsi après une heure d'infection, le milieu a été remplacé par du milieu de culture cellulaire complet sans antibiotiques, permettant la survie des bactéries adhérentes. L'infection par PA14 issue d'une culture en phase stationnaire conduit à une cytotoxicité de 70% dès 6h après infection (Figure 19). Dans ces conditions, moins de 5% de toxicité est induite par la souche DSM30011 après 6h d'infection. En revanche après 24h d'infection, la souche DSM30011 conduit à la lyse d'environ 30% des cellules. La souche DSM30011 issue d'une culture en phase exponentielle lors de l'infection induit une cytotoxicité identique à celle

d'une culture en phase stationnaire. Pour la suite de ces expériences, nous avons utilisés des cultures en phase stationnaire d'Ab lors de l'infection des cellules A549 pour être dans des conditions comparables à celles utilisées lors des tests d'adhésion.

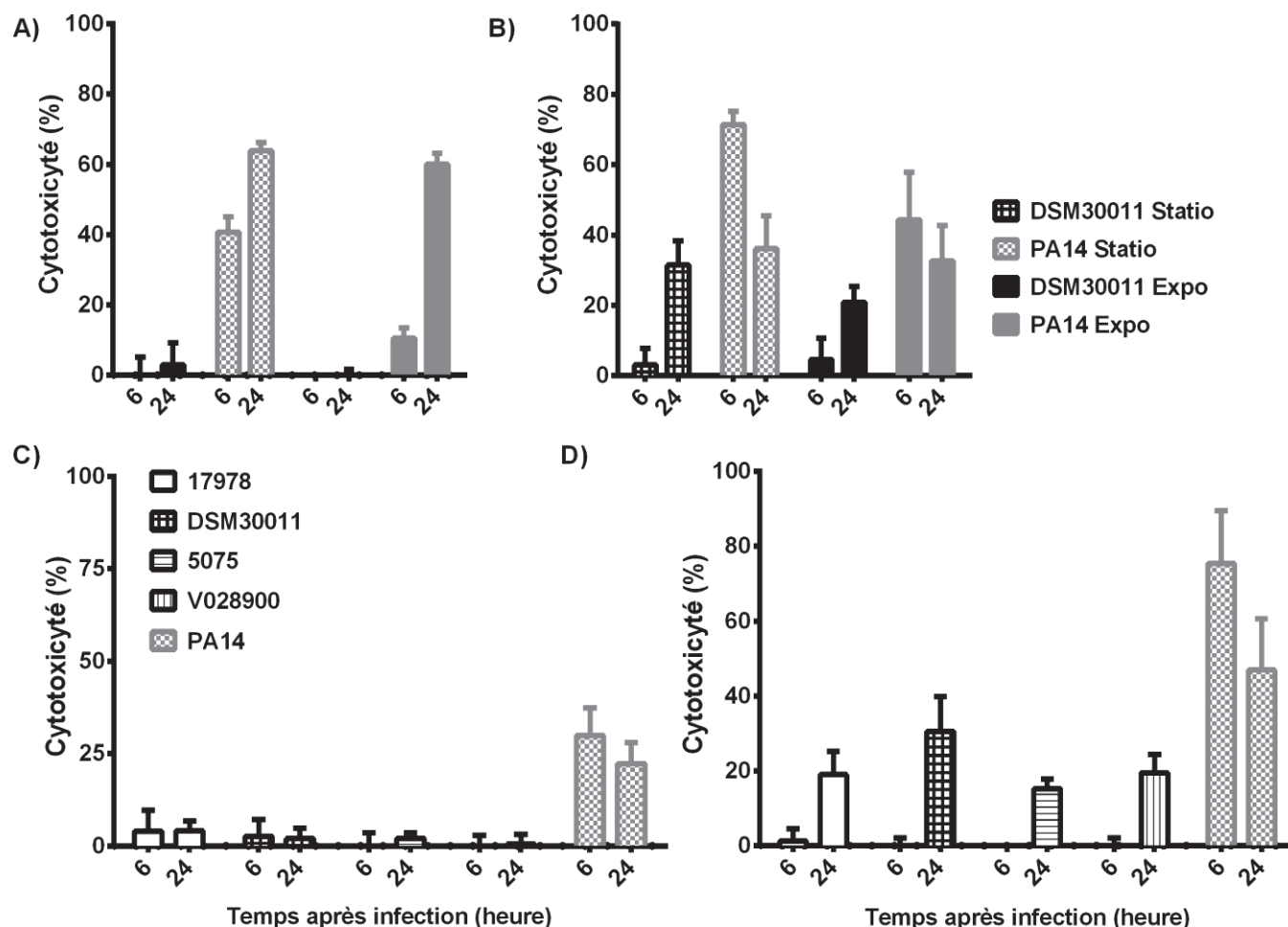


Figure 19. Mesure de LDH dans le surnageant des cellules infectées par les différentes souches d'Ab.

A) Evaluation du niveau de LDH libéré lors de l'infection par la souche DSM30011 d'Ab ou la souche PA14 de *P. aeruginosa* issues d'une culture en phase stationnaire (statio) ou d'une culture exponentielle (expo). Les cellules ont été infectées durant 1h puis traitées aux antibiotiques (hygromycine B à 300 µg/mL et apramycine à 50 µg/mL) B) ou non traitées jusqu'à 6 ou 24h post infection. C) Comparaison de l'induction de mort cellulaire induite lors de l'infection par les souches d'Ab 17978, DSM30011, 5075 et V028900 issues d'une culture en phase stationnaire traitées aux antibiotiques ou D) non traitées. Pour toutes les expériences la mort cellulaire a été évalué par un test enzymatique quantifiant la LDH retrouvée dans les surnageants après lyse de la cellule. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cytotoxicité par rapport au niveau de cytotoxicité obtenu après lyse des cellules par le Triton X-100 et les cellules non-traitées. Les différences statistiques ont été calculées avec un test de Kruskal-Wallis. Aucune différence significative entre les souches à un même temps d'infection.

Dans un premier temps, les cellules ont été infectées avec les souches cliniques hypervirulentes d'Ab, la souche 17978 et la souche DSM30011 durant une heure puis elles ont été traitées aux antibiotiques jusqu'à 24h après infection (conditions identiques à Figure 19A). Les souches d'Ab induisent une très faible cytotoxicité à 6h ou 24h après infection dans ces conditions (Figure 19C). Dans un second temps, les cellules ont été infectées avec les différentes souches pendant une heure suivie d'aucun traitement antibiotique. Après 6h, une très faible cytotoxicité est observée chez les cellules infectées par les souches d'Ab (Figure 19D). En revanche après 24h d'infection sans traitement antibiotique, les souches d'Ab induisent une cytotoxicité chez 15% à 30% des cellules. Cependant la différence de cytotoxicité entre les souches n'est pas significative (Figure 19D).

Ces différentes conditions nous permettent de conclure que les souches cliniques hypervirulentes ne conduisent pas à une cytotoxicité plus importante que celle de la souche 17978 ou de la souche DSM30011.

Nous avons voulu conforter ces résultats à l'aide d'une autre technique. L'IP est un agent dont la fluorescence s'accroît en s'intercalant entre les bases d'ADN. Il permet ainsi la détection de cellules mourantes, les cellules vivantes y étant imperméables. L'incubation des cellules infectées par Ab avec le IP permet d'observer en temps réel la mort cellulaire causée par l'infection. L'incorporation de l'IP par des cellules lysées au Triton X-100 a également été mesurée afin d'avoir sa valeur maximale théorique. Comme attendu, une incorporation progressive de IP chez les cellules infectées par PA14 est observée. Quatre heures après infection, l'incorporation par les cellules infectées par PA14 de l'IP est significativement plus importante que celle des cellules non infectées (Figure 20). Aucune des souches d'Ab n'induit de cytotoxicité comparable à celle induite par PA14 (Figure 20).

En conclusion, l'augmentation de la virulence *in vivo* des souches hypervirulentes V028900 et 5075 n'est probablement pas due à leur cytotoxicité.

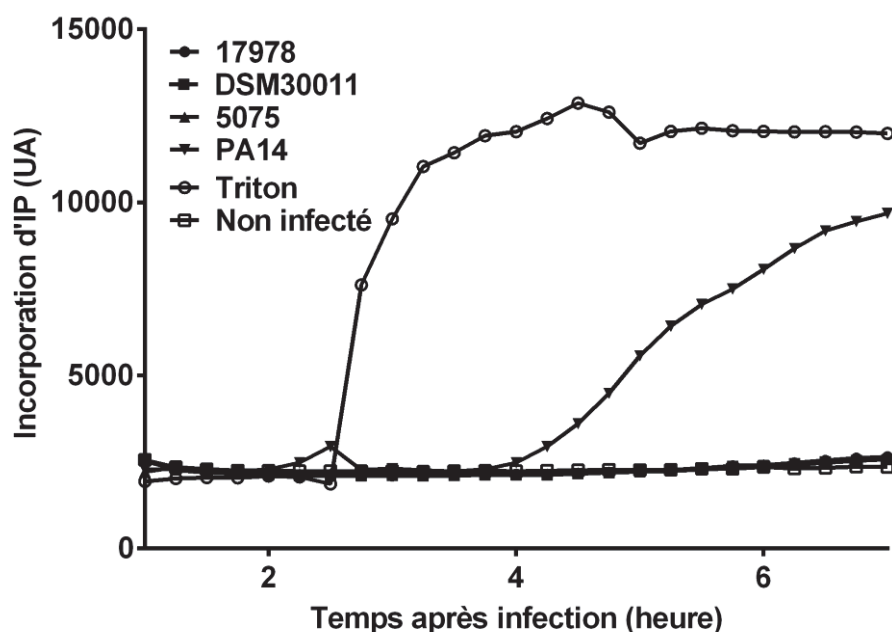


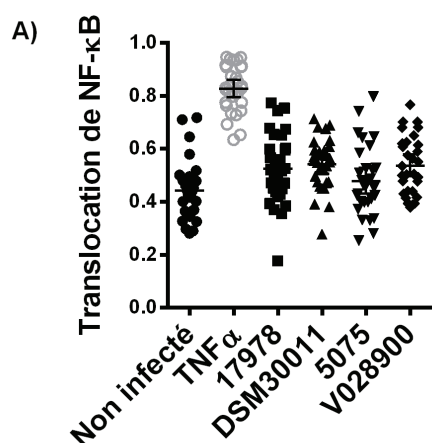
Figure 20. Différences de cytotoxicité observées par mesure d'incorporation de IP lors de l'infection des cellules pulmonaires épithéliales par les différentes souches d'Ab.

Les cellules A549 ont été infectées puis l'incorporation de IP a été enregistrée à partir d'une heure après infection jusqu'à 7h par mesure de la fluorescence à 37°C tous les quarts d'heure. L'incorporation du IP maximale théorique est obtenue après lyse des cellules par le Triton X-100.

Induction de réponse immunitaire innée par Ab

Comme développé dans l'introduction, Ab induit une RI lors de son infection. En effet, la détection *via* les PRR d'Ab conduit à l'activation du facteur transcriptionnel NF- κ B qui est alors transloqué dans le noyau. Une fois dans le noyau, il entraîne la transcription de gènes cibles impliqués dans la RI, notamment de cytokines pro-inflammatoires comme entre autres l'IL-6 [233]. Avec l'aide de Julie Raymond, une stagiaire de Master 2 que j'ai encadré, nous avons étudié l'activation de la voie NF- κ B lors de l'infection par Ab.

Par microscopie confocale, nous avons visualisé la translocation dans le noyau de NF- κ B après une heure d'infection. L'analyse des images obtenues des cellules infectées à l'aide d'un logiciel développé dans notre laboratoire permet l'obtention d'un ratio reflétant la part de facteur NF- κ B redirigée vers le noyau (Figure 21) [200]. Nous n'avons pas détecté de translocation de NF- κ B dans le noyau pour aucune des cellules infectées avec les souches d'Ab testées. Ces résultats contredisent ainsi ceux de la littérature.



B)

Dunn's multiple comparisons test	Significant?	Summary
Non infecté vs. 17978	No	ns
Non infecté vs. DSM30011	No	ns
Non infecté vs. 5075	No	ns
Non infecté vs. V028900	No	ns
Non infecté vs. TNF α	Yes	****
17978 vs. DSM30011	No	ns
17978 vs. 5075	No	ns
17978 vs. V028900	No	ns
17978 vs. TNF α	Yes	****
DSM30011 vs. 5075	No	ns
DSM30011 vs. V028900	No	ns
DSM30011 vs. TNF α	Yes	****
5075 vs. V028900	No	ns
5075 vs. TNF α	Yes	****
V028900 vs. TNF α	Yes	****

Figure 21. Absence de détection par microscopie de la translocation de NF- κ B dans le noyau des cellules infectées par Ab.

Les cellules ont été infectées durant 1h puis fixées. Les noyaux et NF- κ B ont ensuite été marqués par immunofluorescence. Par microscopie confocale des images ont été prises permettant A) l'évaluation de la translocation du facteur de transcription NF- κ B du cytoplasme vers le noyau à l'aide d'un logiciel [200]. B) Tableau récapitulatif des tests statistiques comparant les différentes conditions de l'expérience réalisées. TNF α sert ici de contrôle positif induisant la translocation de NF- κ B dans le noyau. Les différences significatives ont été calculées avec un test de Kruskal-Wallis. **** $P \leq 0.0001$.

Dans le but de confirmer ce résultat, nous avons utilisé un système de gène rapporteur permettant d'évaluer l'induction de l'expression des gènes cibles de NF- κ B lors de l'infection. Avec ce système la sécrétion de la phosphatase alcaline embryonnaire (SEAP) par les cellules A549-Dual, sous contrôle du promoteur de l'IFN- β fusionné à cinq sites de liaison à NF- κ B, est détectée par un test enzymatique colorimétrique. Après une mise au point du système (Annexe 4), les cellules A549-Dual ont été infectées comme précédemment puis traitées ou non aux antibiotiques afin d'éliminer les bactéries extracellulaires (Figure 22).

Pour ces expériences deux contrôles positifs sont utilisés pour valider l'état fonctionnel de la voie NF- κ B des cellules rapportrices au cours de l'infection : 1) la stimulation des cellules par le TNF α ; 2) la stimulation des cellules avec les différentes souches d'Ab inactivées par la chaleur (HK17978, HKDSM30011, HK5075, HKV028900). Ces souches

inactivées permettent l'exposition aux cellules eucaryotes de tous les PAMP d'Ab produisant la stimulation maximale possible des cellules par Ab. Toutes les souches inactivées stimulent la voie NF- κ B et ce aussi fortement que le TNF α après 24h et 48h de stimulation (Figure 22A).

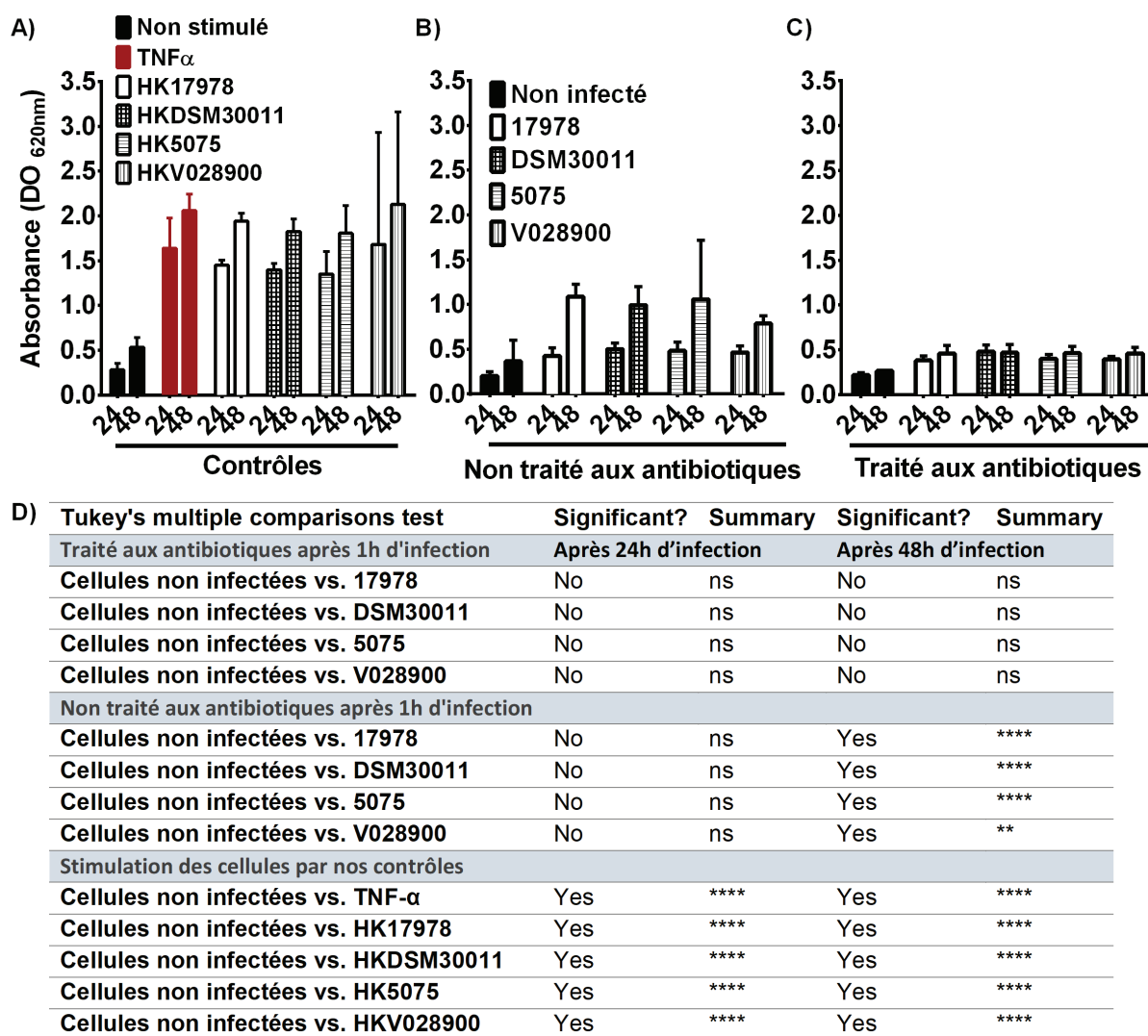


Figure 22. Activation de la voie NF- κ B par Ab.

Les cellules A549-Dual porteuses du système rapporteur pour l'activation de NF- κ B ont été A) stimulées par le TNF α ou par les bactéries inactivées par la chaleur ; B) infectées par les souches 17978, DSM30011, 5075 ou V028900 d'Ab ou par la souche PA14 de *P. aeruginosa* durant 1h puis traitées aux antibiotiques (hygromycine B à 300 μ g/mL et apramycine à 50 μ g/mL) et C) non traitées aux antibiotiques. L'activation de la voie NF- κ B est évaluée grâce à un test enzymatique colorimétrique permettant la détection de l'activité de la SEAP dans les surnageants à une DO de 620 nm après 24h ou 48h de stimulation. D) Tableau récapitulatif des tests statistiques comparant les différentes conditions de l'expérience. Les différences significatives d'adhésion sont indiquées par des astérisques et ont été calculées avec un test de Two-Way Anova. ** $P \leq 0.01$; **** $P \leq 0.0001$; ns signifie non significatif.

Nous n'avons pas d'induction de la voie NF- κ B à 24h et 48h, chez les cellules infectées subissant un traitement antibiotique après infection par rapport aux cellules non infectées (Figure 22B). En revanche si l'infection n'est suivie d'aucun traitement antibiotique, une augmentation de l'induction de la voie NF- κ B est observée quel que soit la souche à l'origine de l'infection après 24h et 48h (Figure 22C).

En conclusion Ab conduit à l'activation de la voie NF- κ B mais aucune différence significative n'a été observée entre les différentes souches d'Ab testées.

Nous avons ensuite quantifié la concentration de l'IL-6, une cytokine majeure de la RI, par ELISA dans les surnageants des cellules infectées par Ab (Figure 23). Elle est importante dans les processus d'inflammation, en permettant notamment le recrutement des neutrophiles sur le site de l'infection, essentiels à l'élimination d'Ab [170,234,235].

Trois heures après infection, l'IL-6 est retrouvée dans les surnageants des cellules infectées par Ab tandis qu'aucune sécrétion de cette cytokine n'est détectée chez les cellules non infectées (données non montrées). Le taux d'IL-6 augmente progressivement jusqu'à 24h pour toutes les souches. Aucunes différences dans l'induction de sécrétion n'est observée entre les souches 17978, DSM30011 et 5075. La souche V028900 semble induire une sécrétion plus faible de cytokines que la souche 17978 à 8h et 24h suite à l'analyse statistique. Cependant la pertinence biologique de cette différence reste à confirmer par des tests *in vivo*.

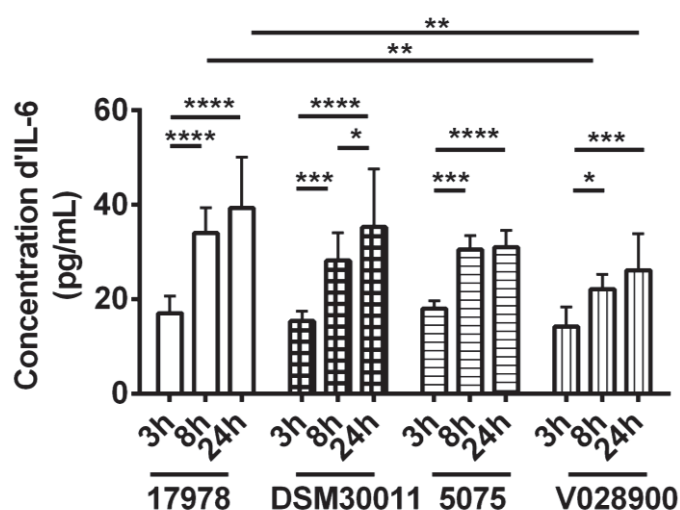


Figure 23. Sécrétion d'IL-6 par les cellules épithéliales infectées par les différentes souches d'Ab.

Les cellules A549 ont été infectées pendant 1h puis traitées aux antibiotiques (hygromycine B à 300 μ g/mL et apramycine à 50 μ g/mL). La quantification par Elisa de la concentration d'IL-6 dans le surnageant des cellules infectées par Ab s'est faite après 3h, 8h ou 24h d'infection. La concentration est exprimée en pg/mL. Les différences significatives sont indiquées par des astérisques et ont été calculées avec un test Two-Way Anova. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.0001$; l'absence de statistique indique que les différences sont non significatives.

Evidence d'une phase intracellulaire et multiplication des souches cliniques hypervirulentes à l'intérieur des cellules eucaryotes

Face à l'absence de phénotype clairement identifié qui pourrait expliquer une virulence accrue des souches cliniques, et compte tenu de l'accumulation de données récentes indiquant l'existence d'une phase intracellulaire lors de l'infection [113,121,124], nous avons recherché s'il y avait des différences d'invasion entre les souches cliniques hypervirulentes et les autres souches.

Nous avons infecté les cellules durant deux temps de contact différent d'1h ou de 5h afin d'évaluer si le temps de contact influence la capacité d'Ab à entrer dans les cellules (Figure 24A). Pour cet essai, nous avons utilisé la souche 17978 dont l'adhésion aux cellules A549 ne semble pas être influencée par le temps de contact avec les cellules et la souche 5075 qui adhère davantage après cinq heures (Figure 15C). Le dénombrement des bactéries intracellulaires indique que les souches 17978 et 5075 sont effectivement capables d'entrer à l'intérieur des cellules après une heure d'infection (Figure 24A). De plus, aucune différence dans le nombre de bactéries intracellulaires n'est observée pour chacune des souches testées après avoir augmenté le temps de contact à cinq heures d'infection. Pour la suite les expériences d'invasion, nous avons donc choisi d'infecter nos cellules durant une heure.

Nous avons ensuite testé si la souche DSM30011 et la souche V028900 sont également capable d'envahir les cellules (Figure 24B). Les quatre souches entrent de façon équivalente à l'intérieur des cellules. En effet 3h après infection aucune différence significative est constatée entre le nombre de colonies obtenu pour chacune des souches après lyse des cellules infectées (Figure 24B).

Par la suite nous avons examiné si Ab est capable de persister à l'intérieur des cellules, en les lysant à des temps plus tardifs d'infection. Il n'y a pas différence significative entre les CFU obtenus après 3h, 24h ou 48h d'infection pour les souches 17978 et DSM30011, qui semblent entrer dans des cellules et y survivre jusqu'à 48h (Figure 24C). En revanche, après 24h d'infection un nombre significativement plus important de bactéries

intracellulaires est cultivable pour la souche 5075 (Figure 24C). La même tendance est observée pour la souche V028900. Après 48h d'infection, le nombre de bactéries intracellulaires de 5075 et V028900 diminue au niveau de celui retrouvé à 3h d'infection. Par contre, nous avons remarqué une importante variabilité de nos résultats. Davantage d'expériences sont essentiels pour confirmer ces résultats. Néanmoins, l'augmentation potentiel du nombre de bactéries intracellulaires des souches hypervirulentes d'Ab est un phénotype très intéressant qui pourrait expliquer la différence de virulence observée *in vivo*.

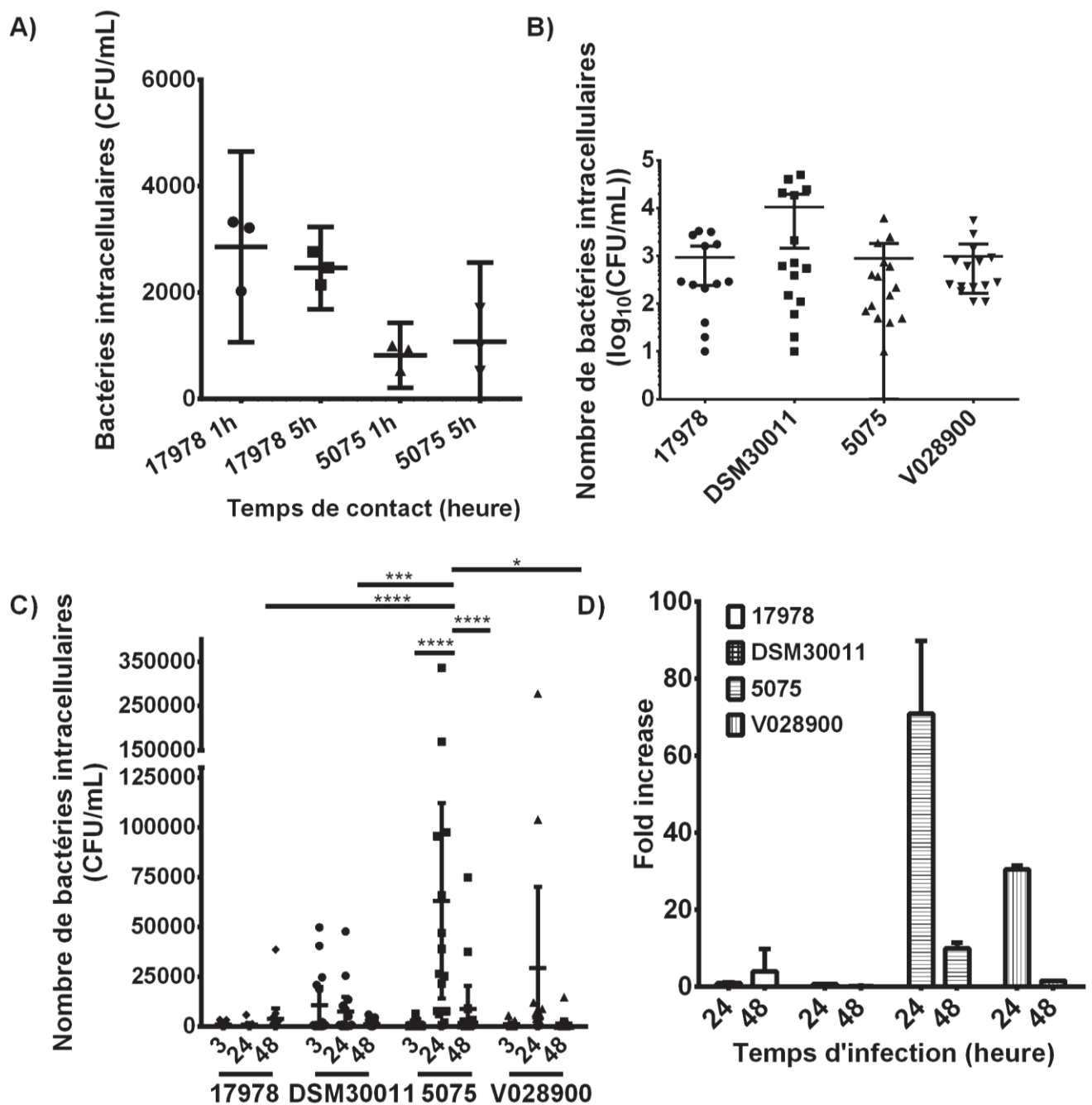


Figure 24. Invasion des cellules épithéliales par Ab et multiplication des souches cliniques hypervirulentes à l'intérieur des cellules eucaryotes.

A) Infection des cellules A549 à une MOI de 100 par les différentes souches d'Ab durant un temps de contact d'1h ou de 5h suivie d'un traitement antibiotique de 2h pour éliminer les bactéries extracellulaires (hygromycine B à 300 $\mu\text{g/mL}$ et apramycine à 50 $\mu\text{g/mL}$). Quantification des bactéries intracellulaires après lyse des cellules infectées à l'aide d'eau et étalement du lysat sur LB. Nombre de bactéries intracellulaires exprimé en CFU/mL. B) Nombre de bactéries intracellulaires obtenu après 3h d'infection. Les mêmes données sont représentées en C) avec les temps d'infection de 24h et 48h. D) Calcul de l'augmentation du nombre de bactéries intracellulaires par rapport à 3h. Les différences significatives d'adhésion sont indiquées par des astérisques et ont été calculées avec un test Two-way Anova. * $P \leq 0.05$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.0001$; l'absence de statistique indique que les différences sont non significatives.

Par conséquent, les cellules infectées par Ab ont été fixées et marquées à différents temps puis observées par microscopie confocale afin d'étudier cette phase intracellulaire. L'internalisation d'Ab après interaction avec les PAFR est dépendante des clathrines ainsi que des filaments d'actines et des microtubules (Voir I. Introduction 6.2) [121]. Cependant le compartiment intracellulaire dans lequel se trouve Ab n'était pas caractérisé. En premier lieu, nous avons utilisé la souche 17978 exprimant la GFP lors de l'infection des cellules et nous avons marqué la protéine membranaire LAMP1, marqueur de l'endosome tardif et du lysosome [236]. La plupart des bactéries se trouve dans un compartiment associé à LAMP1 après 3h et 24h infection (Figure 25). La souche 17978 d'Ab est associée à une vacuole LAMP1 jusqu'à 48h après infection (données non montrées). Ce phénotype a été confirmé chez différentes lignées cellulaires (Figure 25).

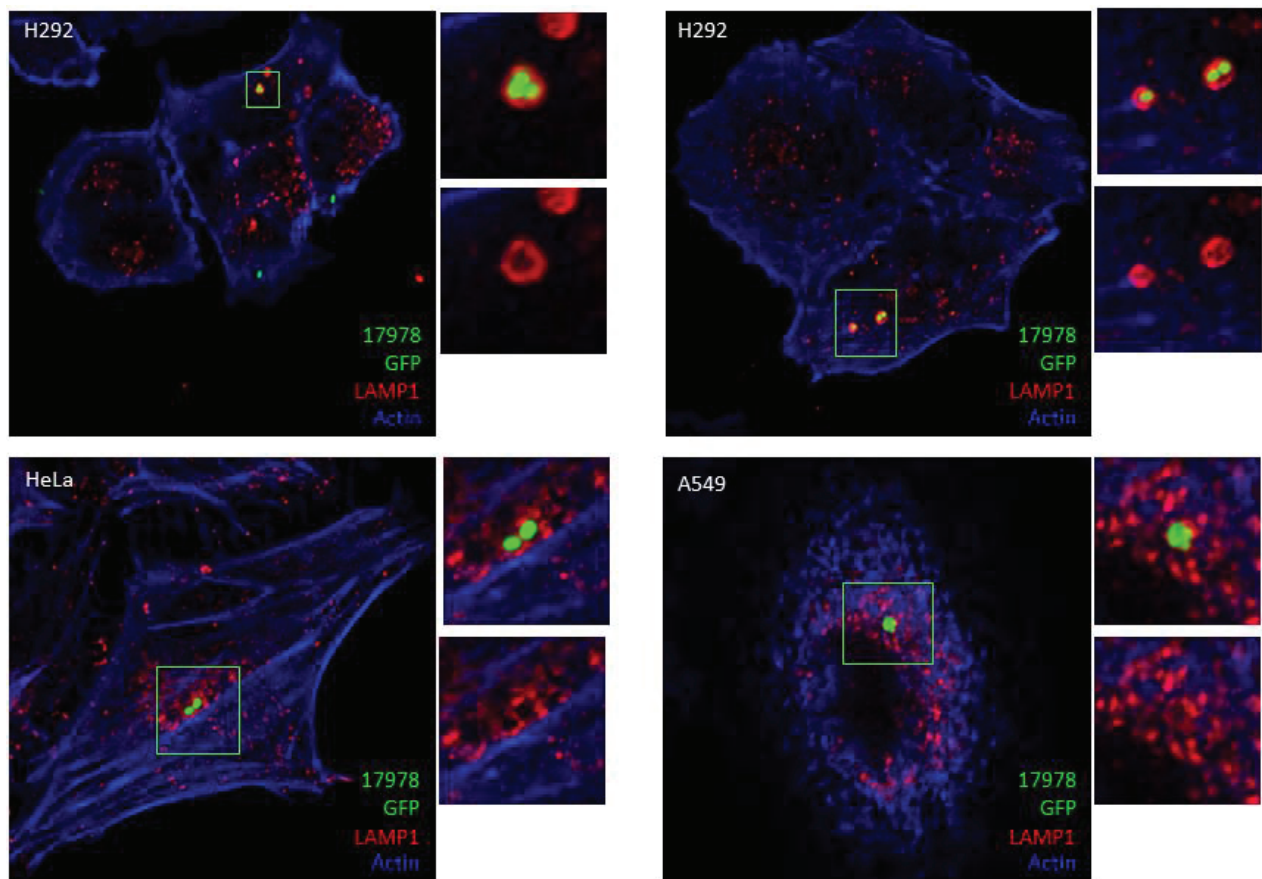


Figure 25. Visualisation de la souche 17978 d'Ab au niveau intracellulaire chez différentes lignées de cellules épithéliales.

Les cellules ont été infectées pendant 1h par la souche 17978 pX5k-GFP puis ont subi un traitement antibiotique (hygromycine B à 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et apramycine à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Elles ont été fixées à 24h après infection. Sur l'image, les bactéries sont en vert, l'actine en bleu et LAMP1 en rouge. A-B) cellules pulmonaires humaines H292, C) des cellules HeLa ou D) des cellules A549.

Pour les autres souches, nous avons utilisé des anticorps spécifiques pour visualiser les souches DSM30011, 5075 et V028900. Comme observé pour la souche 17978, la majorité des bactéries se trouvent dans un compartiment associé à LAMP1 à 3h, 24h (Figure 26) et 48h. En conclusion, Ab au niveau intracellulaire se trouve dans un compartiment associé à un marqueur de l'endosome tardif et du lysosome.

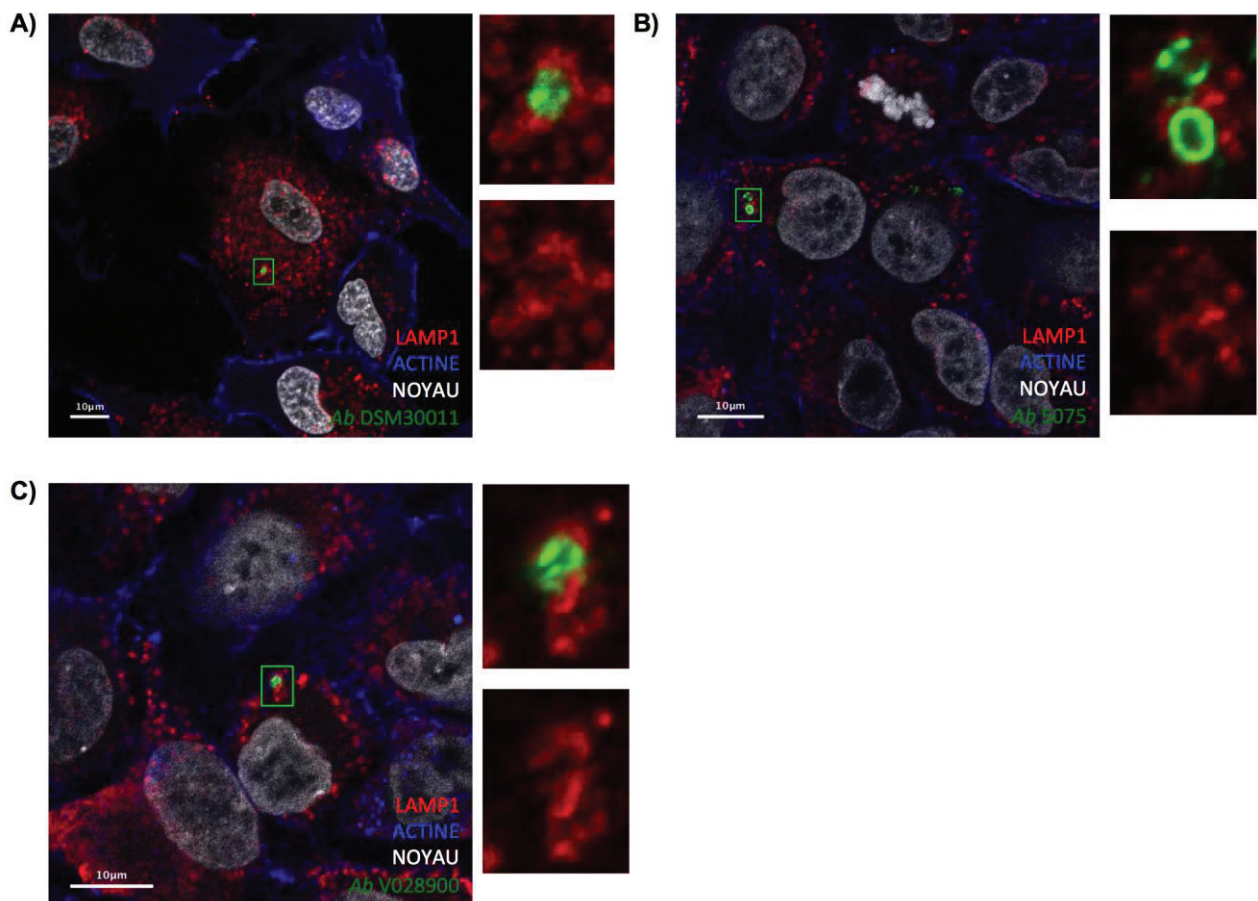


Figure 26. Ab est associée à une vacuole LAMP1+ à l'intérieur des cellules infectées. Les cellules ont été infectées pendant 1h puis elles ont subi un traitement antibiotique (hygromycine B à 300 μg/mL et apramycine à 50 μg/mL). Elles ont été fixées à 24h après infection et marquées avec des anticorps spécifiques reconnaissant les différentes souches Ab (verte), avec phalloïdine pour l'actine (bleu), DAPI pour le noyau (blanc) et LAMP1 (rouge). Image représentative de microscopie confocale d'une cellule infectée par la souche A) DSM30011 ou B) 5075 et C) V028900. Echelle 10 μm.

Lors des tests d'invasion par comptage du nombre de bactéries obtenu après lyse des cellules, nous avons constaté que les souches cliniques V028900 et 5075 ont tendance à être plus nombreuses à 24h. Ce résultat laisse penser à une réplication intracellulaire des bactéries (Figure 24). Afin de visualiser par microscopie cette réplication, nous avons

comme précédemment réalisé des images en trois dimensions. Après 3h d'infection, nous avons remarqué qu'une faible population de bactéries se trouvent à l'extérieur des cellules, notamment les souches cliniques hypervirulentes. La souche V028900 et la souche 5075 forment des petits îlots à la surface des cellules eucaryotes (Figure 27). Il semblerait donc que certaines bactéries survivent au traitement antibiotique ce qui pourrait en partie expliquer l'augmentation du nombre de CFU. Néanmoins la plupart des bactéries retrouvées à 3h et à des temps plus tardifs sont intracellulaires.

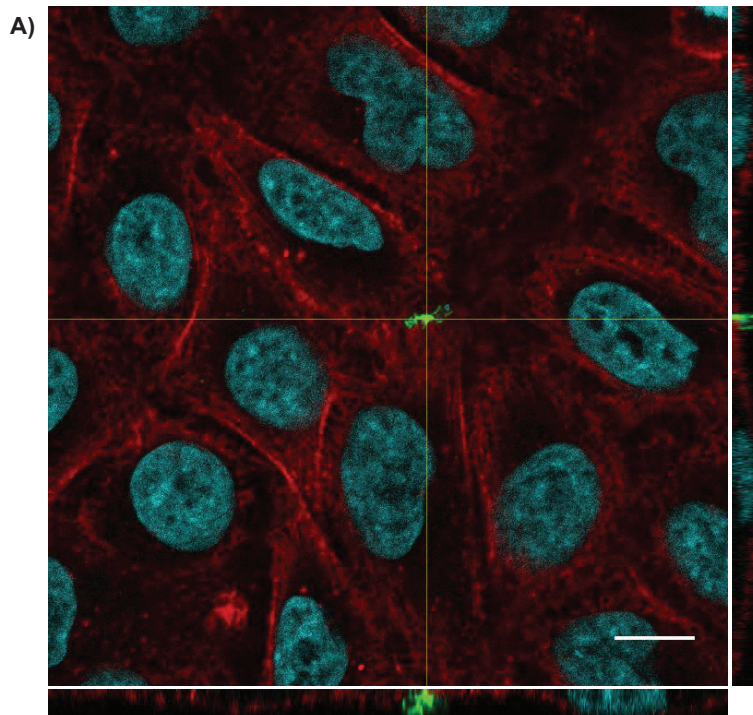
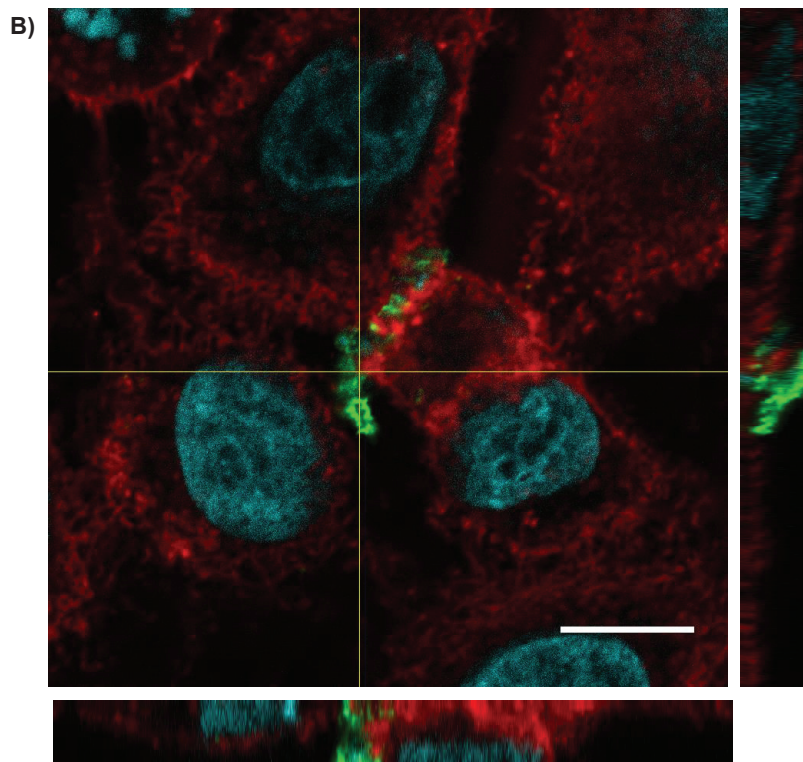


Figure 27. Adhésion des souches cliniques hypervirulentes d'Ab aux cellules épithéliales pulmonaires humaines.

A) Image de microscopie confocale après 3h d'infection dans un plan xy et les projections orthogonales xz et yz montrant l'adhésion des souches A) 5075 et B) V028900. Sur l'image, les bactéries sont en vert, l'actine en rouge, et le noyau en cyan. Echelle 10 μ m.



Après 3h d'infection, la majorité des cellules infectées par Ab présentent une à deux bactéries intracellulaires (donnés non montrées). Ce nombre ne semble pas augmenter avec le temps pour les souches 17978 et DSM30011 (Figure 24 et 26) tandis qu'une faible proportion de cellules infectées par la souche 5075 semble présenter 24h après infection une réplication de bactéries (Figure 28). Cette réplication n'a pas été observé par microscopie chez les cellules infectées par la souche V028900. Ces résultats restent à confirmer avec des méthodes alternatives car malgré les anticorps spécifiques récemment acquis, nous avons rencontré des difficultés à imager les souches cliniques hypervirulentes, en particulier la souche V028900.

Pour conclure, nous avons confirmé par microscopie confocale qu'Ab adhère et entre à l'intérieur des cellules. Ab est associée à une vacuole ayant des caractéristiques endosomales au niveau intracellulaire après 3h et 24h d'infection. La souche hypervirulente 5075 semble avoir une phase de réplication intracellulaire suggérant que certaines souches ont acquis la capacité de se multiplier dans un compartiment avec des caractéristiques endosomales.

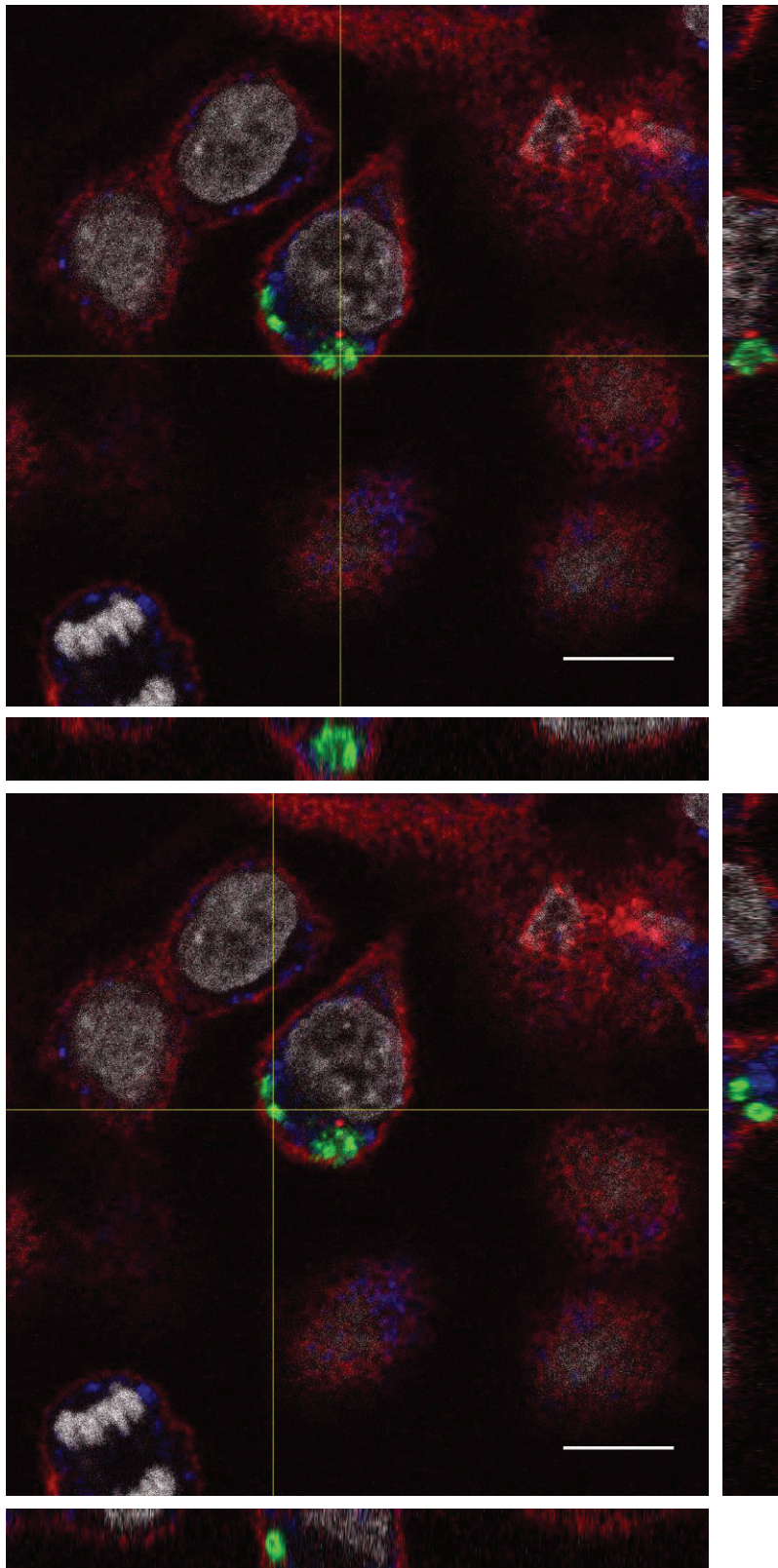


Figure 28. Cellule infectée par la souche 5075 d'Ab présentant un nombre important de bactéries intracellulaires.

Image de microscopie confocale des cellules A549 après 24h d'infection par la souche 5075 d'Ab dans un plan xy et les projections orthogonales xz et yz. Les bactéries sont en vert, l'actine en rouge, LAMP1 en bleu et le noyau en blanc. Echelle 10 μm .

Matériels et méthodes du Chapitre 2 Partie II.

Résultats

Culture bactérienne

Les différentes souches utilisées sont listées dans le tableau en Annexe 5. Les bactéries ont été isolées sur des boîtes de pétri composées de Tryptic Soy Agar (TSA). Les bactéries ont été cultivées en milieu liquide Tryptic Soy Broth (TSB) sous agitation à 37°C et lorsque cela a été nécessaire les antibiotiques suivants ont été ajoutés aux cultures : apramycine à 30 µg/ml, kanamycine à 50 µg/ml, gentamicine à 500 µg/ml.

Sécrétion de Hcp

L'analyse de la sécrétion de Hcp a été réalisée selon le protocole de Repizo *et al.* [198]. Brièvement des pré-cultures d'Ab ont été réalisées sur la nuit. Les pré-cultures d'Ab ont été ensuite inoculées dans 50 mL de TSB à une DO_{600nm} de 0,08 et incubées à 37°C sous agitation jusqu'à atteindre une DO_{600nm} de 3.

Les cultures ont été ensuite centrifugées à 4°C à 4000 x g. Les surnageants ont été récupérés et filtrés avec un filtre dont les pores ont une taille de 0,22 µm. Ils ont ensuite été concentrés 50 fois à l'aide de concentrateur (Amicon Ultracel 3K). Les lysats cellulaires et les surnageants ont été ensuite reprises dans une solution de 40 mM Tris à pH 8, 200 mM NaCl, et 5% de glycérol. Les échantillons ont ensuite été analysés par SDS-PAGE. La protéine Hcp a été révélée par Bleu de Coomassie. Lorsque c'était nécessaire la présence de Hcp et EF-Tu ont été mise en évidence par Western Blot. Les échantillons ont été transférés sur membrane PVDF pendant 1h à 200 mA dans du tampon de transfert 1X. Après 1h de blocage de la membrane avec du PBS contenant 5% de lait, la membrane est incubée à température ambiante durant 1h avec du PBS-Tween 0.05%-5% lait contenant l'anticorps primaire anti-Hcp ou anti-EF-Tu. Hcp a été révélée grâce à un anticorps dirigé contre la protéine Hcp de *P. aeruginosa* à une dilution de 1/500, fourni par A. Filloux (Imperial College London, UK) et EF-Tu a été révélée avec un anticorps anti-EF-Tu dilué à 1/1000, donné par R. Voulhoux (CNRS UMR7255 et Université d'Aix-Marseille, Marseille, France). Suite au lavage avec du PBS-Tween 0.05%, la membrane est incubée 1h avec du PBS-Tween 0.05% contenant l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin ou de souris dilué

au 1/5000 couplé à la peroxydase de raifort HRP. Les protéines Hcp et EF-Tu sont révélées par électrochimiluminescence.

Préparation de cellules compétentes d'Ab

Les pré-cultures de nuit d'Ab ont été diluées afin d'obtenir une DO_{600nm} de 0,05 dans 50 mL de LB (Luria-Bertani) puis mises à agiter à 37°C. Après avoir atteint une DO_{600nm} comprise entre 0,5 et 0,7, les cultures ont été incubées dans la glace durant 15 minutes. Toutes les solutions ont été maintenues dans la glace et toutes les centrifugations ont été effectuées à 4°C. Les cultures refroidies ont été centrifugées ensuite à 3220 x g pendant 15 minutes. Le surnageant a été retiré et le culot a été repris dans 25 mL d'eau puis centrifugé. Le surnageant a été à nouveau retiré tandis que le culot a été repris dans 10 mL d'eau puis de nouveau centrifugé. Le surnageant a été retiré et le culot a été repris dans 1 mL d'eau puis centrifugé à 5000 x g pendant 5 minutes. Le culot a été enfin repris dans 200 μ L de glycérol à 10%.

Electroporation d'Ab

Dans une cuve froide, 100 ng de plasmide ajouté à 50 μ L de cellules compétentes ont été électroporés selon les réglages suivants : 2,5 kV, 200 Ω et 25 μ F. Ensuite 1 mL de milieu SOC a été ajouté et incubé à 37°C sous agitation. Après 3h d'incubation, les bactéries électroporées ont été étalées sur boîte sélective à 37°C pendant 24h.

Construction des souches GFP d'Ab

Construction de vecteur pUC18-mini-Tn7-GFP

Le vecteur pUC18-mini-Tn7-GFP a été construit en utilisant la méthode SLIC (Sequence- and Ligation-Independent Cloning) [237]. Le gène codant la GFP du plasmide pX5k a été amplifiée par PCR en utilisant les amorces nucléotidiques suivantes : 5'-atcatgcatgagctcactagattgcgttgcgctcactgcc-3' et 5'-cttctcgaggaattcctgcagtctcatccgcaaacagcc-3'. Le fragment PCR a été purifié avec le kit de purification (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). Une fois purifié, le fragment PCR a été inséré par ligation en utilisant la T4DNA ligase au niveau du plasmide pUC18-mini-Tn7 préalablement digéré par les enzymes Pst1 et Spe1. Le plasmide pUC18-mini-Tn7-GFP obtenu a été utilisé pour transformer les cellules compétentes TOP10 d'*E. coli*, les transformants ont été sélectionnés sur des boîtes de LB agar contenant de la gentamicine

à 500 µg/ml. Après amplification chez *E. coli*, l'extraction de l'ADN plasmidique a été réalisée à l'aide des kits de purification (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Le plasmide pUC18-mini-Tn7-GFP a ensuite été introduit chez Ab par conjugaison avec le plasmide « helper » pTNS3 codant un gène de résistance à l'ampiciline et les éléments permettant une insertion chromosomique par transposition aux site *attTn7*.

Insertion du gène *sfGFP* par transformation naturelle

Le gène *sfGFP* a été amplifié en utilisant les amorces nucléotidiques suivantes : 5'-tccaggtggttataaccc-3' et 5'-ccaatcccaatccatcctgc-3' à partir de la souche 5075sfGFP. Les colonies d'Ab à transformer ont été reprises dans 5 µL de PBS 1X avec le fragment PCR (mix). Ensuite, 2,5 µL du mix a été pipeté et introduit dans la gélose des tubes contenant le milieu de transformation (Tryptone 5g/L, NaCl 2,5g/L, 0,5% agarose type D-3). Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24h. Une fois les tubes récupérés, les colonies ont été reprises avec 200 µL de PBS et vortexées. Après 5 minutes d'attente, récupérer le maximum pour l'étaler sur boîte de sélection.

Infections de *G. mellonella*

Les larves ont été commandées sur le site Sud Est Appats (<http://www.sudestappats.fr/>). Une fois réceptionnées, elles ont été conservées à l'abris de la lumière dans un endroit thermostaté à 19°C et elles ont été infectées le lendemain. Des groupes de 30 larves ont été constituées aléatoirement et infectées avec 10 µL au niveau de l'avant dernière pseudopode par Ab à un inoculum de 1×10^6 CFU/mL ou $1,5 \times 10^6$ CFU/mL. Les inocula ont été préparés à partir des cultures en phase stationnaire (culture de 17h) d'Ab diluées pour obtenir la concentration voulue dans du PBS 1X stérile. Un groupe de larves contrôle a été à chaque expérience infecté avec du PBS stérile dans les mêmes conditions que les larves infectées par Ab. Après injection les larves ont été incubées à 37°C et surveillées régulièrement. Les courbes de survie ont été faites à l'aide du logiciel PRISM.

Infection des cellules A549

Les cellules épithéliales pulmonaires A549 ont été maintenues dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (DMEM+SVF). Pour obtenir une monocouche cellulaire en plaque de culture 24 puits, les cellules ont été mises en plaque avec 500 µL d'une solution à une concentration

de 5×10^5 cellules/mL. Le jour suivant, les cultures en phase stationnaire d'Ab ont été diluées dans du DMEM+SVF à une MOI de 1, de 10 ou de 100. Les cellules ont été infectées puis centrifugées à 400 x g pendant 5 minutes. Elles ont ensuite été incubées 1h ou 5h à 37 °C avec une concentration en CO₂ de 5%. Après 1h ou 5h, les cellules ont été lavées 10 fois avec du PBS 1x.

Test d'adhésion

Les cellules A549 ont été infectées selon le protocole d'infection. Après 1h ou 5h de contact entre les cellules et Ab suivi des lavages au PBS 1X, les cellules ont été lysées avec 200 µL d'eau miliQ auxquels 800 µL de PBS 5X ont été ajouté puis étalés sur des boîtes de pétri de LB. Les boîtes ont été incubées pendant 24h à 37°C. Les colonies formées ont ensuite été dénombrées.

Test d'invasion

Les cellules A549 ont été infectées selon le protocole d'infection. Les cellules, après 1h ou 5h d'incubation avec Ab, ont été lavées 10 fois avec du PBS 1X puis elles ont été traitées avec du DMEM+SVF contenant de l'hygromycine B à 300 µg/mL et de l'apramycine à 50 µg/mL (DMEM+SVF+A) pour éliminer les bactéries extracellulaires. Elles ont ensuite été incubées à 37 °C avec une concentration en CO₂ de 5%. Les cellules ont ensuite été lysées avec 800 µL d'eau miliQ à 3h, 7h, 24h ou 48h selon le temps d'invasion étudié. Le lysat a été récolté dans 200 µL de PBS 5x puis étalé sur des boîtes de pétri de LB. Les boîtes ont été incubées pendant 24h à 37°C. Les colonies formées ont ensuite été dénombrées.

Immunomarquage

Pour l'observation des cellules infectées par Ab, les cellules ont été incubées avec les anticorps dilués dans une solution de PBS 1X contenant 0,1% de saponine, 1% de BSA (Bovine Serum Albumin) et 10% de sérum de cheval pour éliminer les réactions aspécifiques. L'anticorps primaire a été incubé avec les cellules durant 1h à température ambiante suivi de deux lavages dans une solution de PBS 1X contenant 0,1% de saponine. Les cellules ont ensuite été incubées avec l'anticorps secondaire pendant 1h à température ambiante, suivi de deux lavages dans la solution de PBS 1X à 0,1% de saponine, un lavage dans du PBS 1X puis un lavage dans l'eau. La lamelle a été ensuite montée sur lame avec un milieu de montage (Prolong Gold).

Les différentes souches d'Ab ont été marquées à l'aide d'un anticorps primaire spécifique issu de l'immunisation d'un lapin (BIOTEM, France ; Eurogentec, Belgique) produit selon le protocole de Morey P. *et al.* [238]. L'anticorps reconnaissant les souches 17978/DSM30011 a été dilué au 1/20000, celui reconnaissant la souche 5075 et la souche V028900 ont été dilués respectivement au 1/5000 et au 1/10000. Les autres anticorps sont des anticorps commerciaux : celui dirigé contre p65 (NF- κ B) (Santa Cruz Biotechnology, Etats- Unis) produits également chez le lapin a été dilué au 1/250 et celui dirigé contre LAMP1 (Abcam, Angleterre) produit chez la souris a été dilué au 1/1000. Les anticorps secondaires dirigés contre ceux produits chez la souris ou le lapin sont couplés aux fluorochromes Alex-488, -555 ou -647 (Jackson ImmunoResearch, Etats-Unis). Ils ont été dilués au 1/1000 et permettent de visualiser les différentes protéines marquées. Le noyau a été marqué au DAPI dilué au 1/1000, le cytosquelette d'actine a été marqué par la phalloïdine couplée au fluorochrome Alexa-647 diluée au 1/500.

Imagerie

Analyse par imagerie confocale de l'adhésion des bactéries

Les cellules ont été infectées selon le protocole d'infection. Après 1h d'infection, les cellules ont ensuite été lavées dix fois avec du PBS 1X et fixées avec de l'Antigenfix (DiaPath) pendant 15 minutes. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois avec du PBS 1X et conservées dans du PBS 1X à 4°C jusqu'au marquage. Le marquage s'est effectué selon le protocole d'immunomarquage. Les cellules ont ensuite été observées au microscope confocale à « disque tournant » (spinning disk) Zeiss LSM710 ou Zeiss LSM800.

Analyse par imagerie confocale de la phase intracellulaire d'Ab

Les cellules A549 ont été infectées selon le protocole d'infection durant 1 h. Elles ont ensuite été lavées 10 fois avec du PBS 1X puis traitées avec le DMEM+SVF+A jusqu' 3h, 24h ou 48h. Les puits ont été lavés 3 fois avec du PBS 1X puis les cellules ont été fixées pendant 15 minutes avec de l'Antigenfix à température ambiante. Les cellules ont été ensuite lavées trois fois avec du PBS 1X et conservées dans du PBS 1X à 4°C jusqu'au marquage. Le marquage s'est effectué selon le protocole d'immunomarquage. Les cellules ont ensuite été observées au microscope confocale à « disque tournant » (spinning disk) Zeiss LSM710 ou Zeiss LSM800.

Analyse de l'activation de la voie NF- κ B

Analyse par imagerie de la translocation de NF- κ B dans le noyau

Les cellules A549 ont été infectées selon le protocole d'infection pendant 1h. Les cellules ont ensuite été lavées 3 fois avec du PBS 1X froid et fixées avec de l'Antigenfix froid pendant 15 minutes. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois avec du PBS 1X froid et conservées dans du PBS 1X à 4°C jusqu'au marquage.

Pour le marquage de NF- κ B, les lamelles ont été lavées cinq fois dans une solution de PBS 1X à 2% de BSA (PB). Elles ont été ensuite incubées six minutes dans une solution de perméabilisation à 0,1% de Triton X-100 dilué dans du PBS 1X. Après perméabilisation, les lamelles ont été lavées dans la solution PB et incubées 1h dans cette solution. Un second lavage a été effectué suivi de l'incubation avec l'anticorps primaire dilué dans une solution de PBS 1X contenant 2% de BSA, 10% de sérum de cheval et 0,1% de Triton X-100. Après 1h d'incubation avec l'anticorps primaire, les lamelles ont été lavées puis incubées pendant 1h avec l'anticorps secondaire dilué dans la même solution que le primaire. Enfin, les lamelles ont été lavées cinq fois dans une solution PBS 1X puis dans l'eau. Les lamelles ont été séchées et ensuite montées sur lame avec un milieu de montage (Prolong Gold). Les cellules ont été observées au microscope confocale à « disque tournant » (spinning disk) Zeiss 710 (LSM).

Analyse de l'activation de la voie NF- κ B : utilisation du système rapporteur A549-Dual

Les cellules A549-Duals (Invivogen, USA) ont été cultivées dans du DMEM+SVF contenant 4,5 g/L de glucose et 2mM de L-glutamine ainsi qu'avec 10 μ g/ml de blasticidine et 100 μ g/ml de zéocine pour maintenir le système rapporteur. Les cellules ont été mises en plaque de culture 96 puits à une concentration de $2,8 \times 10^5$ cellules/mL. Elles ont été stimulées au moment de leur mise en puits ou le jour suivant avec 20 μ L des différents ligands aux concentrations suivantes : Pam3CSk4 à 300 ng/mL, Flagelline à 300 ng/mL, $\alpha\alpha$ à 100 ng/mL et IL1- β à 100 ng/mL. La plaque a ensuite été centrifugée à 400 x g durant 5 minutes et incubée 24h ou 48h en présence des ligands à 37°C en présence de 5% de CO₂.

Lors de l'infection par Ab, les cellules ont été infectées le lendemain de leur mise en plaque avec une culture en phase stationnaire ou en phase exponentielle diluée à une MOI de 100

dans du DMEM+SVF contenant 4,5 g/L de glucose et 2 mM de L-glutamine. La plaque a ensuite été centrifugée à 400 x g durant 5 minutes puis elle a été incubée durant 1h à 37°C en présence de 5% de CO₂. Les cellules ont ensuite été lavées dix fois avec du PBS 1X et le milieu a été remplacé par du DMEM+SVF+A contenant 4,5 g/L de glucose et 2 mM de L-glutamine pendant 24h ou 48h.

Au temps voulu, les surnageants ont été récupérés. L'activation de la voie NF-κB a été détectée en évaluant l'activité de la SEAP à l'aide du réactif Quanti-Blue (Invivogen, USA) à une DO_{620 nm}.

Tests de cytotoxicité

Quantification de l'activité de la LDH

Les cellules A549 ont été mises en plaque de culture 96 puits à une densité de 1x10⁵ cellules/mL pour obtenir une monocouche cellulaire. Le jour suivant, les cellules ont été infectées par Ab issue d'une culture en phase stationnaire ou en phase exponentielle (dilution d'une pré-culture de nuit dans du TSB puis incubation jusqu'à obtenir une DO_{600nm} de 1) diluée à une MOI de 100 dans du DMEM+SVF. Les cellules infectées ont été centrifugées à 400 x g durant 5 minutes puis incubées pendant 1h à 37 °C avec une concentration en CO₂ de 5%. Après 1h d'incubation, les cellules ont été lavées 10 fois avec du PBS 1X puis le milieu a été remplacé par du DMEM+SVF ou par du DMEM+SVF+A. Les surnageants ont été récupérés après 6h ou 24h d'infection. Pour les puits servant de contrôle positif, les cellules ont été lysées avec une solution de Triton X-100 à 0,1%. La mort cellulaire a été quantifiée par un test enzymatique (Cytotoxicity Detection Kit, Roche) détectant l'activité de la LDH libérée dans le milieu cellulaire. Le kit a été utilisé en suivant les recommandations du fournisseur.

Quantification de l'incorporation de l'IP par les cellules

L'infection des cellules s'est déroulée dans les mêmes conditions que celle du test par mesure de l'activité LDH. Les cellules ont été infectées par Ab issue d'une culture en phase stationnaire diluée à une MOI de 100 dans du DMEM+SVF. Les cellules infectées ont ensuite été centrifugées à 400 x g, 5 minutes puis incubées durant 1h à 37 °C avec une concentration en CO₂ de 5%. Elles ont ensuite été lavées dix fois avec du PBS 1X. Le milieu a été alors remplacé par du DMEM+SVF contenant du l'IP à 5 µg/mL. L'incorporation par

les cellules a été enregistrée en temps réel par lecture de la fluorescence toutes les 15 minutes.

Analyse de la sécrétion d'IL-6 par les cellules

Les cellules A549 ont été mises en plaque de culture 96 puits à une densité de 1×10^5 cellules/mL. Le lendemain, les cellules ont été infectées par Ab issue d'une culture en phase stationnaire diluée à une MOI de 100 dans du DMEM+SVF. Les cellules infectées ont été centrifugées à $400 \times g$ durant 5 minutes et ensuite incubées à 37°C avec une concentration en CO_2 de 5%. Après 1h d'incubation, les cellules ont été lavées 10 fois avec du PBS 1X puis le milieu a été remplacé par du DMEM+SVF+A. Les surnageants ont été récupérés après 8h, 24h ou 48h d'infection. La concentration d'IL-6 a été quantifiée par un test ELISA (Human IL-6 ELISA Ready-SET-Go!, Thermofisher, USA) en suivant les recommandations du fournisseur.

Polarisations des cellules Calu3

Les cellules épithéliales pulmonaires Calu3 ont été entretenues selon le protocole de Harcourt, J.L *et al.* [239]. Brièvement, les cellules ont été maintenues en flasque de 75 cm^2 à 37°C avec une concentration en CO_2 de 5% dans du MEM (Eagle's Minimum Essential Medium) complété avec du 20% de SVF, 0,1 mM d'acide aminés non essentiels, 2 mM de L-glutamine et 10 mM d'HEPES à un $\text{pH}=7,4$. Les cellules ont ensuite été passées en insert à une concentration de 2×10^6 cellules/mL et maintenues en insert avec du MEM+10% SVF.

En condition de culture liquide (LCC), où les côtés apicaux et basaux sont immergés dans le milieu de culture. Le milieu de culture a été remplacé trois jours après la mise en insert puis en suivant un cycle tous les quatre et trois jours.

En condition AIC, où le côté basal est immergé dans le milieu de culture tandis que le côté apical ne l'est pas. Le milieu de culture a été retiré côté apical et remplacé du côté basolatéral trois jours après la mise en insert puis en suivant un cycle tous les quatre et trois jours.

Evaluation de la TER

Elle s'est faite principalement au moment du changement du milieu de culture. La TER a été mesurée à l'aide d'une électrode, préalablement stérilisée, trente minutes après le

100

changement de milieu pour permettre sa stabilisation. L'électrode est placée entre le puits et l'insert, deux mesures par puits ont été réalisées.

Pour les inserts de culture en condition AIC, l'évaluation de la TER a nécessité l'ajout de milieu MEM+SVF côté apical. Ce milieu a été retiré après évaluation de la TER.

Test de perméabilité de la monocouche polarisée de Calu3

Les inserts contenant les monocouches de Calu3 polarisées à tester ont été lavés côté apical et basal une fois avec du PBS 1X stérile. Le milieu coté basolatéral a été remplacé par une solution non fluorescente (18 mM de NaCl ; 4,75 mM de KCl ; 2,53 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2,44 mM de MgSO_4 ; 1,19 mM de KH_2PO_4 ; 25 mM de NaHCO_3 dilué dans de l'eau stérile puis filtré avec un filtre ayant des pores de 0,45 μm). Coté apical, le PBS a été remplacé par la solution contenant la fluorescéine diluée dans la solution non-fluorescente à 1 mg/mL. Un insert sans cellules a été utilisé pour évaluer le passage de la fluorescéine du côté apical au côté basolatéral, correspond à 100% de passage. Les inserts contenant la solution de fluorescéine ont été centrifugés ou non puis incubés durant 1h à 37 °C avec une concentration en CO_2 de 5%. Les solutions basolatérales ont été ensuite récupérées. Le passage de la fluorescéine du côté apical au côté basolatéral a été évalué par mesure de la $\text{DO}_{490\text{nm}}$. Une gamme de dilution de la fluorescéine a été effectuée pour permettre la comparaison des résultats de DO et de la concentration de la solution.

Chapitre 3

Relatedness of wildlife and livestock avian isolates of the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* to lineages spread in hospitals worldwide

Gottfried Wilharm, Evelyn Skiebe, Paul G. Higgins, Marie T. Poppel, Ulrike Blaschke, Sarah Leser, Christine Heider, Magdalena Heindorf, Paul Brauner, Udo Jäckel, Karin Böhlend, Christiane Cuny, Andżelina Łopińska, Piotr Kaminski, Mariusz Kasprzak, Marcin Bochenski, Olaf Ciebiera, Marcin Tobółka, Katarzyna M. Żołnierowicz, Joachim Siekiera, Harald Seifert, **Stéphanie Gagné**, Suzana P. Salcedo, Michael Kaatz, Franziska Layer, Jennifer K. Bender, Stephan Fuchs, Torsten Semmler, Yvonne Pfeifer, Leszek Jerzak
Environ Microbiol. 2017 doi : 10.1111/1462-2920

A l'heure où le réservoir naturel d'Ab n'est pas connu, cette étude a cherché à savoir si Ab pouvait avoir un réservoir aviaire. Des échantillons trachéaux et rectaux chez des oiseaux sauvages et d'élevages ont été prélevés à travers l'Allemagne et la Pologne. Ab a été retrouvé dans respectivement 3%, 8% et 25% des échantillons issus de poulets, d'oies et de cigognes. Davantage d'isolats d'Ab ont été extraits des échantillons trachéaux. Cependant les deux échantillonnages apportent des informations. Des cas montrent que les souches d'Ab isolées chez un même individu au niveau de la trachée et du rectum, peuvent être différentes. De même chez un individu, des échantillons trachéaux positifs ne sont pas toujours corrélés à des échantillons rectaux positifs. Enfin lors d'échantillonnages chez des poussins identifiés une première fois comme porteurs d'Ab, aucune souche n'a été isolée une seconde fois suggérant que le portage soit transitoire. Cependant de nouvelles souches ont été détecté chez ces poussins. Ab a été également identifiée dans des échantillons de nourriture régurgités de cigogne, alors que les échantillons rectaux et trachéaux étaient négatifs chez ces mêmes cigognes.

L'analyse génétique des souches isolées montre une grande diversité au niveau des isolats. Certaines souches aviaires sont proches génétiquement d'isolats cliniques. Plus d'un tiers des isolats sont naturellement compétents. Enfin la virulence de ces isolats a été

comparée à celle des isolats cliniques chez *G. mellonella*, aucune différence dans le taux de mortalité a été observé. De même, des capacités identiques à adhérer aux cellules eucaryotes voir plus importante pour certaines souches aviaires ont été observé par rapport aux isolats cliniques d'Ab.

En conclusion, cette étude montre qu'Ab peut avoir un réservoir aviaire même transitoire et met en évidence la complexité à identifier un réservoir à Ab. La grande diversité génétique des isolats et leur compétence naturelle en font un réservoir génétique important. De plus, les oiseaux pourraient permettre une dissémination au niveau internationale de souches en raison de leur flux migratoire.

J'ai contribué à ce travail en réalisant les tests d'adhésion comparant l'adhésion des souches aviaires aux souches cliniques.

Relatedness of wildlife and livestock avian isolates of the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* to lineages spread in hospitals worldwide

Gottfried Wilharm ^{1*}, Evelyn Skiebe,¹
Paul G. Higgins,^{2,3} Marie T. Poppel,¹
Ulrike Blaschke,¹ Sarah Leser,¹ Christine Heider,¹
Magdalena Heindorf,¹ Paul Brauner,⁴ Udo Jäckel,⁴
Karin Böhland,⁵ Christiane Cuny,¹
Andżelina Łopińska,⁶ Piotr Kaminski,^{6,7}
Mariusz Kasprzak,⁶ Marcin Bochenski,⁶
Olaf Ciebiera,⁶ Marcin Tobółka,⁸
Katarzyna M. Żołnierowicz,⁸ Joachim Siekiera,⁹
Harald Seifert,^{2,3} Stéphanie Gagné,¹⁰
Suzana P. Salcedo,¹⁰ Michael Kaatz,¹¹
Franziska Layer,¹ Jennifer K. Bender,¹
Stephan Fuchs,¹ Torsten Semmler,¹²
Yvonne Pfeifer¹ and Leszek Jerzak⁶

¹Wernigerode Branch, Robert Koch Institute, Burgstr. 37, Wernigerode, D-38855, Germany.

²Institute for Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, University of Cologne, Cologne, D-50935, Germany.

³Partner site Bonn-Cologne, German Centre for Infection Research (DZIF), Germany.

⁴Federal Institute for Occupational Safety and Health (BAuA), Nöldnerstr. 40-42, Berlin, D-10317, Germany.

⁵Im Winkel 3, Deersheim, D-38835, Germany.

⁶Faculty of Biological Sciences, University of Zielona Góra, Prof. Z. Szafrana Street 1, 65-561 Zielona Góra, Poland.

⁷Nicolaus Copernicus University in Toruń, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Department of Ecology and Environmental Protection, M. Skłodowska-Curie St. 9, PL 85-094 Bydgoszcz, Poland.

⁸Institute of Zoology, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 71C, 60-625 Poznań, Poland.

⁹Ul. Rzeczna 17, 47-300 Żywocice, Poland.

¹⁰Laboratory of Molecular Microbiology and Structural Biochemistry, University of Lyon, CNRS UMR 5086, Lyon, F-69367, France.

¹¹Vogelschutzwarte Storchenhof Loburg e.V., Chausseestr. 18, Loburg, D-39279, Germany.

¹²Robert Koch Institute, Nordufer 20, Berlin, D-13353, Germany.

Summary

The natural habitats and potential reservoirs of the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* are poorly defined. Here, we put forth and tested the hypothesis of avian reservoirs of *A. baumannii*. We screened tracheal and rectal swab samples from livestock (chicken, geese) and wild birds (white stork nestlings) and isolated *A. baumannii* from 3% of sampled chicken ($n = 220$), 8% of geese ($n = 40$) and 25% of white stork nestlings ($n = 661$). Virulence of selected avian *A. baumannii* isolates was comparable to that of clinical isolates in the *Galleria mellonella* infection model. Whole genome sequencing revealed the close relationship of an antibiotic-susceptible chicken isolate from Germany with a multidrug-resistant human clinical isolate from China and additional linkages between livestock isolates and human clinical isolates related to international clonal lineages. Moreover, we identified stork isolates related to human clinical isolates from the United States. Multilocus sequence typing disclosed further kinship between avian and human isolates. Avian isolates do not form a distinct clade within the phylogeny of *A. baumannii*, instead they diverge into different lineages. Further, we provide evidence that *A. baumannii* is constantly present in the habitats occupied by storks. Collectively, our study suggests *A. baumannii* could be a zoonotic organism that may disseminate into livestock.

Introduction

Acinetobacter baumannii is a Gram-negative bacterium which causes nosocomial infections worldwide and has the propensity to rapidly develop antibiotic resistance (Karageorgopoulos and Falagas, 2008; Howard *et al.*, 2012). It is assigned to the so-called ESKAPE pathogens (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*

Received 7 October, 2016; accepted 14 September, 2017. *For correspondence. E-mail wilharmg@rki.de; Tel. +49 30 18754 4282; Fax +49 30 18754 4207.

© 2017 The Authors. Environmental Microbiology published by Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd
This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

pneumoniae, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* spp.) which share an outstanding potential to escape current antimicrobial therapy posing the threat of loss of any therapeutic options (Rice, 2008; Pendleton *et al.*, 2013). For unknown reasons the prevalence of *A. baumannii* infections in intensive care units differs considerably from hospital to hospital and between geographical regions, ranging from 3.7% in North America to 19.2% in Asia (Vincent *et al.*, 2009). In tropical climates, *A. baumannii* is also a cause of community-acquired infections (Dexter *et al.*, 2015; Pailhories *et al.*, 2015). The natural reservoirs of *A. baumannii* and of other clinically relevant *Acinetobacter* species such as *A. nosocomialis* are poorly defined (Peleg *et al.*, 2008; Eveillard *et al.*, 2013) impeding effective prevention of transmission. Healthy humans only rarely carry *A. baumannii* on their skin (Seifert *et al.*, 1997). Likewise, environmental sampling only sporadically yielded *A. baumannii* (Choi *et al.*, 2012; Eveillard *et al.*, 2013). The bacteria have also been isolated from the exoskeleton of the moth fly *Clogmia albipunctata* in German hospitals suggesting a role of insects as potential vectors (Faulde and Spiesberger, 2013). Highest isolation rates so far have been identified in human head and body lice (La Scola and Raoult, 2004; Kempf *et al.*, 2012a,b). However, *A. baumannii* strain SDF recovered from a human body louse represents an ecotype clearly distinct from clinical isolates (Vallenet *et al.*, 2008; Peleg *et al.*, 2009; Antunes *et al.*, 2011). In recent studies on the environmental prevalence of *Acinetobacter* in Lebanon, *A. baumannii* and *A. pittii* were isolated from water, sewage and soil samples and also from various animals at a rate up to 8%, notably from cow feces (Rafei *et al.*, 2015; Al Atrouni *et al.*, 2016). Also recently, raw meat samples in Switzerland were found to be contaminated with *A. baumannii* at an overall rate of 25% (Lupo *et al.*, 2014).

There is a worldwide spread of different clonal lineages of *A. baumannii* in hospitals (Dijkshoorn *et al.*, 1996; Diancourt *et al.*, 2010; Higgins *et al.*, 2010). However, parts of the clinical isolates do not cluster with these worldwide clonal lineages or their distribution is geographically restricted (Karah *et al.*, 2012; Schleicher *et al.*, 2013; Bocanegra-Ibarias *et al.*, 2015), suggesting a perpetual influx of novel strains from unknown reservoirs into the clinical setting. Recent whole-genome sequencing of almost 50 isolates from a single hospital in the United States provided evidence of a large reservoir of strains that interact with each other via horizontal gene transfer suggesting that isolates unrelated to described clonal lineages contribute significantly to evolution of hospital lineages (Wright *et al.*, 2014).

A. baumannii and some related *Acinetobacter* species easily grow at 41–44°C (Nemec *et al.*, 2011). This could reflect adaptation to hosts with core body temperatures above 37°C such as birds in particular (Line *et al.*, 2010). *A. baumannii* has only sporadically been isolated from

birds so far (Ahmed *et al.*, 2007; Muller *et al.*, 2010; Zordan *et al.*, 2011; Rafei *et al.*, 2015). However, workers in hatcheries show elevated immunoprecipitation reactions to *A. baumannii* (Skorska *et al.*, 2007; Brauner *et al.*, 2017). In line with this finding, *A. baumannii* could be cultivated from air samples collected in a duck hatchery (Martin and Jäckel, 2011). Based on these findings we have hypothesized that birds could be a reservoir of *A. baumannii*.

Results

Isolation of *A. baumannii* from chickens

To challenge our hypothesis of avian reservoirs of *A. baumannii* we initially collected samples from poultry livestock. We chose a culture-based approach using CHROMagar™ *Acinetobacter* to select *A. baumannii* from swab samples. In the year 2012, we took choana swabs from 220 chickens in Germany, including 21 at the fledgling stage, representing 37 flocks. We could isolate *A. baumannii* from six samples (2.7%). Speciation was based on partial 16S rRNA and *rpoB* gene sequencing as well as determination of the complete coding sequence of the *bla*_{OXA-51-like} gene intrinsic to *A. baumannii* (Weisburg *et al.*, 1991; Turton *et al.*, 2006a; Nemec *et al.*, 2009). The six *A. baumannii* isolates originated from three different farms. Three of the isolates (designated 65, 66 and 117) were from the same flock of chicks at the fledgling stage, two (designated 62 and 124) were from a flock of one day-old chicks of another farm, and one (designated 202) was from a hen of a third farm. Apal macrorestriction analysis demonstrated that the three isolates (65, 66, 117) from the same flock were closely related (Fig. 1). The two isolates (62, 124) from the other farm were also closely related but distinct from isolates 65, 66 and 117. Strikingly, the single isolate 202 recovered from a hen of another farm was also closely related to the three isolates 65, 66 and 117 from the fledgling herd (Fig. 1). The close relationship of isolates 65, 66, 117 and 202 was further substantiated by DNA sequencing of the *bla*_{OXA-51-like} gene which revealed the OXA-68 variant in all four cases. We found no relation between these samples other than sampling by the same person and originating from the same region in Germany. The two distinct isolates 62 and 124 recovered from another farm both harboured a novel *bla*_{OXA-51-like} gene variant, OXA-385 (Table 1). The latter two isolates exhibited resistance to gentamicin and kanamycin which was not observed with the four isolates harbouring OXA-68. Sequence-based typing using multiplex PCR (Turton *et al.*, 2007) and rep-PCR analyses (Zander *et al.*, 2012) did not suggest a close relationship of the chicken isolates to any of the international clonal lineages (ICs) highly prevalent in hospitals worldwide (data not shown).

In addition, 22 pooled faecal samples representing 10 flocks of chicken were sampled in Germany. None of these faecal samples yielded *A. baumannii*.

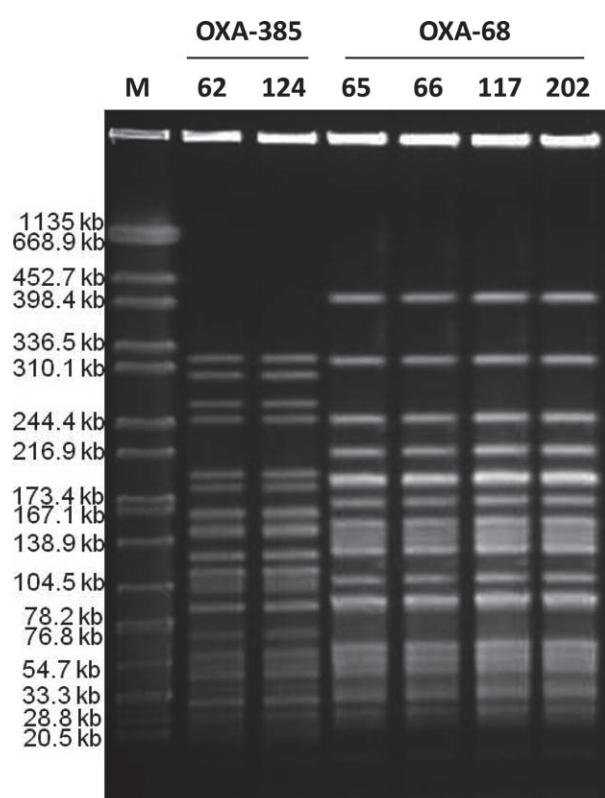


Fig. 1. Apal macrorestriction analysis of six *A. baumannii* chicken isolates from Germany. DNA restriction pattern of six chicken isolates after Apal digestion and subsequent pulsed-field gel electrophoresis. M, size standard *Salmonella* serotype Braenderup strain H9812, restricted with XbaI. OXA-variants are indicated above isolate numbers.

Isolation of *A. baumannii* from geese

We took choana swabs from 40 goslings from a single farm in Germany in the year 2013, and isolated *A. baumannii* from three of these chicks (7.5%). The three isolates (designated 3.3A, 3.5D and 4.1V) carried different variants of the *bla*_{OXA-51-like} gene encoding OXA-314, OXA-71 and OXA-95, respectively (Table 1). Apal macrorestriction analysis and sequence-based typing according to Turton *et al.* (2007) did not indicate a close relationship to international clones IC1–3 (data not shown). Antimicrobial resistance testing of one of the isolates (4.1V) showed intermediate susceptibility to kanamycin and resistance to sulfamerazine and sulfamerazine-trimethoprim suggesting a history of selection pressure of this strain in the context of livestock production.

Taken together these findings illustrate a first indication for dissemination of *A. baumannii* within poultry livestock. However, the relatively low incidence turned our attention towards wild birds especially since transmission from humans to livestock cannot be ruled out as an explanation for our findings in chicken and geese. Further, we speculated that migratory birds could contribute to the dispersion of *A.*

baumannii from tropical high-incidence countries to low incidence regions with temperate climates (Vincent *et al.*, 2009).

Stork sampling in western Poland in the year 2013

In 2013, we sampled 72 white stork nestlings from different regions in western Poland (voivodships Lubuskie and Lower Silesia; see Supporting Information Fig. S1). Some storks were sampled up to four times (samplings on June 4th, 14th, 21st and July 1st) adding up to 136 choana swabs originating from 72 adolescent storks. Overall, 24 *A. baumannii* isolates were obtained from 72 individuals (33%) (Table 1, serial no. 18–41; Supporting Information Figs. S2–S4). Accordingly, the isolation rate in relation to the number of 136 samples was 18%. Not in a single case the same *A. baumannii* strain was isolated from a resampled individual. Also among chick siblings the diversity of isolates was striking. Partial *rpoB* and complete *bla*_{OXA-51-like} gene sequencing as well as Apal macrorestriction analysis revealed indistinguishable isolates among siblings in only two pairs of siblings; one pair from a nest in Kłopot (Lubuskie; isolates 151/1C and 152/1C in nest KLO_02/04; see Table 1 and Supporting Information Figs. S2 and S4) and another pair from a nest in Kamiona (Lower Silesia; isolates 284/2C and 285/2C; see Supporting Information Fig. S3 and Table 1). By contrast, in another nest in Kłopot (KLO_14/14) three out of five nestlings were found to be colonized at the same time, but each with a different strain (87D C, 88B C, 90/3C) (Table 1 and Supporting Information Fig. S4). Resampling of the two surviving chicks only a week later yielded one new strain (159/1C) in a previously colonized nestling but no recovery of any of the strains isolated before (Table 1 and Supporting Information Fig. S4). In addition to *A. baumannii*, we isolated *Acinetobacter variabilis* (Tjernberg and Ursing, 1989; Krizova *et al.*, 2015) from 21 out of 136 samples (15%). This speciation was based on *rpoB* partial gene sequence analysis which revealed a similarity to *A. variabilis* type strain NIPH 2171^T (EU477119) of $\geq 98\%$ in all cases. As expected, recovery of the environmental species *Acinetobacter calcoaceticus* was high and found in 75 of 136 samples (55%). Other *Acinetobacter* species as classified by *rpoB* partial gene analysis (similarity $\geq 98\%$ in comparison to the respective type strain) such as *A. schindleri*, *A. lwoffii*, *A. junii* and the recently described *A. gandensis* (Smet *et al.*, 2014) were only sporadically isolated. As the suitability of CHROMagar *Acinetobacter* for isolation of *Acinetobacter* species other than *A. baumannii* is unknown, their observed incidence is possibly an underestimate.

Stork sampling in northeastern Poland

In addition, in 2013 we sampled 50 white stork nestlings from the voivodship Warmińsko-Mazurskie in northeastern Poland and isolated *A. baumannii* from choana

Table 1. Characteristics of *A. baumannii* isolates of avian origin.

Serial no.	Strain no.	Year of isolation	Host	Sample type	Geographic region	Natural competence	Oxa-type	GenBank
1	62	2012	Chicken	Hen chick, 1 day; choana	Germany	KanR	385	
2	65	2012	Chicken	Hen chick; choana	Germany	yes	68	
3	66	2012	Chicken	Hen chick; choana	Germany	yes	68	
4	117	2012	Chicken	Hen chick; choana	Germany	yes	68	
5	124	2012	Chicken	Hen chick, 1 day; choana	Germany	KanR	385	KF986253
6	202	2012	chicken	Hen; choana	Germany	yes	68	
7	3.3A	2013	Goose	Choana	Germany	no	314	
8	3.5D	2013	Goose	Choana	Germany	no	71	
9	4.1V	2013	Goose	Choana	Germany	KanR	95	
10	I B1	2008	Duck*	Air sample; duck hatchery	Germany	no	120	
11	I B2	2008	Duck*	Air sample; duck hatchery	Germany	no	375	
12	I B3	2008	Duck*	Air sample; duck hatchery	Germany	no	386	KF986254
13	II B9	2008	Duck*	Air sample; duck hatchery	Germany	no	375	
14	II B12	2008	duck*	Air sample; duck hatchery	Germany	no	386	
15	I B25	2008	Duck*	Air sample; duck hatchery	Germany	no	375	
16	II B29	2008	Duck*	Air sample; duck hatchery	Germany	no	375	
17	III B30	2008	Duck*	Air sample; duck hatchery	Germany	no	386	
18	77II/1C	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Kłopot	no	93	
19	86II/2C	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Kłopot	yes	374	KF986255
20	87DC	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Kłopot	yes	314	
21	88BC	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Kłopot	no	67	
22	90/3C	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Kłopot	yes	375	KF986256
23	97/1C	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Kłopot	yes	376	KF986257
24	101II/1C	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Kłopot	no	377	KF986258
25	150/1C	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Kłopot	yes	388	KJ135343
26	151/1C	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Kłopot	no	378	KF986259
27	152/1C	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Kłopot	no	378	
28	156/2C	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Kłopot	yes	379	KF986260
29	159/1C	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Kłopot	no	65	
30	191/2C	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Rybaki	no	380	KF986261
31	192/2C	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Połęczko	yes	381	KJ135344
32	261/1C	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Kłopot	yes	non-functional	
33	268/2C	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Bytomiec	yes	382	KJ135345
34	276/2C	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Połęczko	no	383	KF986262
35	277/1C	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Połęczko	yes	389	KJ135346
36	278/3C	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Stary Raduszec	no	51	
37	279/3C	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Stary Raduszec	no	51	
38	280/1C	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Czarnowo	no	378	
39	284/2C	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Kamiona	no	384	KF986263
40	285/2C	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Kamiona	yes	384	
41	291/1C	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Moszowice	no	90	
42	638C	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Saduny	no	67	
43	658C	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Podlechy	no	390	KJ135342
44	661C	2013	White stork	Nestling; choana	Poland, Korsze	no	390	
45	8D1	2014	White stork	Nestling; choana	Poland, Kłopot	no	69	
46	9D1	2014	White stork	Nestling; choana	Poland, Kłopot	no	90	
47	15D1	2014	White stork	Nestling; choana	Poland, Kłopot	no	104	

Table 1. *cont.*

Serial no.	Strain no.	Year of isolation	Host	Sample type	Geographic region	Natural competence	Oxa-type	GenBank
48	29D2	2014	White stork	Nestling; choana	Poland, Bytomiec	yes	51	
49	31D1	2014	White stork	Nestling; choana	Poland, Bytomiec	yes	338	
50	32D1	2014	White stork	Nestling; choana	Poland, Rybaki	yes	429	KM979376
51	33D1	2014	White stork	Nestling; choana	Poland, Rybaki	yes	104	
52	41D1	2014	White stork	Nestling; choana	Poland, Wezyska	yes	413	
53	47D2	2014	White stork	Nestling; choana	Poland, Dabie	yes	413	
54	49D1	2014	White stork	Nestling; choana	Poland, Dabie	yes	430	KM979377
55	73D4	2014	White stork	Nestling; choana	Poland, Siedlisko	yes	402	
56	29R1	2014	White stork	Nestling; rectal	Poland, Bytomiec	no	51	
57	42R3	2014	White stork	Nestling; rectal	Poland, Wezyska	yes	378	
58	1P1	2014	White stork	Pellet from stork	Poland, Kłopot	yes	208	
59	1PW1	2014	White stork	Pellet from stork	Poland, Kłopot	yes	431	KM979378
60	2P1	2014	White stork	Pellet from stork	Poland, Kłopot	no	69	
61	2P2	2014	White stork	Pellet from stork	Poland, Kłopot	no	432	KM979379
62	2P3	2014	White stork	Pellet from stork	Poland, Kłopot	no	379	
63	2PW1	2014	White stork	Pellet from stork	Poland, Kłopot	no	433	KM979380
64	4P1	2014	White stork	Pellet from stork	Poland, Kłopot	yes	431	
65	GaenseEi-1	2016	Goose	Egg shells from hatchery	Germany	n.d.	378	
66	Gaensemehl-2	2016	Goose	Down and dust from hatchery	Germany	n.d.	64	
67	BAuABod-3	2015	Turkey	Down and dust from hatchery	Germany	n.d.	64	
68	GB1-2	2015	Chicken	Down and dust from hatchery	Germany	n.d.	68	
69	LoGelst3-1	2015	White stork	Pellet from stork	Germany, Isterbies	n.d.	378	
70	O1D3-2	2016	White stork	Pellet from stork	Germany, Rosian	n.d.	374	
71	PLG9P835	2016	White stork	Nestling; choana	Poland, Steblów	n.d.	374	

Kan^R, minimal inhibitory concentration of kanamycin ≥ 32 µg/ml in a microbroth dilution assay; *Probably of duck origin since the isolates were recovered from air samples collected in a duck hatchery; n.d., not determined; prototypic new OXA-51 types indicated in light grey; whole genome sequenced isolates are indicated by dark grey background.

swabs from only three of these nestlings (6%; Table 1 and Supporting Information Fig S5). This comparably low prevalence can probably be attributed to an accidental delay of sample processing. After all, this finding demonstrates that the appearance of *A. baumannii* in white stork nestlings is not restricted to western Poland. The three isolates from Warmińsko-Mazurskie were obtained from three different nests in neighbouring villages. Two isolates from different nests (658C and 661C) were indistinguishable based on partial *rpoB* and full *bla*_{OXA-51-like} gene (OXA-390) sequencing as well as Apal macrorestriction analysis (Table 1 and Fig. 2). The distance between the two nests was approximately 2 kilometres. However, a close relationship of the latter two isolates to an isolate recovered in western Poland in 2014 (2P2) as suggested by identical *rpoB* partial sequences and similar *bla*_{OXA-51-like} genes was not confirmed by Apal macrorestriction analysis (Fig. 2).

Stork sampling in western Poland in the year 2014

To confirm our findings we repeated sampling of white stork nestlings in western Poland in the year 2014. We collected

87 choana swabs from 87 individuals and isolated *A. baumannii* from 11 nestlings (13%) (Table 1). *A. variabilis* was isolated from 24 individuals (30%). In addition, we identified four isolates of *Acinetobacter pittii*, another clinically relevant species which we had not identified in the previous year. Again, we observed a distinct diversity among the 11 isolates of *A. baumannii* (Table 1, no. 45–55) as indicated by the finding of nine different *bla*_{OXA-51-like} variants at the translational level. All 11 isolates including six isolates recovered from three pairs of siblings were distinguishable on the basis of Apal macrorestriction analysis (data not shown).

Rectal sampling in comparison to choana sampling

In 2014, we took rectal samples from 52 white stork nestlings in parallel to choana sampling. Only in two cases (4%) we isolated *A. baumannii* from rectal swabs (isolates 29R1 and 42R3, see Table 1), whereas parallel choana sampling of these 52 individuals revealed isolation of *A. baumannii* from ten nestlings (19%). Interestingly, in the case of rectal isolate 42R3 no isolate was recovered from the corresponding choana sample, and in the case of the

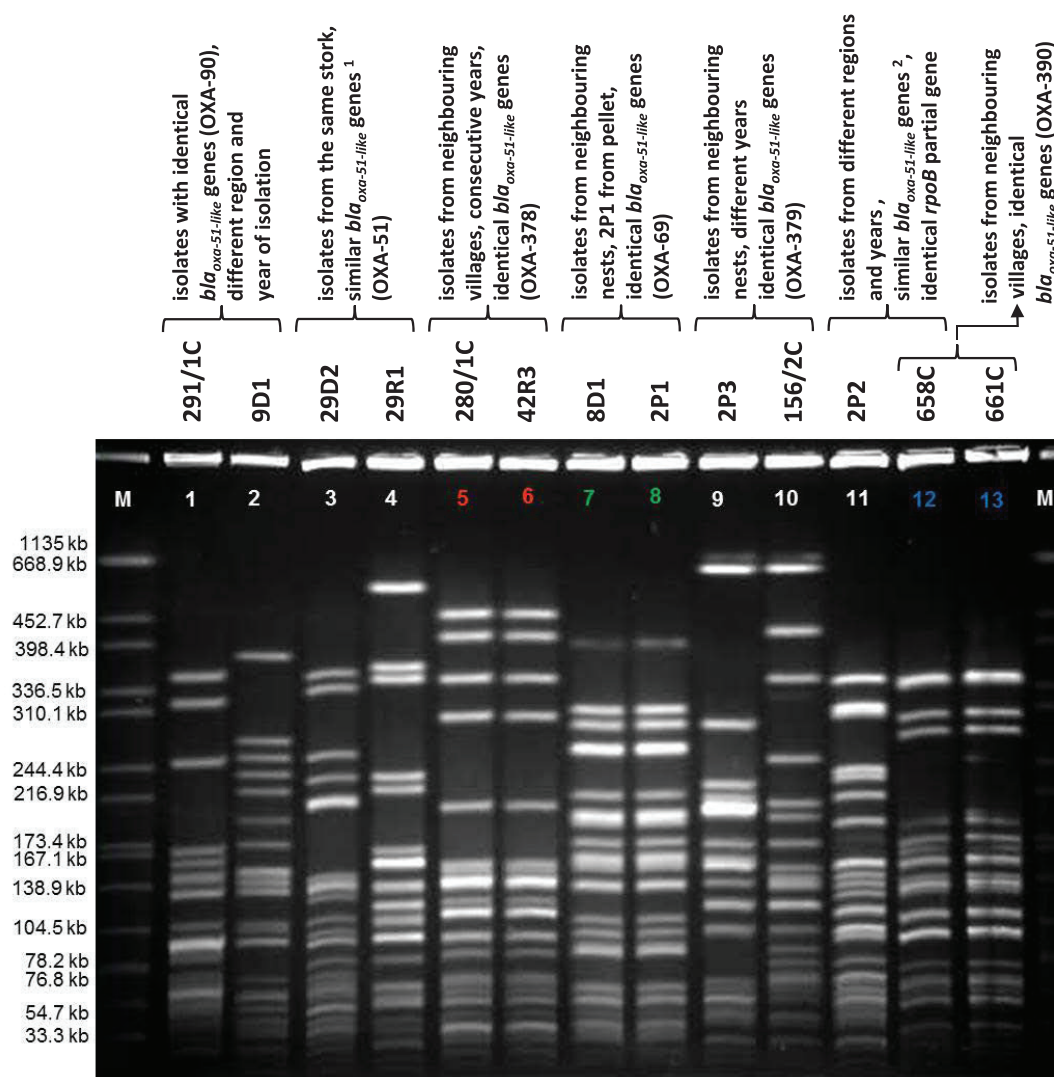


Fig. 2. Apal macrorestriction analysis of selected *A. baumannii* isolated from white stork samples collected in Poland. DNA restriction pattern of 13 stork-associated isolates after Apal digestion and subsequent pulsed-field gel electrophoresis. M, size standard *Salmonella* serotype Braenderup strain H9812, restricted with XbaI. Color code indicates pairs of isolates with closely related restriction pattern (≤ 3 differences). ¹2 nucleotides (nts) different per 822 nts; ²3 nts different per 822 nts.

second rectal isolate (29R1) the corresponding choana sampling revealed an isolate (29D2) clearly distinct from the rectal isolate (Fig. 2). In conclusion, while choana sampling yields higher isolation rates, rectal sampling can provide additional isolates independent of the yield of choana sampling.

Continuation of white stork sampling

Sampling of white stork nestlings in Poland was continued in 2015 and 2016 and expanded to additional regions located in the voivodships Opole and Greater Poland (Supporting Information Fig. S1). Table 2 summarizes our results of choana sampling of white stork nestlings in Poland from 2013 to 2016. The overall isolation rate based

on the sampling of 661 individuals was 25%. Strikingly high isolation rates were found in the Opole region (48% and 47%) while variable rates were documented for the Greater Poland region (4% and 33%) indicating significant ecological differences.

Isolation of the same clone in consecutive years

When comparing isolates from 2013 to 2014 we realized that isolate 280/1C, recovered from the choana of a nestling in Czarnowo in the year 2013, was closely related to rectal isolate 42R3 recovered in the neighbouring village Wężyska in the year 2014 (Supporting Information Fig. S6). These isolates share the same Apal macrorestriction

Table 2. Summary of choana sampling on white stork nestlings in Poland 2013–2016.

Region in Poland	Year	No. of storks sampled	No. of choana samples	No. of choana samples culture-positive for <i>A. baumannii</i>	No. of isolates ^a	Isolation rate % ^b
Lubuskie and Lower Silesia	2013	72	136 ^c	24	24	18
	2014	87	87	11	11	13
	2015	69	89 ^d	23	23	26
	2016	73	73	27	30	37
Warmińsko-Mazurskie ^e	2013	50	50	3	3	6
Opole	2015	96	96	46	58	48
	2016	53	53	25	31	47
Greater Poland	2015	85	85	3	3	4
	2016	76	76	25	29	33
Total of all regions	2013–2016	661	745	187	212	25

a. Multiple distinguishable *A. baumannii* isolates from some stork individuals.

b. No. of choana samples tested culture-positive for *A. baumannii* divided by no. of choana samples.

c. Multiple sampling of some nestlings within 4 weeks.

d. Twenty storks were sampled twice in the choana region.

e. Data possibly biased due to irregular sample transport (8 days without cooling).

pattern and the same *bla*_{OXA-51-like} gene encoding OXA-378 (Fig. 2).

Stork pellets as a new sample source

Storks regurgitate undigested parts of their food in the form of pellets. In the year 2014, we collected four pellets from below a single nest in Kłopot village (Supporting Information Fig. S7). We isolated *A. baumannii* from three out of four of these pellets and were able to differentiate six strain types among the seven isolates based on *bla*_{OXA51-like} gene sequences (Table 1, serial no. 58–64). On the contrary, we were unable to isolate any *A. baumannii* from choana and rectal swab samples drawn from the four chicks growing up in this specific nest. Of further interest, based on *bla*_{OXA-51-like} gene sequences as well as Apal macrorestriction analysis, one pellet isolate (2P1) was indistinguishable from the nestling isolate 8D1 which was recovered from a nest in close vicinity to the one from where we collected the pellets (Fig. 2 and Supporting Information Figs. S7 and S8). Taken together these findings suggest that stork pellets represent an easily accessible sample material for isolation of *A. baumannii*.

Diversity of the *bla*_{OXA-51-like} gene

Overall, the diversity of the *bla*_{OXA-51-like} gene sequenced from stork isolates was high. Among the 47 isolates (including those obtained from pellets) isolated in 2013 and 2014 we identified a total of 30 variants of *bla*_{OXA-51-like} on the translational level and 19 of these were novel in a sense that they were not represented by any database entry accessible via BLAST (see Table 1 for GenBank accession numbers). Only a single *bla*_{OXA-51-like} gene was

found to be non-functional due to introduction of an internal stop codon (Table 1, isolate 261/1C).

Avian isolates exhibit OXA variants known from international clonal lineages

It was described that typing of clinical isolates of *A. baumannii* belonging to international clones (IC) by rep-PCR and multilocus sequence typing (MLST) correlates well with specific variants of *bla*_{OXA-51-like} (Zander *et al.*, 2012; Pournaras *et al.*, 2014). Here, we have identified a number of *bla*_{OXA-51-like} genes in avian isolates encoding protein variants such as OXA-51, –65, –68, –69, –71 and –90 known to be associated with clinical *A. baumannii* lineages IC1, 3–6 and 8 (Zander *et al.*, 2012). However, on the nucleotide level none of the avian isolates carried a *bla*_{OXA-51-like} gene identical to any database entry. Next, we have typed representatives of these OXA-variants by rep-PCR but found no significant similarity to any of the clinical *A. baumannii* IC lineages (Supporting Information Fig. S9). Taken together, identity of avian isolates' OXA proteins to that found in IC lineages does not necessarily indicate a close relationship to clinical strains.

Natural transformation competence is widespread among avian isolates

We recently demonstrated that natural transformation competence is widespread among clinical isolates of *A. baumannii* with about one third of the clinical isolates being competent under conditions that promote motility along wet surfaces (Wilharm *et al.*, 2013). Here, we have tested natural competence of all avian isolates that we had recovered between 2012 and 2014, with the exception of three isolates resistant to kanamycin, the antibiotic used for

selection of transformants. In addition, eight isolates recently recovered from air samples in a duck hatchery (Martin and Jäckel, 2011) were included (Table 1, serial no. 10–17). Overall, we found that 27 of 61 avian isolates (44%) were competent for transformation under the conditions tested (Table 1) which is even higher than the rate recently determined for kanamycin-sensitive clinical isolates (36%) (Wilharm *et al.*, 2013).

Antibiotic resistance

Apart from natural resistance to ampicillin and cephalosporins not a single *A. baumannii* stork isolate was resistant to kanamycin, gentamicin, amikacin, ciprofloxacin, sulfamerazine and meropenem, and no isolate was positive for an acquired carbapenemase gene indicating the absence of substantial anthropogenic selection pressure. Only some of the isolates from livestock showed signs of selection pressure such as chicken isolates 62 and 124, being resistant to kanamycin and gentamicin, and goose isolate 4.1V being intermediate to kanamycin and resistant to sulfamerazine. Similarly, two of the eight isolates previously obtained from air samples in a duck hatchery (Martin and Jäckel, 2011) exhibited resistance to sulfamerazine but were otherwise largely sensitive.

Virulence of avian isolates

Galleria mellonella larvae were used to compare the virulence of avian isolates to that from cases of human infection. All avian isolates tested ($n = 12$) exhibited virulence comparable to that of clinical isolates in the *Galleria* model. Supporting Information Fig S10 exemplifies the virulence of two chicken isolates and three stork isolates in comparison to widely used virulent strain ATCC 17978. The latter strain is known to be as virulent as epidemic clinical *A. baumannii* strains such as ACICU and AYE in the *Galleria* model (Antunes *et al.*, 2011). Lethal dose 50% (LD_{50}) values were determined after 24 h, revealing no significant difference between clinical isolates (ATCC 17978, ACICU and AYE) and twelve avian isolates ($7.4 \times 10^{-4} \pm 2.0 \times 10^{-4}$ cfu vs. $5.0 \times 10^{-4} \pm 4.3 \times 10^{-4}$ cfu).

Further, adhesion of selected avian isolates to A549 human lung epithelial cells was assessed in comparison to epidemic strains AYE and ACICU representing IC1 and IC2, respectively. All strains tested were able to adhere to host cells. The level of adhesion was different for some avian isolates, for example, goose isolate 3.5D exhibited significantly higher adhesion potential than strains AYE and ACICU, and adhesion of stork isolate 29D2 was significantly exceeding that of strain AYE (Fig. 3).

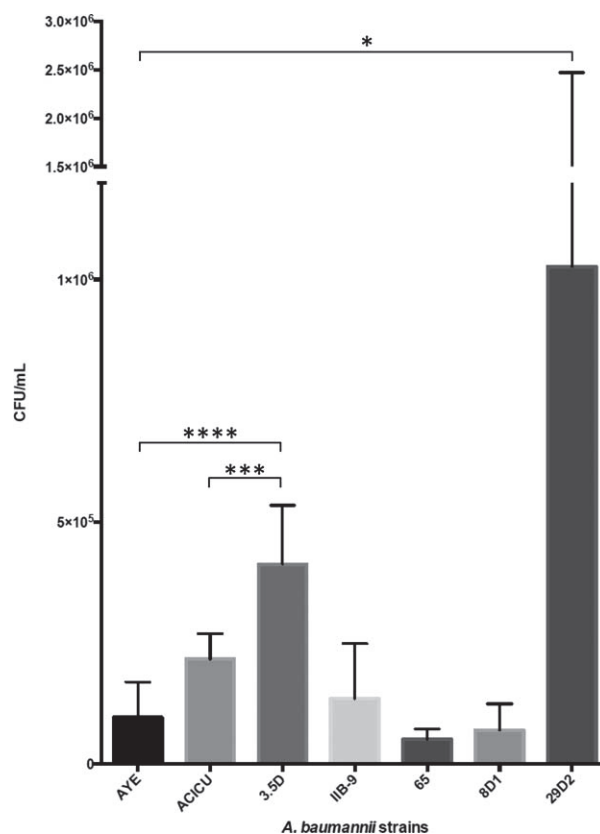


Fig. 3. Adhesion of avian and human clinical isolates of *A. baumannii* to A549 human epithelial lung cells. Significance based on unpaired student's *t* test: * 29D2 versus AYE significantly different with $P < 0.05$; *** 3.5D versus ACICU significantly different with $P < 0.0005$; **** 3.5D versus AYE significantly different with $P < 0.0001$.

Whole genome sequencing of selected avian isolates

Finally, to elucidate the standing of avian isolates within the species and in relation to hospital isolates, we determined the nearly complete genome sequence of 18 selected avian isolates, including one from a hen chick (65), one from a goose (3.5D) and ten from white stork nestlings (8D1, 29R1, 29D2, 31D1, 42R3, 192/2C, 280/1C, 86II/2C, 151/1C, PLG9P835; Table 1). Four sporadic isolates gained from poultry hatcheries in Germany and two sporadic isolates collected from white stork pellets in Germany were later included because the OXA-variants indicated a relationship to IC lineages or to strains previously isolated from stork samples (Table 1, serial no. 65–70). A phylogenetic tree based on 2182 genes with orthologues in all selected isolates is shown in Fig. 4. This analysis reveals that neither avian isolates in general nor stork isolates in particular form a distinct clade within the phylogeny of *A. baumannii*. Rather, they are highly diverse and show multiple early branching points with different clinical lineages. None of the avian isolates shows a close relationship to

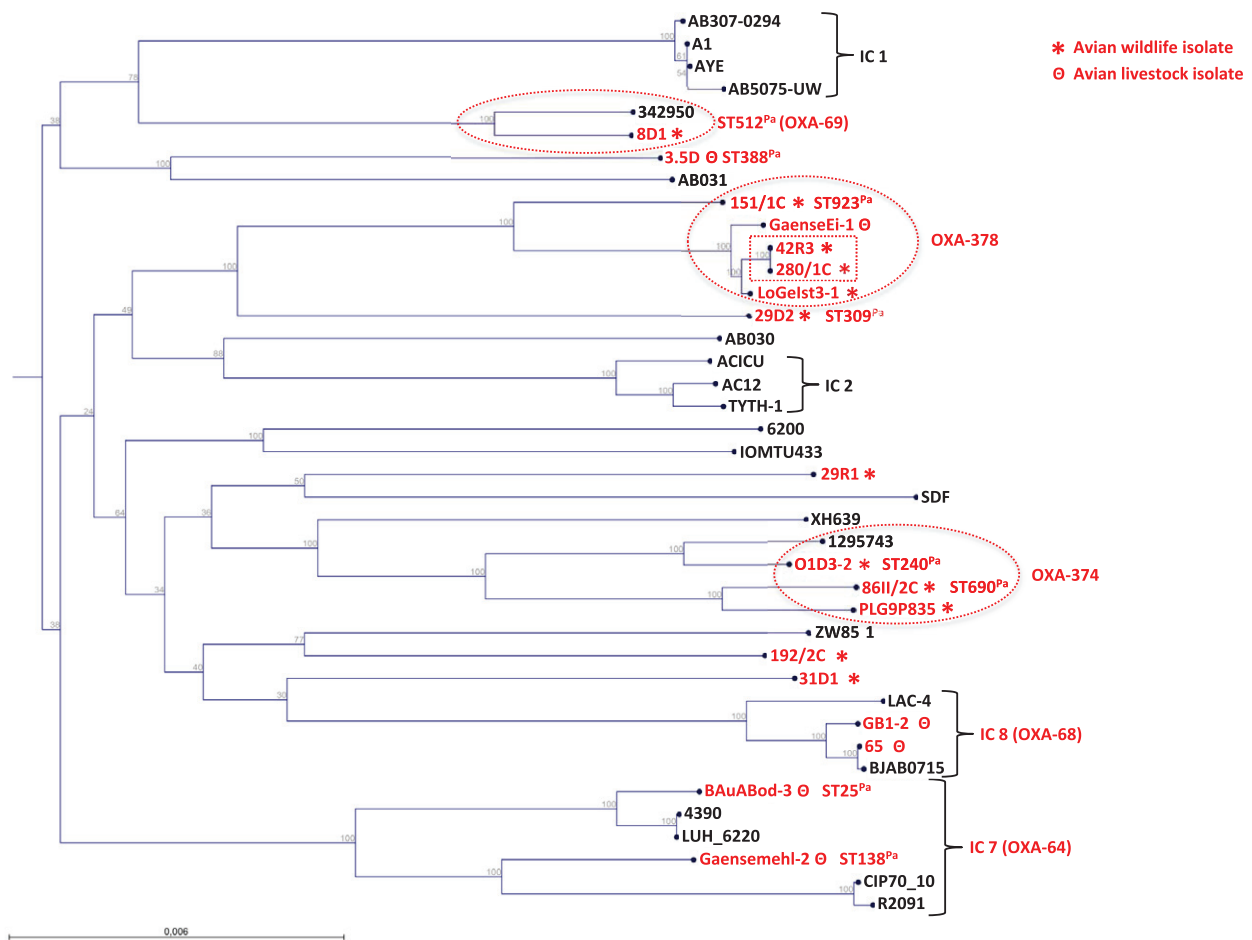


Fig. 4. Core genome-based phylogeny reveals the high diversity of avian isolates. Maximum likelihood tree based on 2181 orthologous genes present in all 40 *A. baumannii* strains included. Wildlife avian isolates are flagged with an asterisk (*), livestock-associated avian isolates are labelled with a theta (Θ); designation of all avian isolates in red. Strains representing international clones IC1, IC2, IC7 and IC8 are marked with brackets. The scale indicates substitutions per site. The red dashed ovals indicate clades outside of the IC nomenclature which include avian isolates. The red dashed box indicates two isolates from white stork nestlings recovered from neighbouring villages in consecutive years. Multilocus sequence types and OXA-types are indicated for isolates discussed in the main text.

international clones IC1 or IC2, however, stork isolate 8D1 shows early branching from the IC1 lineage and more recent branching from the human clinical isolate 342 950 collected in the United States. While we found more than 29 000 single nucleotide polymorphisms (SNPs) when comparing stork isolate 8D1 to different representatives of the IC1 lineage, we detected only 8575 SNPs in comparison to the clinical isolate 342 950 (see distance matrix in Supporting Information, Table S1). Of interest, isolate 65, collected from a hen chick in Germany in the year 2012, is closely related to a clinical isolate from China, BJAB0715, collected in 2007 (Zhu *et al.*, 2013). They show only 270 single nucleotide polymorphisms (SNPs). In relation to the overall alignment length of 1.857 megabases (Mb) this corresponds to only 145 SNPs/Mb. The most striking difference between isolates 65 and BJAB0715 is the acquisition of a resistance plasmid by the latter. In line with this,

we found isolate 65 to be naturally competent (Table 1). Furthermore, isolate 65 and BJAB0715 share a common root with hypervirulent outbreak strain LAC-4, a representative of international clone 8 (IC8) (Ou *et al.*, 2015; Tomaschek *et al.*, 2016). This lineage also includes an additional isolate (GB1–2; see Fig. 4 and Table 1) that we recently isolated from a chicken hatchery in Germany.

Another clade, sharing the OXA-378 protein variant, includes four stork isolates from Poland and Germany as well as a goose isolate ('GaenseEi-1') from Germany, illustrating the relatedness of wildlife and livestock avian isolates (Fig. 4). In addition, a clade identified by the shared OXA-374 protein variant, comprises three stork isolates from Poland and Germany as well as the human clinical isolate 1 295 743 from the United States. Two livestock isolates from Germany which harbour the OXA-64 protein known from international clone IC7 actually cluster

with human clinical isolates within this deeply branching lineage (Fig. 4).

Moreover, our analysis confirms that isolates 42R3 and 280/1C, collected from white stork nestlings in consecutive years from neighbouring villages, are very closely related with a difference as low as 11 SNPs (Fig. 4 and Supporting Information Table S1).

Based on the genome data we were able to determine the sequence type (ST) of 17 out of 18 avian isolates according to the Pasteur MLST scheme (Diancourt *et al.*, 2010) and also according to the Oxford scheme (Bartual *et al.*, 2005) including 4 and 10 previously undescribed ST^{Pa} and ST^{Ox} sequence types, respectively (Supporting Information Tables S2 and S3). As expected, chicken isolate 65 belongs to the same sequence type as BJAB0715 from China in both systems (ST23^{Pa} and ST642^{Ox}). Interestingly, ST23^{Pa} is also shared by strain RUH 1316 isolated in 1964 from a mink in the Netherlands, by two strains isolated more recently in Sweden (one of which from a patient transferred from Serbia), by an additional strain from China, and by our isolate GB-1 suggesting they all belong to an international clone. In line with this, the ST23^{Pa} is a single locus variant of ST10^{Pa} which is associated with international clone 8 (IC8) (Ou *et al.*, 2015; Tomaschek *et al.*, 2016).

In addition, BAuABod-3 could be assigned to ST25^{Pa} and ST229^{Ox} which are associated with IC7 (Tomaschek *et al.*, 2016). In accordance with the above suggested relationship between stork isolate 8D1 and strain 342 950 isolated from a perirectal human sample in the United States, these two isolates share the same sequence type according to both MLST schemes (ST512^P and ST952^{Ox}). Additional linkages were revealed between goose isolate 3.5D from Germany and two isolates from Taiwan (ST388^{Pa}), between stork isolate 29D2 from Poland and isolate LUH 15022 from Belgium (ST309^{Pa}), stork isolate 86II/2C from Poland and isolate 35–2002 from Spain (ST690^{Pa}) as well as stork isolate 151/1C from Poland and isolate A166B from Australia (ST923^{Pa}) (Fig. 4 and Supporting Information Table S3). Of specific interest, stork isolate O1D3-2 and goose-associated isolate Gaensemehl-2 share ST240^{Pa} and ST138^{Pa}, respectively, with chicken meat isolates from Switzerland (Lupo *et al.*, 2014) and isolates from Japan and Taiwan, respectively (Fig. 4 and Supporting Information Table S3). We were unable to assign a ST to strain PLG9P835 because of a disrupted *gltA* allele. However, it shared 4 alleles with ST1454^{Ox} from strain 86II/2C.

Discussion

A. baumannii: where do they originally come from?

Knowledge about the ecological context of pathogens is of utmost importance for elucidating their stratagem and for developing control measures. Unfortunately, we do not

know much about the 'training grounds' of *A. baumannii* outside the hospital. Here, we studied birds as a potential reservoir of *A. baumannii* and found the bacteria in 25% of all choana samples taken from white stork nestlings in Poland. To the best of our knowledge, this is the highest rate documented for any endotherm to date. But is the stork really a reservoir?

Storks as samplers of A. baumannii rather than colonized hosts?

We demonstrated here that choana swabs from white stork nestlings are a reproducible source for *A. baumannii*. However, the nature of the interaction between *A. baumannii* and storks remains elusive. Our data suggest that colonization of the choana region is rather transient: (i) repeated sampling of nestlings did never recover the same strain, (ii) throughout the study only two pairs of siblings were found to carry the same strain, (iii) stork pellets collected below a single nest were highly contaminated with *A. baumannii* whereas sampling of the four nestlings within this specific nest at the same time yielded no *A. baumannii*. Taken together, we interpret these findings such that at least the choana region of young storks is possibly only transiently colonized with *A. baumannii* and that the feed of storks has to be considered as the true source of *A. baumannii* isolated from choanae and pellets. Studies are underway to monitor the recovery of *A. baumannii* from stork pellets during the breeding season to get a clearer picture on the colonization status of storks. Of course, we cannot rule out at present that body parts other than trachea and rectum are colonized more stably.

Evidence for residence of A. baumannii in the Oder valley

A close relationship between isolate 280/1C, collected from a choana swab in Czarnowo in 2013, and isolate 42R3, collected from a rectal swab in 2014 in the neighbouring village of Wężyska (approx. 3 km from Czarnowo; Supporting Information Fig. S6), was suspected due to identical *bla*_{OXA-51-like} genes as well as indistinguishable Apal macrorestriction patterns and confirmed by whole genome sequencing (Fig. 4). Given that adolescent storks typically stay in Africa for two years after their first migration, it is highly unlikely that the stork nestling sampled in 2013 came back in 2014 for breeding in the neighbouring village and transmitted a colonizing strain to its offspring. We cannot rule out that an adult stork breeding in Czarnowo in 2013 and in Wężyska in 2014 was the carrier and transmitter of both isolates. However, this scenario is unlikely in light of nest-site fidelity of white stork being close to 90% (Barbraud *et al.*, 1999) and considering the lack of evidence for transmission routes from stably

colonized parents to their nestlings (see above). Moreover and as discussed above there is evidence of storks' feed as the true source of *A. baumannii* in storks. Thus, the most likely explanation for the close relationship between isolates 280/1C and 42R3 is the stable circulation of this *A. baumannii* lineage in a habitat situated in the vicinity of these villages where storks are foraging. This scenario is also supported by additional findings from other sampling sites, for example, closely related isolates 658C and 661C recovered from nestlings that grew up within a distance of 2 kilometres. In conclusion, it is now possible to study *A. baumannii* in a native environmental context with a high probability to consecutively isolate specific clones. It should thus be possible to estimate evolutionary rates and timescales in a natural context and to compare to data obtained in a clinical context or related to animal production.

In the light of Poland giving home to the world's largest population of white storks it will be interesting to compare clinical isolates from Poland not belonging to the international clones and stork isolates to learn if transfer occasionally may occur.

Evidence for convergent evolution of the *bla*_{OXA-51-like} gene

Another interesting aspect concerns the evolution of the intrinsic *bla*_{OXA-51-like} gene in its natural context. Under anthropogenic selection pressure such as imposed by the use of antibiotics in the hospital setting, *bla*_{OXA-51-like} can turn into a clinically relevant carbapenemase gene after insertion of *ISAbal* into the promoter region (Turton *et al.*, 2006b; Zander *et al.*, 2013). However, we could not detect an *ISAbal* insertion upstream of *bla*_{OXA-51-like} in any of our avian isolates. Interestingly, among 47 different stork isolates obtained in 2013 and 2014 we found 30 different variants at the protein level. These protein variants included OXA-51, -65, -69, -71 and -90 commonly found in well-described clinical *A. baumannii* international clonal lineages (Zander *et al.*, 2012). However, at the nucleotide level the *bla*_{OXA-51-like} genes of these avian isolates were never identical to that of clinical IC lineages and a close relationship of any isolate to an IC lineage could also not be demonstrated by rep-PCR suggesting convergent evolution of the *bla*_{OXA-51-like} gene. We also found striking examples of apparently convergent evolution of the *bla*_{OXA-51-like} gene among avian isolates. For instance, isolate 291/1C was collected in the year 2013 from a nestling near Glogów, and isolate 9D1 was collected in 2014 from a nestling in Kłopot, about 100 km away from Glogów. These isolates are clearly distinct as determined by *Apal* macrorestriction analysis (Fig. 2) and partial sequences of *rpoB* and *gyrB* (data not shown) but share the same *bla*_{OXA-51-like} gene (encoding OXA-90). As another

example, isolates 41D1 and 47D1, collected from nestlings in neighbouring villages in the same year, are distinct by macrorestriction analysis and partial sequences of *rpoB* and *gyrB* (data not shown), nonetheless they are identical in the *bla*_{OXA-51-like} gene (encoding OXA-413). Conversely, some new OXA-types such as OXA-378 and OXA-374 but also well-known types such as OXA-64 and OXA-68 may act as indicators for clonal affiliation (Fig. 4). Collectively, our data suggest that *bla*_{OXA-51-like} is expressed and responsive to selection pressure in the environment.

Similar to what we found, Rafei *et al.* described 31 different OXA-51-like protein variants among 42 *A. baumannii* of non-human origin collected in Lebanon (Rafei *et al.*, 2015). By and large, they found a good correlation between MLST sequence types and *bla*_{OXA-51-like} types but they also described some cases of distinct MLST types sharing the same OXA proteins in line with our observations.

The linkage between avian and human isolates

Whole genome-based phylogeny revealed a high diversity of avian isolates and the relatedness of several avian isolates both of wildlife and livestock origin to human clinical isolates including international clonal lineages IC7 and IC8 (Fig. 4). Especially intriguing, one clade characterized by carriage of OXA-374, comprises human clinical isolate 1 295 743 from the United States, stork isolates from Poland and Germany and exhibits relationship to clinical isolates from Spain and Japan as well as poultry meat isolates from Switzerland (Lupo *et al.*, 2014). In the light of an overall isolation rate of 25% in white stork nestlings, it is hard to conceptualize a scenario which links these findings but does not include an affinity of *A. baumannii* to avian host systems.

Our avian isolate closest to any human clinical isolate is chicken isolate 65 from Germany which is related to human clinical isolate BJAB0715 from China. Additional isolates related to isolate 65 were recovered in 2012 from two other chicks within the same flock and from a hen of another seemingly unrelated flock (Table 1 and Fig. 1) suggesting successful spread of a clone within poultry livestock. At present we can only speculate on the transmission path linking these chicken isolates from Germany to the human isolate from China. At least, a temporal estimate of their divergence is possible, based on the recent determination of a mutation rate of 5 SNPs per year per genome for the IC1 clade of *A. baumannii* (Holt *et al.*, 2016). Assuming comparable rates here, the most recent common ancestor of chicken isolate 65 and human isolate BJAB0715 existed around 100 years ago (270 SNPs per 1.857 Mbp corresponds to ~580 SNPs per genome which yields a calculated divergence 116 years ago). In conjunction with the fact that additional isolates, the oldest of which was recovered in 1964 from a mink in the

Netherlands, share the same MLST sequence type as 65 and BJAB0715 (Supporting Information Table S3), is much in support of their belonging to an international clone that was already spread worldwide before the use of antibiotics.

The recent description of a virulent strain isolated from diseased chicks in China not only demonstrates the presence of *A. baumannii* in poultry livestock worldwide but also suggests it to be a zoonotic pathogen (Liu *et al.*, 2016). The recent demonstration of *A. baumannii* in raw meat samples in Switzerland at an overall rate of 25% and in poultry meat in particular that was found contaminated at a rate of 48% (Lupo *et al.*, 2014) suggests a high abundance in poultry livestock and a specific affinity for birds. The fact that our isolation rates from chicken (3%) and geese (8%) are lower than that reported for poultry meat may result from crosscontamination during meat processing but could be also due to differences in the isolation methods (CHROMagar Acinetobacter vs. Chrom ID ESBL agar; direct streaking of swabs vs. enrichment culture from meat homogenates). It may well be that more sophisticated methods would reveal in the future a greater avian impact on the epidemiology and spread of *A. baumannii*. We would like to emphasize again that our study links avian isolates (ST138^{Pa} and ST240^{Pa}) to isolates of the same sequence types found in poultry meat by Lupo *et al.* (2014) and clinical isolates from Taiwan and Japan.

Recently, wild birds' feces was described as a source of *A. baumannii* in Nigeria with an average isolation rate of more than 30% (Dahiru and Enabulele, 2015). Unfortunately, the species identification was based on biochemical tests which are considered unreliable (Peleg *et al.*, 2008), leaving the question whether the isolates are true *A. baumannii*. By contrast, in a study on the cloacal and pharyngeal bacterial flora of free-living birds in Germany no *A. baumannii* was recovered (Stenkat *et al.*, 2014). The prevalence of *A. baumannii* in birds may thus largely depend on the bird species and the geographical region.

Concluding remarks

Collectively, our data in conjunction with previous work of others is much in support of the dissemination of *A. baumannii* in poultry livestock with possibly far-reaching consequences for public health. The diversity of avian isolates illustrated here by whole genome sequencing matches well with the diversity found among clinical isolates.

The prevalence of *A. baumannii* in poultry livestock and in the food production chain is underexplored and should be further investigated. Efforts should be made to screen avian populations worldwide including their environmental context.

Experimental procedures

Sample collection and processing

COPAN Amies agar gel medium transport swabs (COPAN 108C and 110C; HAIN Lifescience, Germany) were used for sampling. Swabs were immediately transferred to Amies transport medium and stored at 4°C until direct plating on CHROMagar Acinetobacter. CHROMagarTM Acinetobacter (CHROMagar, France) was prepared according to the manufacturer's description without addition of the CHROMagar MDR supplement CR102. In preliminary studies we had determined that all *A. baumannii* isolates of our collection were able to grow on CHROMagar Acinetobacter suggesting no major bias. Preliminary studies in our lab also revealed a higher specificity of CHROMagar Acinetobacter compared to Leeds Acinetobacter Medium and a higher sensitivity compared to Simmons Citrate Agar (data not shown).

Bacterial species identification

Speciation of isolates recovered from CHROMagar Acinetobacter was based on PCR detection of *bla*_{OXA-51-like} (Turton *et al.*, 2006a), partial 16S rRNA gene sequencing (Weisburg *et al.*, 1991) and partial *rpoB* sequencing using primers Ac696F and Ac1598R as described (Nemec *et al.*, 2009). To determine *bla*_{OXA-51-like} variation the coding region was fully sequenced as described (Zander *et al.*, 2012). New OXA-51 variants were deposited at GenBank (see Table 1) and registered at Lahey database now hosted at NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/beta-lactamase-data-resources/>).

Infection in *Galleria mellonella* caterpillars

Larvae of *Galleria mellonella* were infected as described (Schiebe *et al.*, 2012). *G. mellonella* caterpillars were purchased from tz-terrarium.de, Germany. Bacterial strains were cultured in 5 ml LB media at 37°C. Overnight cultures were diluted 1:50 in LB and cultured for another 3 h at 37°C. Bacteria were then washed and resuspended in sterile phosphate-buffered saline (PBS). Optical density (OD_{600 nm}) was adjusted to 0.2 and 5 µl of the bacterial suspension corresponding to 3 × 10⁵ CFU was injected into each *G. mellonella* larva through the last left proleg. For each infection experiment, groups of 16 caterpillars were assigned to each of the mutant and parental strains and two control groups were used, one treated with PBS and one untreated. Then infected caterpillars were incubated at 37°C and vitality of the caterpillars was monitored every day for a period of 5 days by touching the larvae and survival was recorded. Caterpillars were considered dead when they showed no response to touching. Results were not considered valid when more than two dead caterpillars were found in control groups within five days. Three independent infection experiments were conducted. Lethal dose 50% (LD₅₀) values were determined after 24 h as described (Antunes *et al.*, 2011) inoculating and analysing triplicates of 12 larvae for each dilution (10⁶, 5 × 10⁵, 10⁵, 5 × 10⁴, 10⁴ CFU in 5 µl injection volume).

Cell culture adherence

A549 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS) at 37°C with 5% CO₂ atmosphere. The day before adhesion assay, cells were plated at 5×10^5 cells/ml. Cells were infected with different *A. baumannii* strains after overnight culture at a multiplicity of infection of 100, then the plate was centrifuged at 400 *g* for 5 min and incubated for 1 h at 37°C with 5% CO₂. Cells were washed 10 times with PBS to avoid unspecific adhesion to surface and lysed with sterile water. Lysed samples were diluted in 5x PBS so that serial dilutions could be performed in PBS before plating on LB agar to enumerate CFUs.

Natural transformation competence

The competence of avian isolates to take up naked DNA from the environment and to incorporate it into the genome by homologous recombination was analysed as described previously (Wilharm *et al.*, 2013).

Macrorestriction analysis

Bacterial strain typing was performed by Apal-macrorestriction and subsequent pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and results were interpreted according to the criteria suggested by Tenover *et al.* (1995).

Antimicrobial susceptibility testing

Susceptibility to different antibiotics (ampicillin, cefotaxime, ceftazidime, ceftazidime, meropenem, gentamicin, kanamycin, amikacin, sulfamerazine, sulfamerazine/trimethoprim and ciprofloxacin) was tested using the microbroth dilution method according to DIN58940 and EUCAST guidelines with result interpretation according to EUCAST v5.0. Additionally, a PCR screening for the presence of *Acinetobacter*-specific carbapenemase genes (*bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-40-like} and *bla*_{OXA-58-like}) was performed in all isolates of this study.⁴⁸

Illumina sequencing

Libraries for Illumina short read sequencing were prepared from 1 ng of extracted DNA utilizing the Nextera XT DNA Library Prep Kit according to the manufacturer's recommendations (Illumina Inc., USA). Sequencing was carried out in paired-end (2 × 300 bp) on a MiSeq benchtop instrument. The whole genome shotgun project of 18 avian isolates has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession of bioprojects PRJNA326058 and PRJNA390481.

WGS data processing

The determination of the maximum common genome (MCG) alignment was done comprising those genes present in all 40 genomes selected for the alignment (von Mentzer *et al.*, 2014). To determine them we clustered the coding sequences based on the parameters sequence similarity (min. 70%) and coverage (min. 90%) and defined those genes that were

present in each genome while fulfilling the threshold parameters as MCG containing 2182 orthologous genes for the 40 strains. Next, the allelic variants of these genes were extracted from all genomes by a blast based approach, aligned individually for each gene and then concatenated which resulted in an alignment of 1.857 Mbp for these 40 strains. This alignment was used to generate a phylogenetic tree with RAXML 8.1 (Stamatakis, 2014).

rep-PCR

Epidemiological typing of isolates was performed by rep-PCR (DiversiLab System; bioMérieux, Nürtingen, Germany) following the manufacturer's instructions. Results were analysed with the DiversiLab software using the Pearson correlation statistical method to determine distance matrices and the unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) to create dendrograms. Isolates that clustered below the threshold of 95% were considered unrelated (Higgins *et al.*, 2012). Representative isolates belonging to *A. baumannii* international clones 1–8 were included as controls (Higgins *et al.*, 2010).

Acknowledgements

We would like to thank our colleagues at the central DNA sequencing lab (ZBS 1) as well as Sybille Müller-Bertling for excellent technical assistance. G.W., P.G.H. and H.S. acknowledge financial support from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG-FOR 2251). S.G. and S.P.S. were funded by a Région Rhône-Alpes ARC1 Santé fellowship and a FINOVI Young Researcher grant. This publication made use of the *Acinetobacter baumannii* MLST website (<http://pubmlst.org/abaumannii/>) hosted at the University of Oxford (Jolley and Maiden, 2010). The development of this site has been funded by the Wellcome Trust.

References

- Ahmed, A.M., Motoi, Y., Sato, M., Maruyama, A., Watanabe, H., Fukumoto, Y., and Shimamoto, T. (2007) Zoo animals as reservoirs of gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. *Appl Environ Microbiol* **73**: 6686–6690.
- Al Atrouni, A., Hamze, M., Rafei, R., Eveillard, M., Joly-Guillou, M.L., and Kempf, M. (2016) Diversity of *Acinetobacter* species isolated from different environments in Lebanon: a nationwide study. *Future Microbiol* **11**: 1147–1156.
- Antunes, L.C., Imperi, F., Carattoli, A., and Visca, P. (2011) Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *PLoS One* **6**: e22674.
- Barbraud, C., Barbraud, J.-C., and Barbraud, M. (1999) Population dynamics of the White Stork *Ciconia ciconia* in western France. *IBIS* **141**: 469–479.
- Bartual, S.G., Seifert, H., Hippler, C., Luzon, M.A., Wisplinghoff, H., and Rodriguez-Valera, F. (2005) Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* **43**: 4382–4390.
- Bocanegra-Ibarrías, P., Pena-Lopez, C., Camacho-Ortiz, A., Llaca-Díaz, J., Silva-Sánchez, J., Barrios, H., *et al.* (2015)

- Genetic characterisation of drug resistance and clonal dynamics of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting in Mexico. *Int J Antimicrob Agents* **45**: 309–313.
- Brauner, P., Gromoller, S., Pfeifer, Y., Wilharm, G., and Jäckel, U. (2017) Hatchery workers' IgG antibody profiles to airborne bacteria. *Int J Hyg Environ Health* **220**: 431–439.
- Choi, J.Y., Kim, Y., Ko, E.A., Park, Y.K., Jheong, W.H., Ko, G., and Ko, K.S. (2012) *Acinetobacter* species isolates from a range of environments: species survey and observations of antimicrobial resistance. *Diagn Microbiol Infect Dis* **74**: 177–180.
- Dahiru, M., and Enabulele, O. (2015) *Acinetobacter baumannii* in birds' feces: a public health threat to vegetables and irrigation farmers. *Adv Microbiol* **5**: 693.
- Dexter, C., Murray, G.L., Paulsen, I.T., and Peleg, A.Y. (2015) Community-acquired *Acinetobacter baumannii*: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis. *Expert Rev anti Infect Ther* **13**: 567–573.
- Diancourt, L., Passet, V., Nemec, A., Dijkshoorn, L., and Brisse, S. (2010) The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One* **5**: e10034.
- Dijkshoorn, L., Aucken, H., Gerner-Smidt, P., Janssen, P., Kaufmann, M.E., Garaizar, J., et al. (1996) Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J Clin Microbiol* **34**: 1519–1525.
- Eveillard, M., Kempf, M., Belmonte, O., Pailhories, H., and Joly-Guillou, M.L. (2013) Reservoirs of *Acinetobacter baumannii* outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections. *Int J Infect Dis* **17**: e802–e805.
- Faulde, M., and Spiesberger, M. (2013) Role of the moth fly *Clogmia albipunctata* (Diptera: Psychodinae) as a mechanical vector of bacterial pathogens in German hospitals. *J Hosp Infect* **83**: 51–60.
- Higgins, P.G., Dammhayn, C., Hackel, M., and Seifert, H. (2010) Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* **65**: 233–238.
- Higgins, P.G., Hujer, A.M., Hujer, K.M., Bonomo, R.A., and Seifert, H. (2012) Interlaboratory reproducibility of DiversiLab rep-PCR typing and clustering of *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Med Microbiol* **61**: 137–141.
- Holt, K., Kenyon, J.J., Hamidian, M., Schultz, M.B., Pickard, D.J., Dougan, G., and Hall, R. (2016) Five decades of genome evolution in the globally distributed, extensively antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* global clone 1. *Microb Genom* **2**: e000052.
- Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A., and Sleator, R.D. (2012) *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence* **3**: 243–250.
- Jolley, K.A., and Maiden, M.C. (2010) BIGSdb: scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics* **11**: 1–11.
- Karageorgopoulos, D.E., and Falagas, M.E. (2008) Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Lancet Infect Dis* **8**: 751–762.
- Karah, N., Sundsfjord, A., Towner, K., and Samuelsen, O. (2012) Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist Updat* **15**: 237–247.
- Kempf, M., Abdissa, A., Diatta, G., Trape, J.F., Angelakis, E., Mediannikov, O., et al. (2012a) Detection of *Acinetobacter baumannii* in human head and body lice from Ethiopia and identification of new genotypes. *Int J Infect Dis* **16**: e680–e683.
- Kempf, M., Rolain, J.M., Diatta, G., Azza, S., Samb, B., Mediannikov, O., et al. (2012b) Carbapenem resistance and *Acinetobacter baumannii* in Senegal: the paradigm of a common phenomenon in natural reservoirs. *PLoS One* **7**: e39495.
- Krizova, L., McGinnis, J., Maixnerova, M., Nemec, M., Poirer, L., Mingle, L., et al. (2015) *Acinetobacter variabilis* sp. nov. (formerly DNA group 15 sensu Tjernberg & Ursing), isolated from humans and animals. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**: 857–863.
- La Scola, B., and Raoult, D. (2004) *Acinetobacter baumannii* in human body louse. *Emerg Infect Dis* **10**: 1671–1673.
- Line, J.E., Hiatt, K.L., Guard-Bouldin, J., and Seal, B.S. (2010) Differential carbon source utilization by *Campylobacter jejuni* 11168 in response to growth temperature variation. *J Microbiol Methods* **80**: 198–202.
- Liu, D., Liu, Z.-S., Hu, P., Cai, L., Fu, B.-Q., Li, Y.-S., et al. (2016) Characterization of surface antigen protein 1 (SurA1) from *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence and fitness. *Vet Microbiol* **186**: 126–138.
- Lupo, A., Vogt, D., Seiffert, S.N., Endimiani, A., and Perreten, V. (2014) Antibiotic resistance and phylogenetic characterization of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from commercial raw meat in Switzerland. *J Food Prot* **77**: 1976–1981.
- Martin, E., and Jäckel, U. (2011) Characterization of bacterial contaminants in the air of a duck hatchery by cultivation based and molecular methods. *J Environ Monit* **13**: 464–470.
- von Mentzer, A., Connor, T.R., Wieler, L.H., Semmler, T., Iguchi, A., Thomson, N.R., et al. (2014) Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. *Nat Genet* **46**: 1321–1326.
- Muller, M.G., George, A.R., and Walochnik, J. (2010) *Acinetobacter baumannii* in localised cutaneous mycobacteriosis in Falcons. *Vet Med Int* **2010**, Article ID 321797. <http://dx.doi.org/10.4061/2010/321797>
- Nemec, A., Musilek, M., Maixnerova, M., De Baere, T., van der Reijden, T.J., Vaneechoutte, M., and Dijkshoorn, L. (2009) *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 118–124.
- Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., van der Reijden, T.J., Deschaght, P., Passet, V., et al. (2011) Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Res Microbiol* **162**: 393–404.
- Ou, H.Y., Kuang, S.N., He, X., Molgora, B.M., Ewing, P.J., Deng, Z., et al. (2015) Complete genome sequence of hypervirulent and outbreak-associated *Acinetobacter baumannii* strain LAC-4: epidemiology, resistance genetic determinants and potential virulence factors. *Sci Rep* **5**: 8643.
- Pailhories, H., Belmonte, O., Kempf, M., Lemarie, C., Cuziat, J., Quinqueneau, C., et al. (2015) Diversity of *Acinetobacter*

- baumannii* strains isolated in humans, companion animals, and the environment in Reunion Island: an exploratory study. *Int J Infect Dis* **37**: 64–69.
- Peleg, A.Y., Seifert, H., and Paterson, D.L. (2008) *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* **21**: 538–582.
- Peleg, A.Y., Jara, S., Monga, D., Eliopoulos, G.M., Moellering, R.C., Jr, and Mylonakis, E. (2009) *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 2605–2609.
- Pendleton, J.N., Gorman, S.P., and Gilmore, B.F. (2013) Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther* **11**: 297–308.
- Pournaras, S., Gogou, V., Giannouli, M., Dimitroulia, E., Dafopoulou, K., Tsakris, A., and Zarrilli, R. (2014) Single-locus-sequence-based typing of blaOXA-51-like genes for rapid assignment of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates to international clonal lineages. *J Clin Microbiol* **52**: 1653–1657.
- Rafei, R., Hamze, M., Pailhories, H., Eveillard, M., Marsollier, L., Joly-Guillou, M.L., et al. (2015) Extrahuman epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon. *Appl Environ Microbiol* **81**: 2359–2367.
- Rice, L.B. (2008) Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis* **197**: 1079–1081.
- Schleicher, X., Higgins, P.G., Wisplinghoff, H., Korber-Irrgang, B., Kresken, M., and Seifert, H. (2013) Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* in Germany over a 5-year period (2005–2009). *Clin Microbiol Infect* **19**: 737–742.
- Seifert, H., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., Pelzer, N., Tjernberg, I., and Vaneechoutte, M. (1997) Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J Clin Microbiol* **35**: 2819–2825.
- Skiebe, E., de Berardinis, V., Morczinek, P., Kerrinnes, T., Faber, F., Lepka, D., et al. (2012) Surface-associated motility, a common trait of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, depends on 1,3-diaminopropane. *Int J Med Microbiol* **302**: 117–128.
- Skorska, C., Mackiewicz, B., Golec, M., Cholewa, G., Chmielowiec-Korzeniowska, A., and Dutkiewicz, J. (2007) Health effects of exposure to organic dust in workers of a modern hatchery. *Ann Agric Environ Med* **14**: 341–345.
- Smet, A., Cools, P., Krizova, L., Maixnerova, M., Sedo, O., Haesebrouck, F., et al. (2014) *Acinetobacter gandensis* sp. nov. isolated from horse and cattle. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**: 4007–4015.
- Stamatakis, A. (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **30**: 1312–1313.
- Stenkat, J., Krautwald-Junghanns, M.E., Schmitz Ornes, A., Eilers, A., and Schmidt, V. (2014) Aerobic cloacal and pharyngeal bacterial flora in six species of free-living birds. *J Appl Microbiol* **117**: 1564–1571.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., and Swaminathan, B. (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**: 2233–2239.
- Tjernberg, I., and Ursing, J. (1989) Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS* **97**: 595–605.
- Tomaschek, F., Higgins, P.G., Stefanik, D., Wisplinghoff, H., and Seifert, H. (2016) Head-to-head comparison of two multi-locus sequence typing (MLST) schemes for characterization of *Acinetobacter baumannii* outbreak and sporadic isolates. *PLoS One* **11**: e0153014.
- Turton, J.F., Woodford, N., Glover, J., Yarde, S., Kaufmann, M.E., and Pitt, T.L. (2006a) Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol* **44**: 2974–2976.
- Turton, J.F., Ward, M.E., Woodford, N., Kaufmann, M.E., Pike, R., Livermore, D.M., and Pitt, T.L. (2006b) The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett* **258**: 72–77.
- Turton, J.F., Gabriel, S.N., Valderrey, C., Kaufmann, M.E., and Pitt, T.L. (2007) Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* **13**: 807–815.
- Vallenet, D., Nordmann, P., Barbe, V., Poirel, L., Mangenot, S., Bataille, E., et al. (2008) Comparative analysis of *Acinetobacter*: three genomes for three lifestyles. *PLoS One* **3**: e1805.
- Vincent, J.L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C.D., et al. (2009) International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* **302**: 2323–2329.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* **173**: 697–703.
- Wilharm, G., Piesker, J., Laue, M., and Skiebe, E. (2013) DNA uptake by the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces. *J Bacteriol* **195**: 4146–4153.
- Wright, M.S., Haft, D.H., Harkins, D.M., Perez, F., Hujer, K.M., Bajaksouzian, S., et al. (2014) New insights into dissemination and variation of the health care-associated pathogen *Acinetobacter baumannii* from genomic analysis. *MBio* **5**: e00963–e00913.
- Zander, E., Nemec, A., Seifert, H., and Higgins, P.G. (2012) Association between beta-lactamase-encoding bla(OXA-51) variants and DiversiLab rep-PCR-based typing of *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Clin Microbiol* **50**: 1900–1904.
- Zander, E., Chmielarczyk, A., Heczko, P., Seifert, H., and Higgins, P.G. (2013) Conversion of OXA-66 into OXA-82 in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates and association with altered carbapenem susceptibility. *J Antimicrob Chemother* **68**: 308–311.
- Zhu, L., Yan, Z., Zhang, Z., Zhou, Q., Zhou, J., Wakeland, E.K., et al. (2013) Complete genome analysis of three *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in China for insight into the diversification of drug resistance elements. *PLoS One* **8**: e66584.

Zordan, S., Prenger-Berninghoff, E., Weiss, R., van der Reijden, T., van den Broek, P., Baljer, G., and Dijkshoorn, L. (2011) Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in veterinary clinics, Germany. *Emerg Infect Dis* **17**: 1751–1754.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Supplementary Table S1: distance matrix indicating the number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the set of 2182 genes

Supplementary Table S2: Wilharm *et al.*, MLST sequence types of *Acinetobacter baumannii* strains as indicated according to the Oxford and the Pasteur scheme (<http://pubmlst.org/abumannii/>)

Supplementary Table S3: Additional information on MLST sequence types found in avian isolates

Supplementary Fig. S1: Overview of regions in Poland where white stork nestlings have been sampled

Supplementary Fig. S2: Sample sites along the Oder river (voivodship Lubuskie) where *A. baumannii* isolates have been obtained from white stork nestlings

Supplementary Fig. S3: Sample sites in the Glogów region (voivodship Lower Silesia) where *A. baumannii* isolates have been obtained from white stork nestlings

Supplementary Fig. S4: Sample sites in the village Kłopot (52° 7' 51" N, 14° 42' 8" O, voivodship Lubuskie, Poland) in the year 2013

Supplementary Fig. S5: Sample sites in the voivodship Warmińsko-Mazurskie where *A. baumannii* isolates have been recovered from white stork nestlings

Supplementary Fig. S6: Closely related isolates from consecutive years suggest that *A. baumannii* is resident in the Oder valley

Supplementary Fig. S7: Sampling of stork pellets and nestlings in the village Kłopot on June 30th, 2014: relatedness of pellet isolate 2P1 and nestling isolate 8D1

Supplementary Fig. S8: Sample sites in the village Kłopot (52° 7' 51" N, 14° 42' 8" O, voivodship Lubuskie, Poland) in the year 2014

Supplementary Fig. S9: DiversiLab rep-PCR analysis of selected avian isolates of *A. baumannii* and relationship to clonal lineages

Supplementary Fig. S10: The virulence of avian isolates of *A. baumannii* is comparable to that of clinical isolates in the *Galleria mellonella* infection model

Supplementary Table S2, Wilharm et al., MLST sequence types of *Acinetobacter baumannii* strains as indicated according to the Oxford and the Pasteur scheme (<http://pubmlst.org/abaumannii/>)

Sample ID	ST (Oxford)	Oxf_gltA	Oxf_gyrB	Oxf_gdhB	Oxf_recA	Oxf_cpn60	Oxf_gpi	Oxf_rpoD	ST (Pasteur)	Pas_cpn60	Pas_fusA	Pas_gltA	Pas_pyrG	Pas_recA	Pas_rplB	Pas_rpoB
342950	952	18	12	80	12	1	94	4	512	3	37	3	2	4	1	9
6200	1161	28	35	45	1	16	177	2	464	5	2	4	1	3	4	4
8D1	952	18	12	80	12	1	94	4	512	3	37	3	2	4	1	9
29D2	1456	1	17	41	6	23	132	26	309	12	1	2	2	9	1	5
31D1	1457	22	38	2	12	4	261	118	80	1	1	10	1	4	4	5
192/2C	1458	15	46	67	6	4	195	122	943	1	5	15	5	9	1	4
3.5D	836	18	48	58	42	4	54	26	388	1	62	3	2	40	4	4
65	642	22	15	13	12	4	169	2	23	1	3	10	1	4	4	4
280/1C	1459	1	107	166	6	23	102	26	821	12	100	2	2	9	1	52
42R3	1459	1	107	166	6	23	102	26	821	12	100	2	2	9	1	52
A1	231	10	12	4	11	4	98	5	1	1	1	1	1	5	1	1
AB030	758	1	17	8	10	28	106	32	79	26	2	2	2	29	4	5
AB031	1000	34	52	29	28	67	114	4	638	100	3	14	1	7	1	4
AB307-0294	231	10	12	4	11	4	98	5	1	1	1	1	1	5	1	1
AB5075-UW	945	10	12	4	11	4	79	5	1	1	1	1	1	5	1	1
AC12	195	1	3	3	2	2	96	3	2	2	2	2	2	2	2	2
AC1CU	437	1	12	3	2	2	97	3	2	2	2	2	2	2	2	2
AYE	231	10	12	4	11	4	98	5	1	1	1	1	1	5	1	1
BJAB0715	642	22	15	13	12	4	169	2	23	1	3	10	1	4	4	4
IOMTU433	919	31	17	67	40	1	99	7	622	3	12	11	2	14	4	14
LAC-4	447	1	15	13	12	4	106	2	10	1	3	2	1	4	4	4
SDF	n.a.	74	128	n.p.	6	1	137	n.p.	17	3	29	30	1	9	1	4
TYTH-1	455	1	87	3	2	2	83	3	2	2	2	2	2	2	2	2
ZW85-1	378	1	114	12	54	1	165	68	639	3	3	2	2	11	57	4
GaenseEI-1	1447	1	107	166	6	4	102	26	938	1	100	2	2	76	9	52
Gaensemehl-2	819	21	15	2	28	1	107	4	138	3	3	7	26	7	1	4
BAuABod-3	229	1	15	2	28	1	107	32	25	3	3	2	4	7	2	4
GB1-2	761	22	15	13	12	4	174	2	23	1	3	10	1	4	4	4
LoGelst3-1	1452	1	107	166	6	23	258	26	821	12	100	2	2	9	1	52
O1D3-2	1453	1	47	67	28	1	142	6	240	3	3	2	5	7	2	51
PLG9P835	n.a.	disrupted	98	67	108	1	289	6	n.a.	3	140	disrupted	1	166	2	14
86II/2C	1454	1	98	67	28	1	102	6	690	3	3	2	1	7	2	14
29R1	1433	1	122	140	2	4	214	5	927	1	3	2	2	2	4	29
151/1C	1422	1	38	166	6	23	232	26	923	12	100	2	2	9	1	4

New ST

n.a., not assigned because of missing/incomplete alleles

n.p., not present

Supplementary Table S3

Additional information on MLST sequence types found in avian isolates

Isolate	ST (Pasteur)	ST (Pasteur) prototypic strain information	ST (Oxford)	ST (Oxford) prototypic strain information
8D1	512	342950 (USA, perirectal human sample)	952	342950 (USA, perirectal human sample)
29D2	309	LUH 15022 (Belgium, wound, year 2007)	1456	New, unique
31D1	80	No strain information available in the database	1457	New, unique
192/2C	943	New, unique	1458	New, unique
3.5D	388	TVGH17 (Taiwan, year 2012); KCGMH08 (Taiwan, year 2013)	836	No strain information available in the database
65	23	RUH 1316 (Netherlands, mink, year 1964); AO-11921 (Sweden, abscess, OXA-58-like-positive, year 2006); OS-1144 (Sweden, upper respiratory tract, OXA-58-like-positive, imported from Serbia, year 2007); BJAB0715 (China, human CSF, year 2007); XH858 (China, human sputum, year 2010) Single locus variant (SLV) of ST 10 (IC 8; Tomaschek et al., 2016)	642	BJAB0715 (China, human CSF, year 2007); XH858 (China, human sputum, year 2010)
280/1C	821	New, same as 42R3	1459	New, same as 42R3
42R3	821	New, same as 280/1C	1459	New, same as 280/1C
GaenseEi-1	938	New, unique	1447	New, unique
Gaensemehl-2	138	TTMHH-A32 (Taiwan, 2010); 14B (Switzerland, chicken meat; Lupo et al., 2014)	819	CIP70.10 (USA, year 1950)
BAuABod-3	25	RUH 1486 (Netherlands, 1985); >50 additional isolates from all over the world; international clone IC 7 (Tomaschek et al., 2016)	229	C012 (Brazil), 6 additional isolates from Mexico and the USA; international clone IC 7 (Tomaschek et al., 2016)
GB1-2	23	RUH 1316 (Netherlands, mink, year 1964); see 65 above Single locus variant (SLV) of ST 10 (IC 8; Tomaschek et al., 2016)	761	New, unique
LoGelst3-1	821	New, same as 42R3 and 280/1C	1452	New, unique
O1D3-2	240	H24 (Japan, 2010); DV 31 (Switzerland, chicken meat, 2013)	1453	New, unique

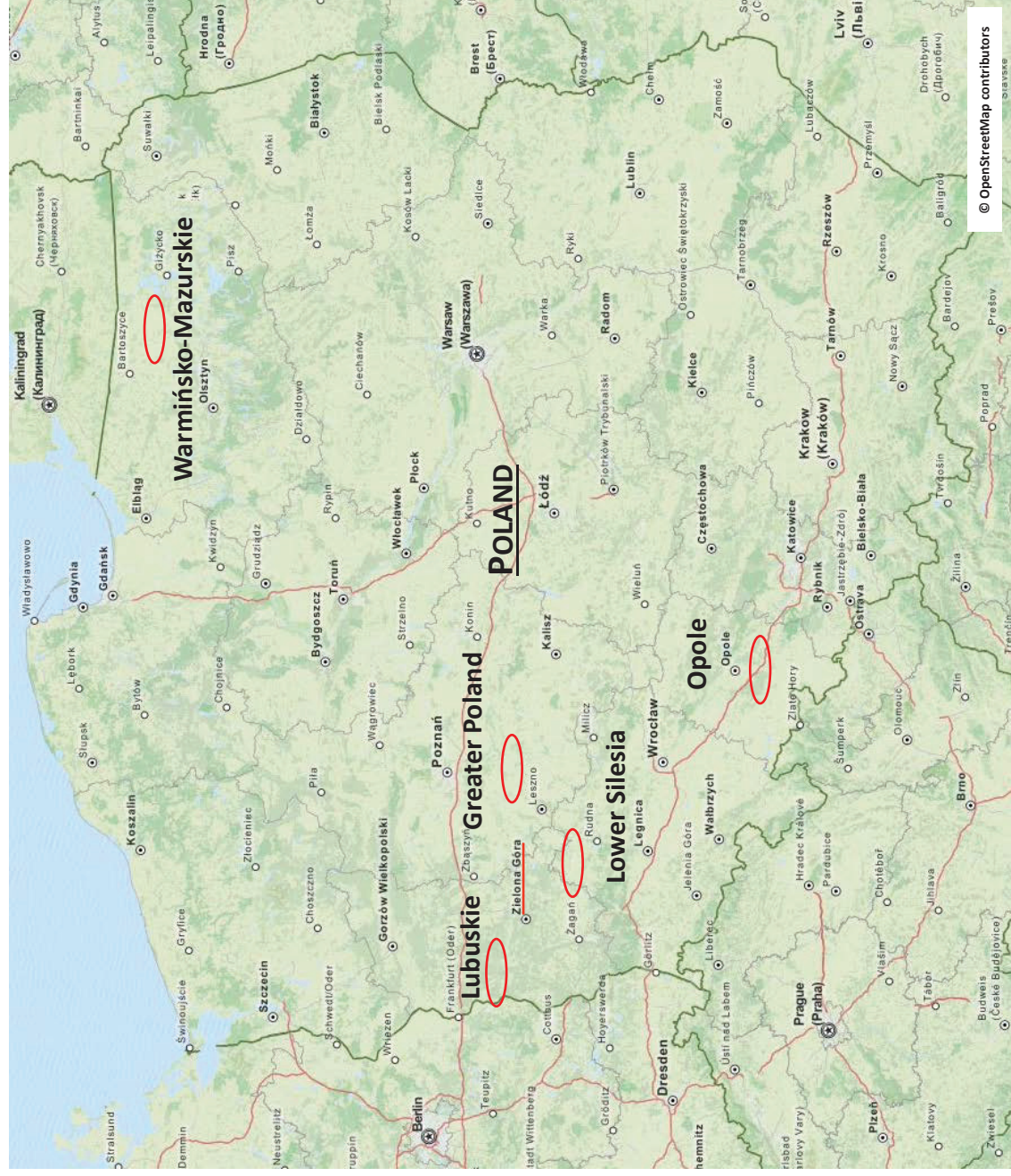
PLG9P835	n.a.	-		n.a.	-
86II/2C	690	35-2002 (Spain, year 2002)		1454	New, unique
29R1	927	New, unique		1433	New, unique
151/1C	923	A166B (Australia, sputum, year 2008)		1422	New, unique

n.a., not assigned due to truncation of the *gltA* gene

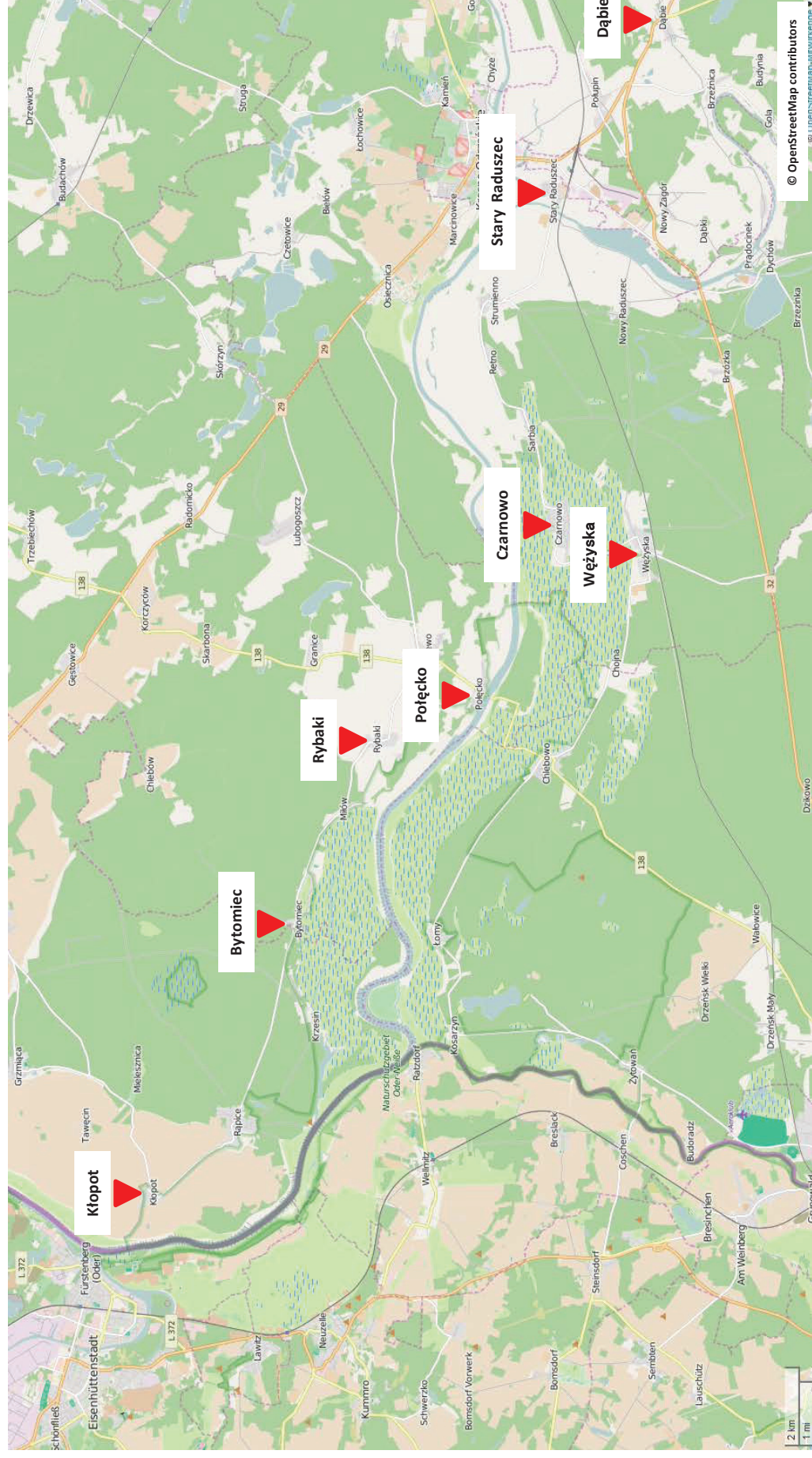
Wilharm *et al.*

Supplementary Fig. S1

Overview of regions in Poland where white stork nestlings have been sampled



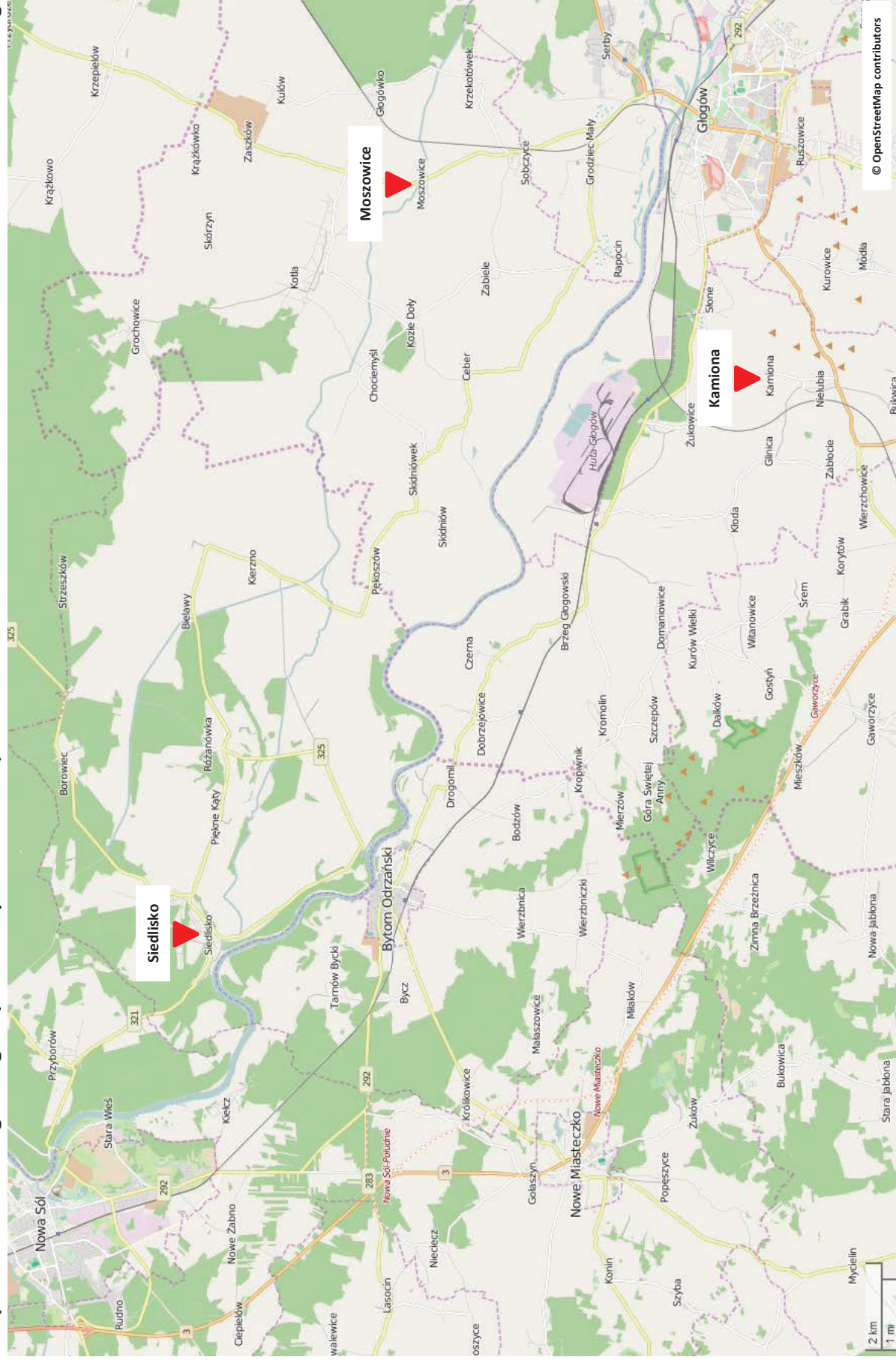
Wilharm *et al.*
 Supplementary Fig. S2
 Sample sites along the Oder river (voivodship Lubuskie) where *A. baumannii* isolates have been obtained from white stork nestlings



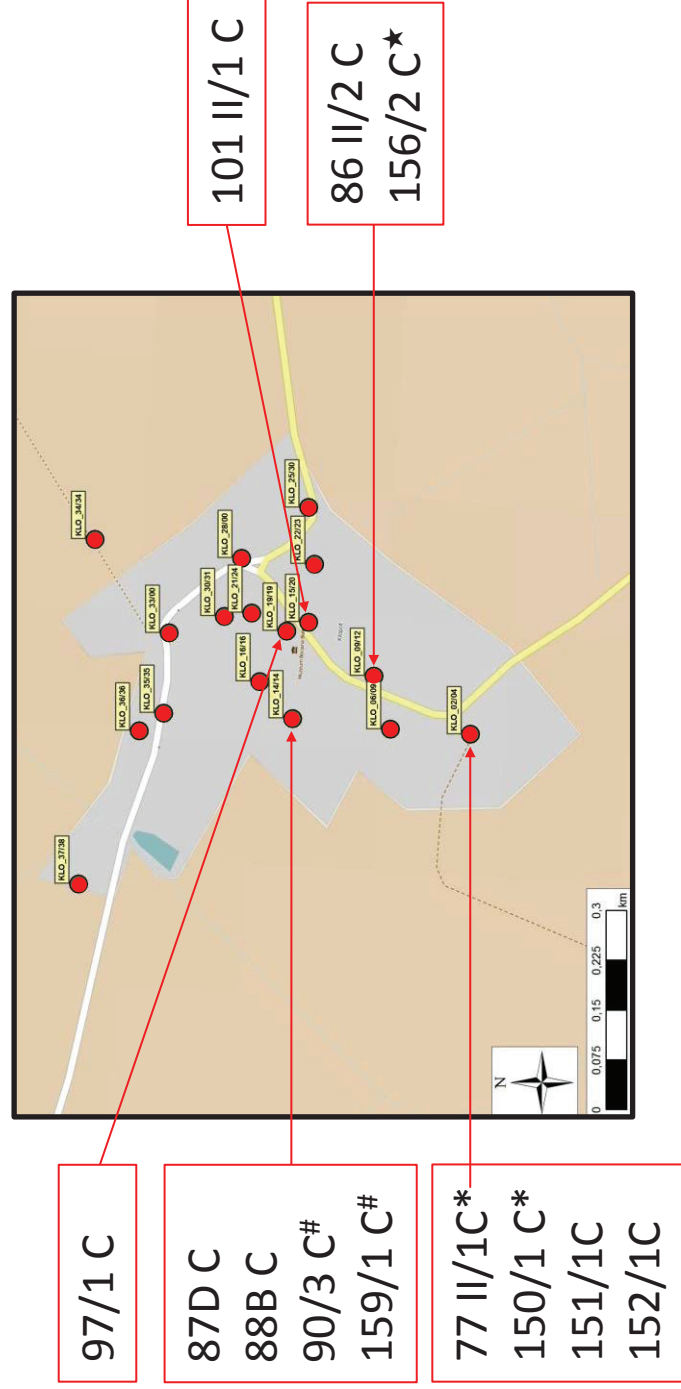
Wilharm *et al.*

Supplementary Fig. S3

Sample sites in the Glogów region (voivodship Lower Silesia) where *A. baumannii* isolates have been obtained from white stork nestlings

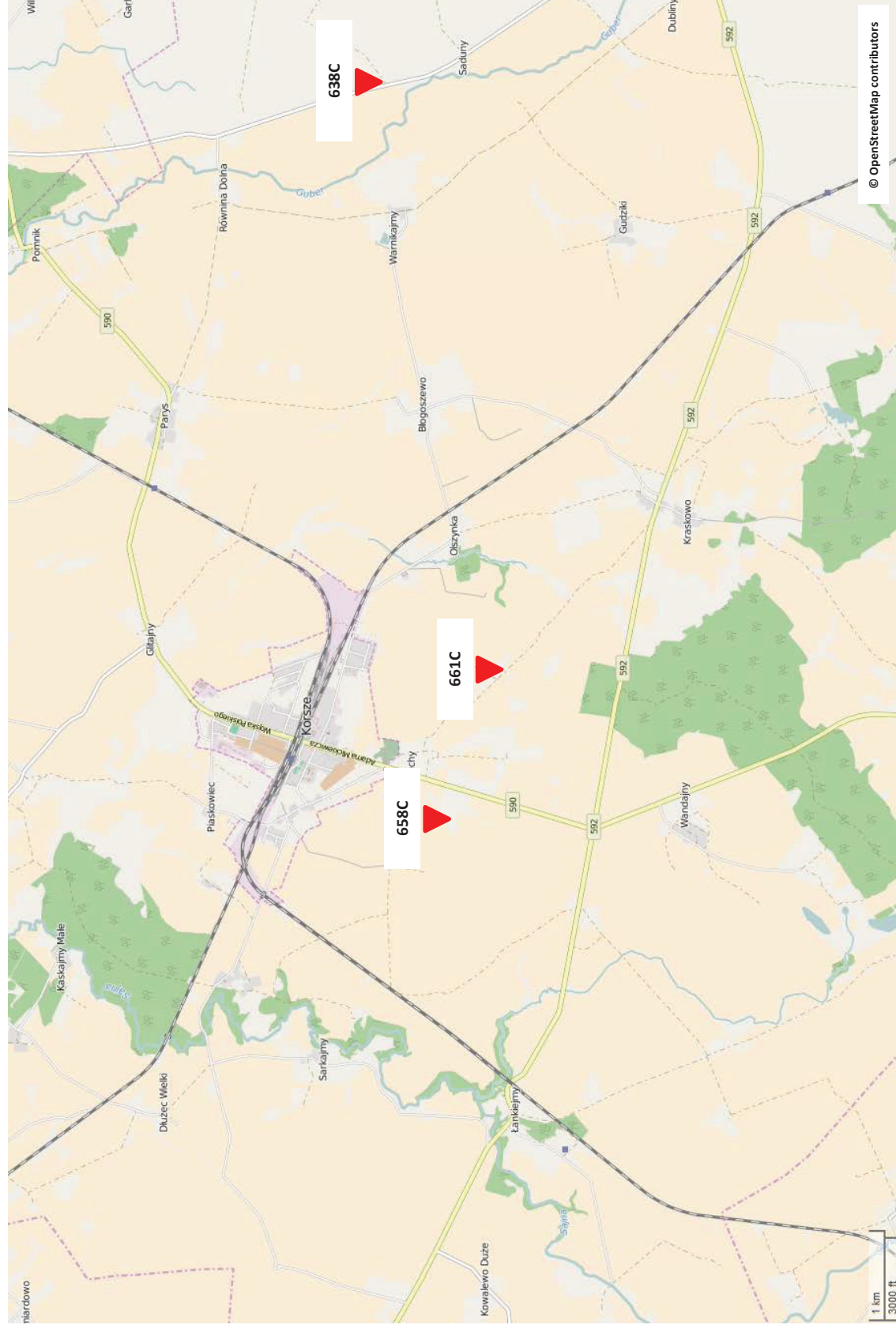


Wilharm *et al.*
 Supplementary Fig. S4
 Sample sites in the village Kłopot (52° 7' 51" N, 14° 42' 8" O, voivodship Lubuskie, Poland) in the year 2013



- * Isolates 77 II/1 C and 150/1 C are distinguishable isolates obtained from the same chick after repeated sampling
- # Isolates 90/3 C and 159/1 C are distinguishable isolates obtained from the same chick after repeated sampling
- ★ Isolate 156/2 C is related to isolate 2P3 obtained from a pellet in the year 2014 below nest KLO_19/19 (see Fig. 2 and Suppl. Fig. S8)

Wilharm *et al.*
 Supplementary Fig. S5
 Sample sites in the voivodship Warmińsko-Mazurskie where *A. baumannii* isolates have been recovered from white stork nestlings

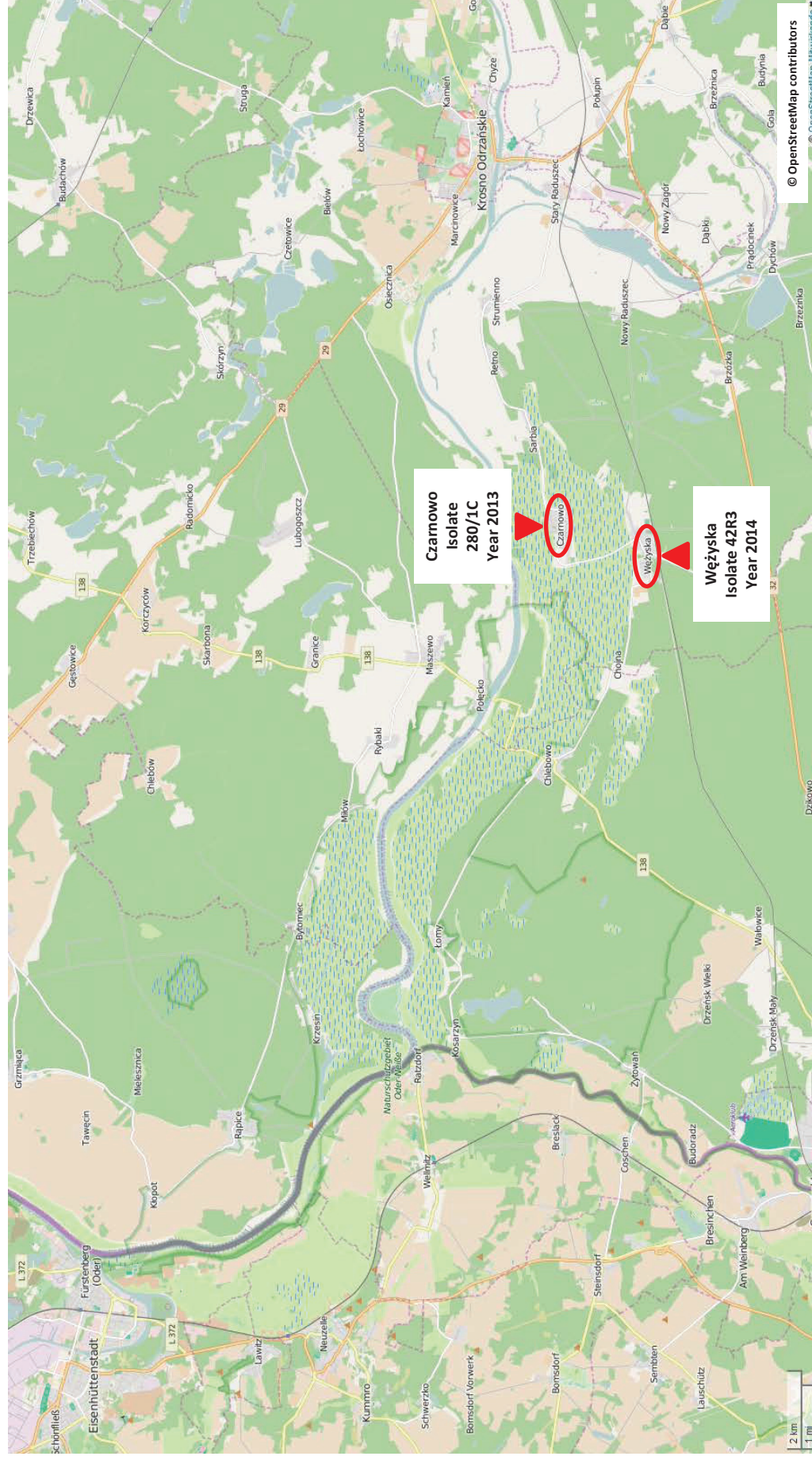


Isolates 658C and 661C are closely related (see Table 1 and Fig. 2)

Wilharm *et al.*

Supplementary Fig. S6

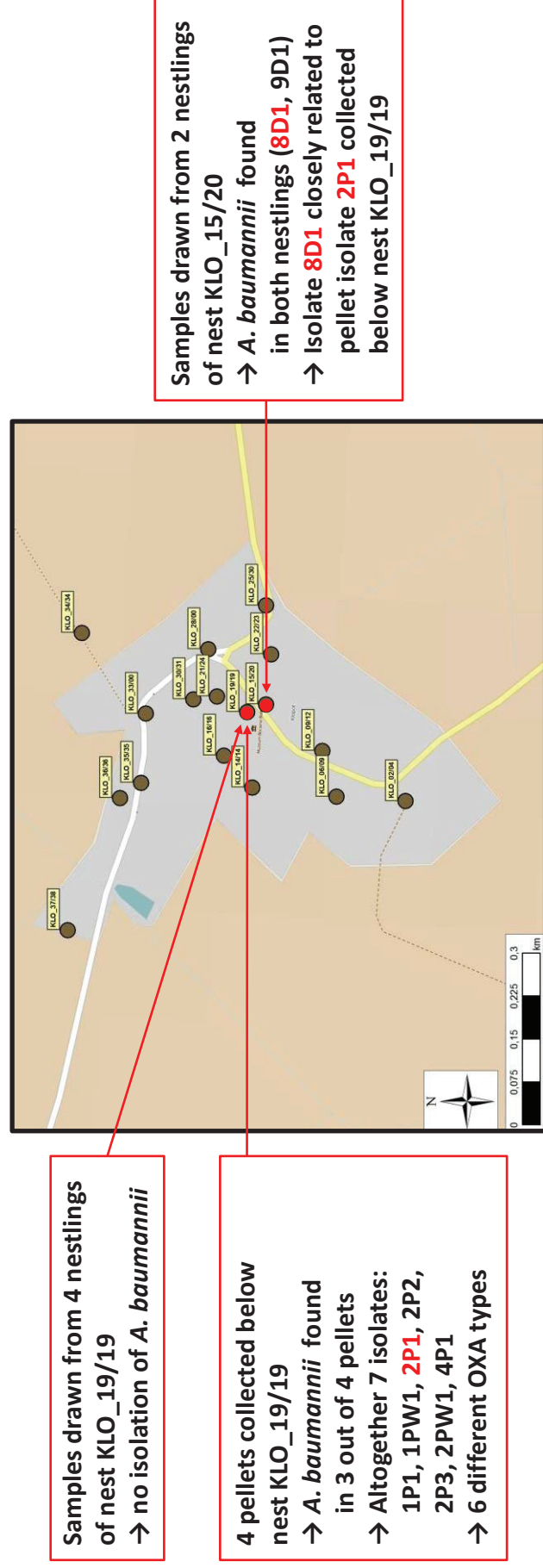
Closely related isolates from consecutive years suggest that *A. baumannii* is resident in the Oder valley



Wilharm *et al.*

Supplementary Fig. S7

Sampling of stork pellets and nestlings in the village Kłopot on June 30th, 2014: relatedness of pellet isolate 2P1 and nestling isolate 8D1



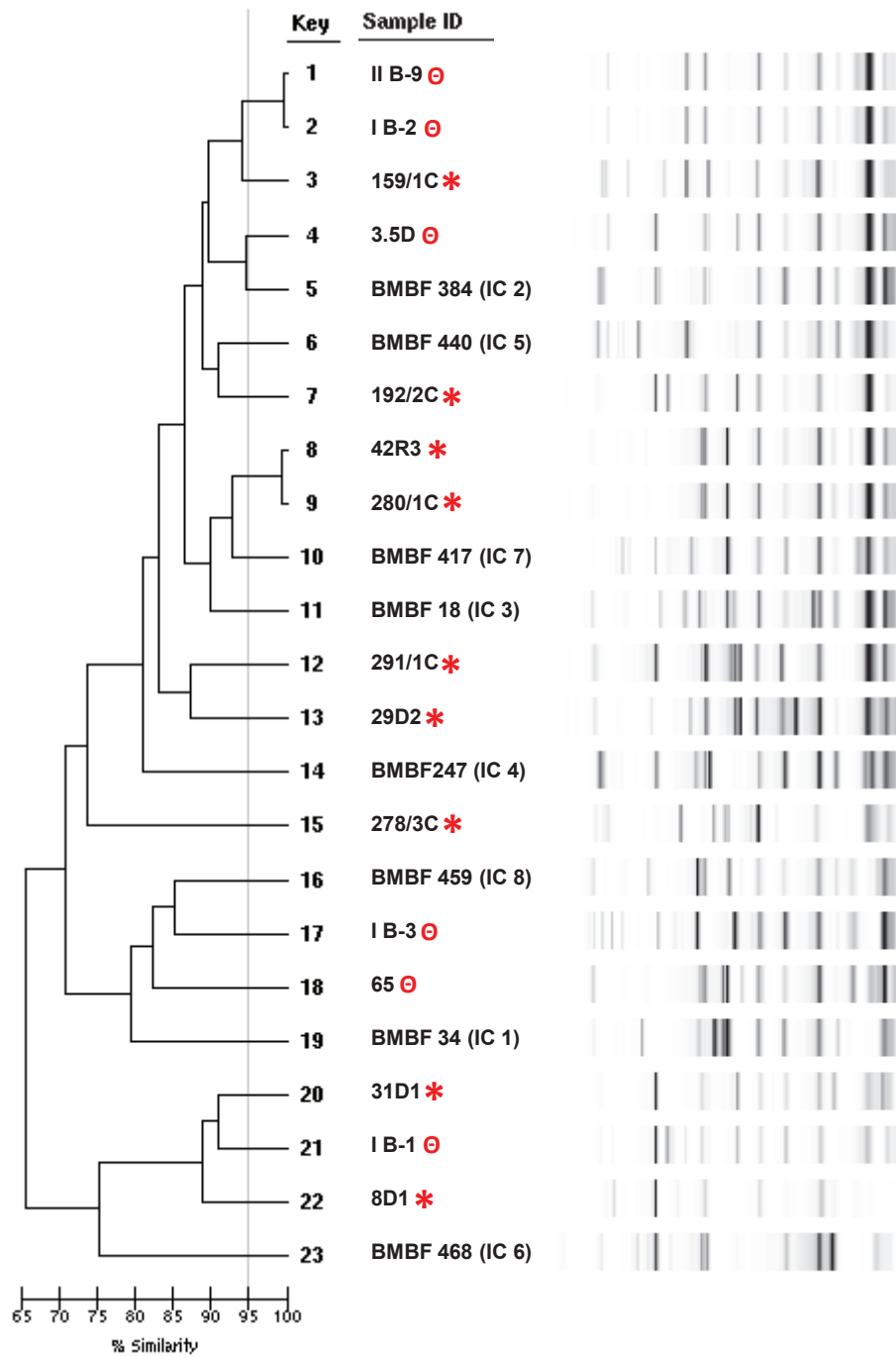
The close relationship of isolates **2P1** and **8D1** is illustrated by Apal macrorestriction analysis (see Fig. 2)

Supplementary Fig. S8

Map of the Kilauea Iki Volcano area showing sampling locations. The map includes a north arrow, a scale bar (0 to 0.3 km), and various sampling points labeled with codes like NLO_3718, NLO_3626, NLO_3526, NLO_3300, NLO_3034, NLO_2890, NLO_2724, NLO_1818, NLO_1526, NLO_1414, NLO_0912, NLO_0806, NLO_0204, NLO_2271, and NLO_2030. Red lines connect specific points to labels: NLO_1414 to 1P1, 1PW1, 2P1, 2P2, 2P3*, 2PW1, 4P1; NLO_2271 to 15D1; NLO_2030 to 8D1, 9D1.

★ Isolate 2P3 is related to isolate 156/2C recovered from a chick in the year 2013 in nest KLO_09/12 (see Table 1, Fig. 2 and Suppl. Fig. S4)

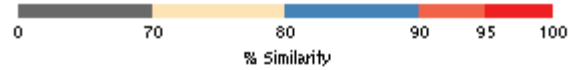
Wilharm *et al.*
 Supplementary Fig. S9
 DiversiLab rep-PCR analysis of selected avian isolates of *A. baumannii* and relationship to clonal lineages



* Avian wildlife isolate
⊙ Avian livestock isolate

SIMILARITY MATRIX

Diversilab v3.6
PC
#91

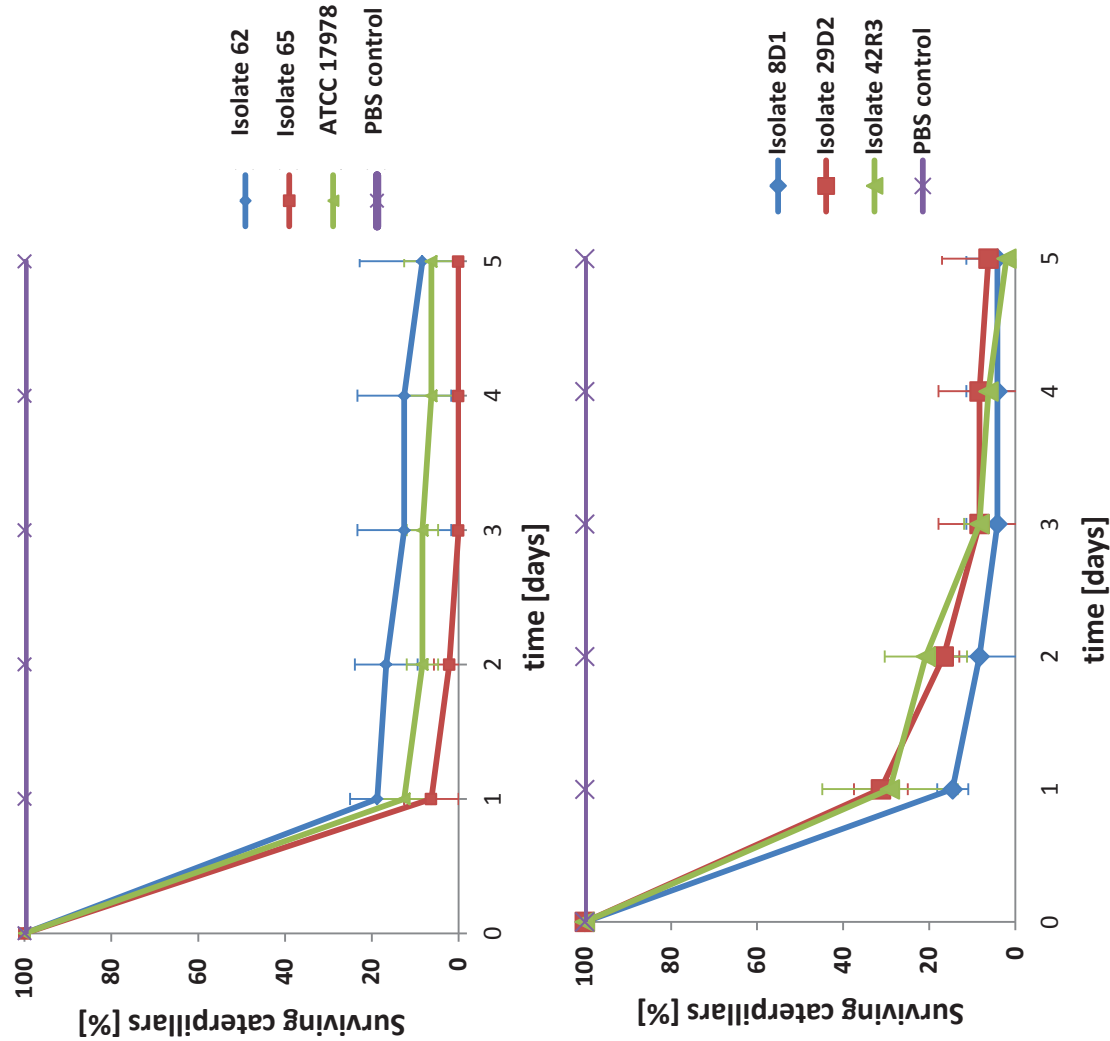


1	IB9																							
99.6	2	IB2																						
94.1	94	3	159/1C																					
91.2	92.2	90.3	4	3.5D																				
87.3	89.3	87.1	94.6	5	BMBF384																			
91.8	91.8	88.3	91	88.2	6	BMBF440																		
88.4	88.4	86.6	91.4	82.8	90.9	7	192/2 C																	
87.7	88.3	88.2	87.1	83.9	84.2	87.3	8	42R3																
89.2	90	89.4	89	85.4	85.2	87.7	99.4	9	280/1 C															
84.8	85.2	84.1	87	82.3	79.7	88.5	92.6	92.7	10	BMBF417														
87.1	88.4	84.7	89.8	89.4	83.3	82.4	91	92	86.9	11	BMBF18													
81.4	82	81.2	88.4	86.1	84.6	86.8	85	84.3	87.5	84.7	12	291/1C												
79.6	80	79.2	83.2	80.6	74.3	78.9	84	83.8	87.1	85.2	87.4	13	29D2											
81	81.1	81.2	82.8	89.7	84.4	75	79.2	80.1	76.4	81	83.4	77.8	14	BMBF247										
77.3	76.1	72.5	78	71.8	75.8	76	73.4	73	71.7	73.8	73	70.9	68.7	15	278/3C									
62.8	64.8	64.3	70.8	73	70.3	65.1	74.2	73.9	71.2	75.4	78	70.5	78.7	61.7	16	BMBF459								
63.2	64	65	74.1	77.1	63.4	63.1	68.8	68.4	79.9	76.6	82	81.2	82.4	67.4	85.2	17	IB3							
65.5	66.9	67.8	74.3	76.4	65.5	65.6	84.5	84	79.4	81	76.4	75.4	76.9	68.8	83.6	80.8	18	65						
54.7	56.1	57.4	67.3	66.1	56.9	66.1	75.6	74.3	77.4	70.9	75.4	75.6	67.9	67.1	78	78.2	82.1	19	BMBF34					
61	62	64.8	80.7	77.6	74.2	78.1	69.8	70	69.6	71.2	80.1	67.5	75.3	68.6	75	72.2	72.7	76.6	20	31D1				
62.7	63.7	67	78.1	71.8	73.7	81.8	66	65.4	69.5	65.4	76.8	63.4	69.8	68.4	63.3	65.5	59.8	69.1	91	21	IB1			
52.8	53	59.3	68.4	61	69.9	70.1	54.9	54.2	52.2	55.3	67.2	53	63.9	67.9	59.9	54.2	53.3	60.1	87.8	90	22	8D1		
55.2	54.7	61.9	63.9	64.5	68.2	60.7	61.3	61.3	58.2	60.4	63.9	60.3	76.9	55.3	67.9	63.7	60.5	62.9	78.6	71.3	75.7	23	BMBF468	

Wilharm *et al.*

Supplementary Fig. S10

The virulence of avian isolates of *A. baumannii* is comparable to that of clinical isolates in the *Galleria mellonella* infection model



III. CONCLUSIONS ET DISCUSSIONS

En résumé, les travaux réalisés durant cette thèse montrent que le SST6 de la souche DSM30011 d'Ab est impliqué dans la compétition bactérienne et dans la virulence *in vivo*. En revanche, le SST6 des souches cliniques 242, 244, 825 et des souches hypervirulentes 5075 et V028900 est inactif dans les conditions testées. Toutes les souches étudiées ont la capacité d'adhérer et d'envahir les cellules mais seules les souches hypervirulentes V028900 et 5075 ont une augmentation du nombre de bactéries entre 3h et 24h, suggérant qu'elles se répliquent à l'intérieur de la cellule. Ce phénotype reste à confirmer mais pourrait expliquer l'hypervirulence de ces souches cliniques. Enfin, les bactéries intracellulaires se trouvent jusqu'à 48h dans un compartiment associé à LAMP1, un marqueur de l'endosome tardif et du lysosome.

1. Le SST6 d'Ab : rôle et régulation

Dans la littérature, s'il était admis au début de mes travaux de recherche que le SST6 était répandu chez les souches d'*Acinetobacter*, sa fonction semblait dépendre de la souche étudiée. Seulement un article décrivait le SST6 chez Ab tandis qu'un autre se focalisait sur *A. nosocomialis* [195,196]. Le SST6 de la souche 17978 d'Ab a été décrit comme actif, mais ni sa fonction ni son rôle dans la virulence n'ont pu être identifiés [195]. En accord avec ces travaux, nous avons également observé qu'il est fonctionnel. Cependant, celui-ci n'a aucun rôle dans la compétition bactérienne. Toutefois, la souche 17978 est capable de tuer *E. coli* de façon contact dépendant. Pourtant cette souche ne présente pas d'autres gènes codant un SST6. Certaines souches d'Ab possèdent plusieurs systèmes CDI fonctionnels permettant l'inhibition de la croissance des bactéries voisines [181]. Nous n'avons pas détecté par analyse bio-informatique la présence de gènes codant des systèmes CDI dans le génome de la souche 17978. Il reste donc à identifier comment cette souche est capable d'inhiber la croissance d'*E. coli* et déterminer pourquoi elle maintient un SST6 actif.

Les souches cliniques d'Ab étudiées codent les gènes permettant la formation d'un SST6 fonctionnel. Des transcrits des gènes *hcp* et *tssM* ont été détecté et la protéine Hcp est présente dans la fraction cytoplasmique de ces souches. De façon inattendue, le système est inactif chez les souches cliniques dans les conditions testées au laboratoire puisque la protéine Hcp n'est pas sécrétée dans les surnageants. Cette inactivité suggère une régulation différente du SST6 chez ces souches ou un effet délétère de celui-ci menant à

son inhibition. Des études génomiques récentes ont confirmé qu'une importante proportion des isolats cliniques présente une délétion partielle ou entière des gènes associés au SST6 [240–242].

Lors de la révision de notre premier article, M. Feldman et son équipe ont publié un article décrivant le mécanisme de régulation du SST6 identifié chez leurs souches d'Ab [217]. Deux populations distinctes étaient présentes chez une souche MDR récemment isolée (Ab04) : l'une exprimait un SST6 actif (SST6+) tandis que la seconde ne l'exprimait pas (SST6-). La souche Ab04 SST6- était incapable de tuer les bactéries avec lesquelles elle était en compétition. Selon l'expression ou non du SST6, la souche Ab₀₄ possède une susceptibilité différente aux antibiotiques. Après séquençage d'une colonie représentative de chaque population, le plasmide pAB04-1 a été identifié chez la souche Ab₀₄ SST6-. Ce plasmide est responsable de la répression du SST6. En effet, il est absent chez les souches Ab₀₄ SST6+. Le plasmide pAB04-1 code deux répresseurs du type TetR à l'origine de l'inhibition transcriptionnelle du SST6 [243,244]. L'expression ectopique de chacun des gènes codant TetR chez les souches SST6+ entraîne l'inhibition de l'expression et de la sécrétion de Hcp ainsi que l'incapacité d'Ab à tuer *E. coli*.

La souche 17978 possède, quant à elle, le plasmide pAB3. L'analyse des séquences des plasmides pAB3 et pAB04-1 indique qu'ils sont très proches phylogénétiquement. Le plasmide pAB04-1 contient un large ilot comprenant plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques, absent chez pAB3. Des plasmides similaires à pAB04-1 sont présents chez de nombreuses souches MDR d'Ab récemment isolées, suggérant une large distribution de ce plasmide conjugatif chez Ab.

Le phénotype du SST6 est contrôlé par la présence ou l'absence du plasmide contenant le répresseur appartenant à la famille TetR. Le plasmide est donc à l'origine de la répression du SST6 chez les souches qui le possèdent. En revanche, sa présence apporte à la souche un phénotype MDR grâce à l'ensemble des gènes de résistance qu'il code. Weber *et al.* proposent un modèle dans lequel, dans un environnement dépourvu d'antibiotiques, certaines bactéries de la population perdent le plasmide et retrouvent alors un SST6 actif. Lors d'une exposition aux antibiotiques, les bactéries sensibles aux antibiotiques, suite à

la perte du plasmide, sont éliminées mais la population l'ayant maintenu survit. Ce cycle pouvant être répété car la population survivante peut se multiplier à nouveau (Figure 29).

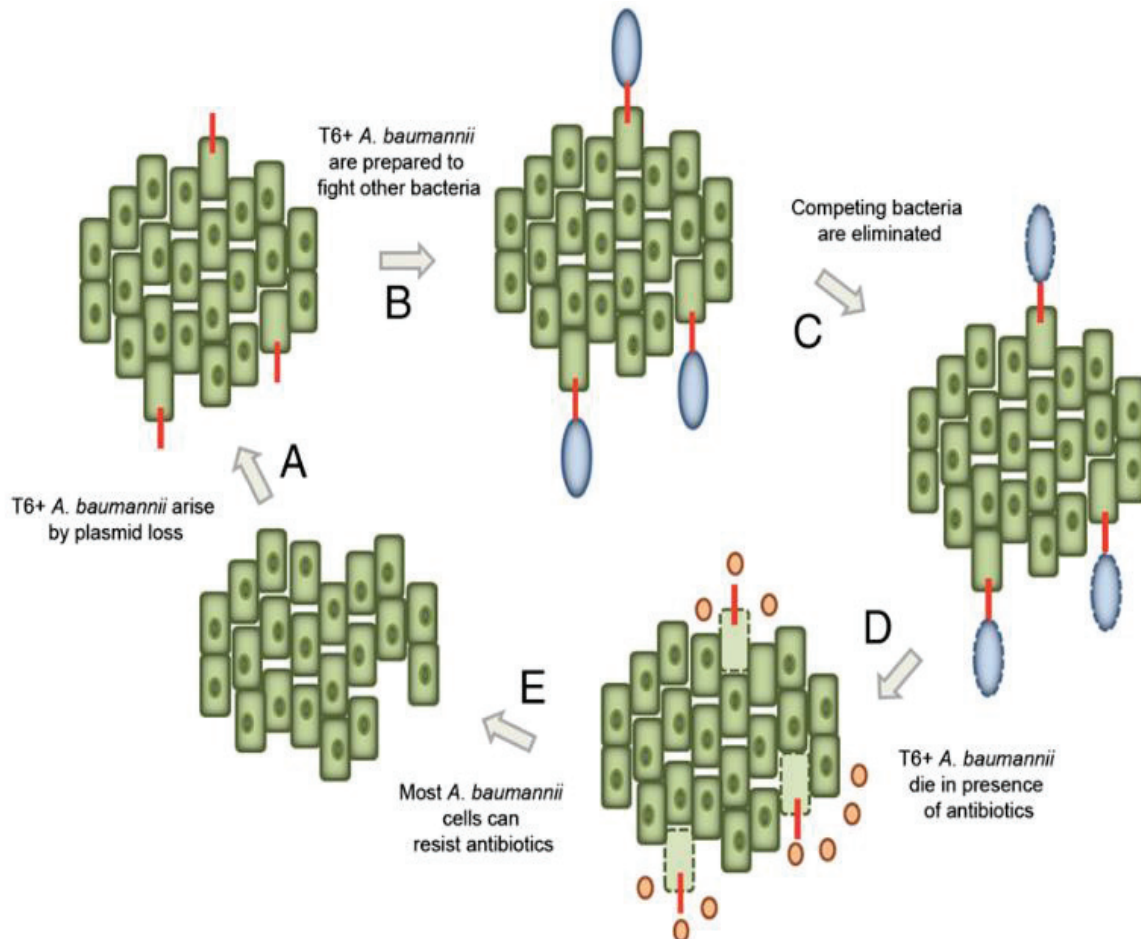


Figure 29. Modèle de régulation du SST6 chez Ab.

Weber *et al.* proposent que la population d'Ab possède le plasmide réprimant l'expression du SST6. A) En absence d'antibiotiques dans le milieu, une partie de la population d'Ab perd le plasmide et exprime le SST6. B-C) Le SST6 permet alors l'élimination des bactéries compétitrices. D-E) Lors d'une exposition aux antibiotiques, les bactéries ayant perdu le plasmide meurent et le reste de la population ayant maintenu le plasmide codant des gènes de résistance survit. Figure issue de l'article de Weber *et al.* [217].

Cependant, lors de notre étude portant sur le SST6, nous avons observé l'expression de transcrits d'ARN de Hcp chez les souches cliniques 242, 244 et 825 (Figure 2 de [198]). De plus, l'analyse de leurs génomes n'a pas permis l'identification du plasmide décrit par Weber *et al.*, ni l'identification de séquences de régulateurs transcriptionnels. Différentes hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette absence. Le plasmide pourrait être présent chez une partie de notre population, expliquant ainsi l'absence de sécrétion de

Hcp et l'inactivité du SST6. Dans ce cas, le plasmide aurait été perdu au moment de la préparation des échantillons pour le séquençage, expliquant l'absence de celui-ci lors de l'analyse génomique. Il est également possible que les souches cliniques 242, 244 et 825 possèdent un autre système de régulation en plus de leur SST6. Concernant les souches cliniques hypervirulentes 5075 et V028900, les analyses sont en cours pour tenter de mettre en évidence la présence de ces régulateurs.

Bien que la plupart des souches cliniques étudiées n'aient pas un SST6 actif dans les conditions de laboratoire testées, nous ne pouvons pas exclure un rôle pour ce système dans la virulence ou lors de la colonisation d'un patient. Un crible d'une banque de mutants aléatoire générée chez la souche 5075 d'Ab lors de l'infection de *G. mellonella* a permis d'identifier 300 gènes essentiels à la survie de cette souche en contexte d'infection [245]. Parmi eux, *hcp* et des gènes codant des protéines associées au SST6 ont été identifiés, suggérant une implication du SST6 dans la survie d'Ab 5075 chez ce modèle d'infection. Lors de notre étude nous avons également montré que le SST6 de la souche DSM30011 contribue à sa virulence chez ce même modèle d'infection. Davantage d'études sont nécessaires pour élucider le rôle du SST6 *in vivo* et mieux caractériser ses mécanismes de régulation.

Dans un contexte de colonisation de l'environnement, la présence du SST6 pourrait aider non seulement à l'élimination de bactéries compétitrices mais aussi à l'acquisition de matériel génétique. Chez *V. cholerae*, l'expression des éléments impliqués dans la compétence naturelle et des gènes du SST6 a lieu simultanément [246]. La destruction des bactéries avec lesquelles *V. cholerae* entre en contact est dépendante de son SST6. Dans ces mêmes conditions, son état de compétence permet l'acquisition horizontale de l'ADN libéré dans le milieu [246]. Récemment, le SST6 impliqué dans la compétition bactérienne chez *A. baylyi*, a été lui aussi impliqué dans l'acquisition de matériel génétique. La lyse des bactéries bénéficie à l'ensemble de la population bactérienne car elle permet également l'augmentation de la fréquence du transfert horizontal chez des souches d'Ab dépourvues de SST6 fonctionnel [247,248].

2. Adhésion et phase intracellulaire d'Ab

Nous avons comparé l'interaction des souches cliniques hypervirulentes, de la souche de référence 17978 et de la souche environnementale DSM30011 avec les cellules épithéliales pulmonaires humaines.

La souche 5075 est la seule de celles testées qui adhère davantage aux cellules épithéliales pulmonaires après 5h de contact. Ab produit des pili impliqués dans l'adhésion aux surfaces abiotiques et biotiques [103,249]. Il est possible que la souche 5075 produise un type de pili exprimé en conditions statiques qui permettent une adhésion aux cellules eucaryotes plus efficace. Lors des expériences réalisées, les bactéries ont été cultivées durant la nuit sous agitation, l'effet de ces pili pourrait être indétectable à 1h. Il serait intéressant de reproduire l'expérience d'adhésion en cultivant au préalable toutes les souches sans agitation puis en les mettant en contact avec les cellules eucaryotes durant différents temps afin de vérifier notre hypothèse.

Grâce aux expériences d'invasion et à la microscopie confocale, nous avons remarqué que la souche 5075 semble avoir une phase transitoire de réplication intracellulaire qui pourrait également être présente chez la souche V028900. Cette phase de réplication intracellulaire est observée uniquement chez les souches hypervirulentes étudiées. Ce phénotype pourrait expliquer la virulence accrue de ces souches. Néanmoins, en raison de la grande variabilité observée lors des comptages du nombre de CFU intracellulaire ainsi que la difficulté à visualiser les bactéries intracellulaires, ces résultats restent à confirmer par l'utilisation d'autres techniques. Cette variation peut être due au phénomène de variation de phase décrit chez la souche 5075 [250] (Figure 30).

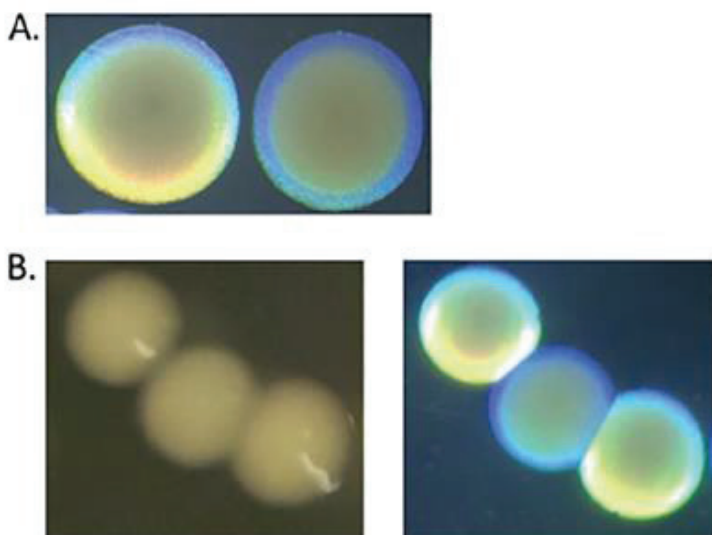


Figure 30. Variation de phase chez la souche 5075 d'Ab.

A) Image de colonies sur boîte de pétri montrant à gauche une colonie opaque et à droite une colonie translucide. B) Le dessous des colonies est observé sous lumière classique à gauche ou sous éclairage oblique. Une colonie translucide est entourée par des colonies opaques. Images issues de [250].

Tipton *et al.* ont remarqué que la souche 5075 présente deux phénotypes différents lorsqu'elle est étalée sur boîte de pétri [250] (Figure 30). Certaines colonies ont un aspect opaque alors que d'autres ont un aspect translucide. Les colonies opaques peuvent devenir translucide et inversement. Le phénomène a été décrit comme instable avec une fréquence de variation importante, dépendante de la densité cellulaire. Cette variation de phase a des conséquences morphologiques mais également au niveau de la virulence de la souche. Les colonies opaques sont plus motiles et plus virulentes *in vivo* lors de l'infection de *G. mellonella* tandis que la souche translucide forme davantage de biofilms et pellicules [220]. De plus, selon la phase dans laquelle se trouve la colonie, celle-ci présente des différences en termes de résistance aux antibiotiques. Ce phénomène de variation de phase a également été observé chez d'autres isolats cliniques d'Ab [250].

Le système à deux composants *OmpR/EnvZ* régulant la variation de phase chez la souche 5075, a été identifié en 2016 [220]. La kinase EnvZ, présente à la surface de la cellule, capte les signaux de l'environnement puis phosphoryle OmpR qui jouera alors son rôle de régulateur transcriptionnel. Chez *E. coli*, ce système agit comme un régulateur transcriptionnel global régulant de nombreux gènes. Parmi eux, *OmpR/EnvZ* contrôle notamment l'expression des Omp en réponse au choc osmotique. Il est possible que ce système régule également l'expression des Omp chez Ab mais cela n'a pas encore été caractérisé. Chez Ab, les mutants $\Delta ompR$, $\Delta envZ$ et $\Delta ompR\Delta envZ$ ont une augmentation importante de leur fréquence de conversion de la phase opaque à translucide, tandis que le mutant $\Delta envZ$ augmente sa fréquence de conversion de la phase translucide à opaque. Il semblerait que le phénomène de variation de phase soit subtilement contrôlé et qu'il existe des voies de signalisation distinctes dans lesquelles interviennent OmpR et EnvZ. En revanche, la pléiotropie des fonctions régulées par OmpR/EnvZ chez la souche 5075 suggère que, de façon identique à *E. coli*, OmpR a une action globale sur la régulation transcriptionnelle d'Ab.

La nature du signal contrôlant la variation de phase n'a pas été identifié. La rapidité de la variation de phase et le changement global qu'elle induit chez Ab pourraient être un moyen rapide d'adaptation. Au vu de la différence de virulence observée entre les colonies opaques et translucides, il est important d'élucider complètement ce mécanisme et de connaître quels signaux régulent cette variation. D'autres souches cliniques ayant montré

des variations de phase, il se pourrait que ce mécanisme existe chez la souche V028900 expliquant les variations observées pour cette souche lors de la quantification du nombre de bactéries intracellulaires.

Une légère augmentation de CFU intracellulaire a été observée lors de l'infection de cellules épithéliales pulmonaires humaines par la souche 19606 de laboratoire d'Ab [157]. Pour cette souche, la charge bactérienne intracellulaire est contrôlée par la voie de signalisation Nod1/Nod2-Rip2 qui permet la diminution du nombre de bactéries à 48h. Dans notre cas, nous observons une augmentation beaucoup plus importante à 24h du nombre de bactéries intracellulaires pour les souches hypervirulentes suivi également d'une diminution à 48h. Afin de vérifier si la voie Nod1/Nod2-Rip2 est impliquée dans le contrôle de la population intracellulaire des souches hypervirulentes, nous devrions effectuer des infections de cellules épithéliales en inhibant cette voie.

Au niveau intracellulaire, la majorité des bactéries des différentes souches d'Ab sont associées à LAMP1 après 3h, 24h et jusqu'à 48h après-infection. Ab semble donc être dans une vacuole associée à un marqueur de l'endosome tardif et du lysosome. L'endocytose permet *via* l'internalisation d'éléments tels que des nutriments ou des récepteurs cellulaires d'assurer des fonctions essentielles à la cellule [251]. Certains pathogènes utilisent et détournent la voie endosomale pour permettre leur survie à l'intérieur de la cellule infectée [252]. *Mycobacterium tuberculosis* se trouve dans une vacuole associée à l'endosome précoce. Cependant, *M. tuberculosis* sécrète des facteurs empêchant la maturation et l'acidification de la vacuole dans laquelle elle se trouve. Elle inhibe ainsi la fusion de cette vacuole avec le lysosome avant d'en sortir pour rejoindre le cytosol [252]. De la même manière, après son entrée par macropinocytose, *Haemophilus influenza* est associée à une vacuole aux caractéristiques de l'endosome tardif. A l'intérieur de cette vacuole, *H. influenza* est métaboliquement actif et empêche sa maturation. La population intracellulaire reste stable jusqu'à 24h après infection puis décline progressivement [238,253,254]. Ces résultats ont été confirmés grâce à l'utilisation de l'hybridation *in situ* (FISH), une technique d'hybridation de sonde ADN ou ARN couplée à un fluorochrome. Cette technique a également permis à Pédrón *et al.* de détecter la présence d'*Acinetobacter* au niveau des cryptes du colon chez la souris [20]. Il serait intéressant, dans notre cas,

d'utiliser la technique du FISH pour quantifier le nombre de bactéries intracellulaires, en particulier pour les souches hypervirulentes, afin de corrélérer les résultats obtenus par le comptage des bactéries issues des lysats cellulaires. Il serait aussi important de rechercher si la vacuole associée à Ab a fusionné avec le lysosome, à l'aide de différents marqueurs.

A différentes reprises, la présence d'Ab dans un compartiment à double membrane a été suggéré dans la littérature [124,125]. Fin 2017, une étude a montré qu'Ab induit une réponse autophagique [125]. Ab a été observé dans un compartiment LAMP1⁺ acide aux caractéristiques de l'autophagosome. Cette étude indique également une augmentation du nombre de bactéries intracellulaires jusqu'à 6h. Bien que selon cette étude l'autophagie permette l'élimination d'Ab chez les cellules phagocytaires, elle ne permet pas le contrôle de la réplication d'Ab dans les cellules épithéliales [125]. Cependant, leur étude se limite à l'analyse du nombre de bactéries intracellulaires à 6h après infection. Une étude à des temps plus tardifs permettrait de vérifier l'implication de l'autophagie dans l'élimination d'Ab chez les cellules épithéliales. Lors de notre étude, aucun recrutement de LC3 ni de p62, des protéines caractéristiques de l'autophagie, n'a été observé de lors de l'infection des cellules épithéliales par la souche 17978. Ce résultat suggère une absence d'induction de l'autophagie bien que cette souche se trouve aussi dans un compartiment LAMP1⁺. Il serait intéressant d'effectuer à nouveau ces marquages avec l'ensemble des souches mais également d'effectuer de la microscopie électronique afin d'observer la présence de double membrane autour d'Ab.

Un aspect important qui reste à être étudié est : le statut de la bactérie au sein de ces compartiments. Lors des expériences d'invasion, les bactéries issues de lysats de cellules infectées récupérés jusqu'à 48h après infection croissent, indiquant qu'une partie au moins de la population est dans un état cultivable. Pour s'assurer que l'ensemble de la population visualisée par microscopie est métaboliquement actif, nous pourrions utiliser un plasmide inductible afin de savoir si la bactérie répond à des signaux extérieurs en produisant par exemple une molécule fluorescente [255]. D'autres outils permettent de savoir si la bactérie se divise, notamment des systèmes de plasmides rapporteurs basés sur la mesure de la dilution de la fluorescence [256]. En effet, les bactéries possèdent un plasmide dont la fluorescence est induite à un moment précis. Après l'arrêt de l'induction,

115

cette fluorescence est maintenue chez les bactéries ne se divisant pas alors qu'elle est diluée chez les bactéries en division.

Il est important d'élucider le statut métabolique d'Ab lors de sa phase intracellulaire car sa présence jusqu'à 48h après infection suggère un mécanisme de persistance [257]. Les bactéries persistantes sont tolérantes au traitement antibiotique. Cette tolérance est permise par la diminution de leur activité métabolique et par la diminution voire l'arrêt de leur croissance [258]. La perception d'un stress par la bactérie entraîne, pour se protéger, la formation de bactéries persistantes. Elles posent d'importants problèmes lors du traitement des infections chez les patients. En effet, l'élimination incomplète de l'ensemble des bactéries à l'origine de l'infection conduit à la réapparition de l'infection. Quelques données dans la littérature suggèrent l'existence de bactéries persistantes chez Ab. Des infections récurrentes sont observées chez des patients souffrant de bactériémie traités par antibiothérapie [259]. Des images de microscopie électronique montrent une compaction importante de l'ADN des bactéries intracellulaires, suggérant un ralentissement de l'activité métabolique d'Ab [124,131]. Ces deux phénotypes sont des caractéristiques associées à l'émergence de bactéries persistantes [124,131,259]. L'apparition de bactéries persistantes d'Ab a aussi été observée suite au traitement des bactéries par la colistine [260]. Parmi les 45 souches d'Ab testées, une variation importante dans la capacité de former des persistantes a été observée [260]. Bhargava *et al.* ont montré que 0,02 % à 0,07 % de la population d'Ab devient persistante suite à l'exposition d'Ab à deux antibiotiques. Cette proportion augmente de trois à quatre fois lorsque l'exposition aux antibiotiques est faite en présence de pyocyanine, une toxine produite par *P. aeruginosa* [261]. Ces résultats sont intéressants, dans la mesure où Ab et *P. aeruginosa* peuvent cohabiter dans un contexte d'infection [210,262]. Néanmoins, il reste à savoir si ces bactéries persistantes jouent un rôle dans l'infection des patients et dans la virulence des souches d'Ab. Il serait intéressant d'obtenir des biopsies de patients infectés par Ab et de définir par microscopie le compartiment intracellulaire dans lequel se trouve Ab et si des bactéries persistantes sont détectées.

3. La RI induite par Ab

Nous avons montré que la souche V028900 induit une sécrétion légèrement moins importante d'IL-6 que les autres souches d'Ab. L'IL-6 joue un rôle important dans le recrutement de neutrophiles, essentiels à l'élimination d'Ab. La limitation de la RI induite lors de l'infection des cellules par Ab pourrait être une stratégie de virulence de certaines souches cliniques. En accord avec cette hypothèse, une étude a comparé l'induction d'une RI chez des cellules épithéliales pulmonaires et des cellules de macrophages infectées par Ab et *A. junnei*, peu impliquée dans des infections. Les cellules infectées par Ab produisent significativement moins de cytokines [111]. Diminuer la RI pourrait permettre à Ab de limiter ou retarder son élimination. Il serait intéressant de savoir si ce phénomène est dépendant de facteurs de virulence spécifiques. Par exemple, la diminution ou le changement en composition des Omp ou la sécrétion des molécules inhibant les voies de signalisation de la RI pourraient être des mécanismes mis en place par Ab. L'analyse du génome de différentes souches d'Ab au cours de l'infection d'un patient montre un enrichissement de mutations au niveau des gènes associés à la synthèse et l'organisation des polysaccharides de surface [84]. De même, l'analyse des transcrits ARN montre une altération des gènes associés aux protéines de surface [263]. Ces résultats indiquent qu'une forte pression de sélection a lieu au niveau de ces gènes chez Ab lors de l'infection d'un patient.

La production de la capsule est certainement une stratégie développée afin d'échapper au SI [264], particulièrement dans un contexte de traitement d'un patient. En effet, l'exposition d'Ab à une concentration sub-inhibitrice d'antibiotique conduit à l'augmentation de la production de sa capsule [11]. Des tentatives de création d'anticorps monoclonaux dirigés contre Ab afin de permettre leur élimination par le SI ont échoué. Les anticorps produits permettent une reconnaissance et une élimination plus efficace par le macrophage de souche dépourvu de capsule alors qu'ils n'ont aucun effet sur celui de souches produisant une capsule [264]. Enfin, l'immunisation de souris avec ces anticorps ne confère pas de protection contre l'infection.

4. Dissémination d'Ab à travers de l'épithélium

Nous avons observé qu'Ab n'induit pas de déstabilisation de la monocouche cellulaire polarisée lors de son infection. Néanmoins, nous avons pu détecter la présence de

bactéries du côté basolatéral suggérant que les bactéries aient pu passer la monocouche cellulaire. Ces résultats et leur pertinence *in vivo* restent à confirmer par davantage d'expériences. Ab pourrait franchir la barrière épithéliale sans créer de dommage pour permettre sa dissémination. Il existe des pathogènes comme *Neisseria gonorrhoeae* qui ont une phase transitoire intracellulaire permettant leur passage à travers les cellules épithéliales ou endothéliales pour rejoindre un autre tissu ou la circulation sanguine [265,266]. *P. aeruginosa* clive, via la sécrétion de LasB, les jonctions VE-cadhérine ce qui induit une déstabilisation de la monocouche cellulaire [223]. Le clivage des jonctions a également été observé lors d'infections *in vivo* et pourrait être impliqué dans la dissémination de *P. aeruginosa*. Il peut également, de façon opportuniste, passer la barrière épithéliale en profitant de la division ou de la mort d'une cellule [267]. Dans le cas d'Ab, aucune étude n'indique un passage de l'épithélium sans qu'il n'y est au préalable une rupture de la barrière épithéliale.

5. Conclusion

L'ensemble de ce travail de thèse aura montré qu'Ab et notamment les souches hypervirulentes possèdent des caractéristiques qui leur sont propres. En effet, bien que toutes les souches possèdent un SST6, leur fonction et leur régulation sont différentes, montrant que le choix de la souche d'étude est important pour pouvoir comprendre les mécanismes de virulence pertinents lors de l'infection de l'hôte. La grande variation génétique existante au sein de l'espèce d'Ab et notamment des souches cliniques rend difficile la généralisation de conclusions obtenues lors de la caractérisation d'une seule souche. De plus, les phénotypes MDR et XDR des souches cliniques compliquent leur étude. La souche hypervirulente 5075 reste néanmoins un modèle intéressant d'étude par l'accessibilité de son génome et la disponibilité d'une banque de mutants. Toutefois, cette souche, à travers la variation de phase, possède des mécanismes encore peu décrits chez Ab lui permettant de complètement moduler sa virulence. Enfin, nous avons montré que les souches hypervirulentes semblent posséder un mécanisme qui leur est spécifique. Elles pourraient avoir une phase intracellulaire de réplication plus importante que ce qui a été décrit auparavant. Ce résultat ouvre des nouvelles perspectives intéressantes pour mieux comprendre l'hypervirulence des souches récemment isolées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

1. Jeannot K, Diancourt L, Vaux S, Thouverez M, Ribeiro A, Coignard B, *et al.* Molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible *Acinetobacter baumannii* in France. PloS One. 2014 ;9 : e115452. doi : 10.1371/journal.pone.0115452
2. Rapid risk assessment : Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in healthcare settings – 8 December 2016. In : European Centre for Disease Prevention and Control. 9 Dec 2016
3. Tomaszek F, Higgins PG, Stefanik D, Wisplinghoff H, Seifert H. Head-to-Head Comparison of Two Multi-Locus Sequence Typing (MLST) Schemes for Characterization of *Acinetobacter baumannii* Outbreak and Sporadic Isolates. PloS One. 2016 ;11 : e0153014. doi : 10.1371/journal.pone.0153014
4. Wilharm G, Piesker J, Laue M, Skieba E. DNA Uptake by the Nosocomial Pathogen *Acinetobacter baumannii* Occurs during Movement along Wet Surfaces. J Bacteriol. 2013 ;195 : 4146–4153. doi : 10.1128/JB.00754-13
5. Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. Microbiol Read Engl. 2011 ;157 : 2534–2544. doi :10.1099/mic.0.049791-0
6. Harding CM, Tracy EN, Carruthers MD, Rather PN, Actis LA, Munson RS. *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. mBio. 2013 ;4. doi :10.1128/mBio.00360-13
7. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii* : emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008 ;21 : 538–582. doi :10.1128/CMR.00058-07
8. Espinal P, Martí S, Vila J. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. J Hosp Infect. 2012 ;80 : 56–60. doi : 10.1016/j.jhin.2011.08.013
9. Weber BS, Harding CM, Feldman MF. Pathogenic *Acinetobacter* : from the Cell Surface to Infinity and Beyond. J Bacteriol. 2015 ;198 : 880–887. doi :10.1128/JB.00906-15
10. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections : a Century of Challenges. Clin Microbiol Rev. 2017 ;30 : 409–447. doi :10.1128/CMR.00058-16
11. Geisinger E, Isberg RR. Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. PLoS Pathog. 2015 ;11 : e1004691. doi : 10.1371/journal.ppat.1004691
12. Houang ET, Chu YW, Leung CM, Chu KY, Berlau J, Ng KC, *et al.* Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong. J Clin Microbiol. 2001 ;39 : 228–234. doi :10.1128/JCM.39.1.228-234.2001
13. Vanechoutte M, Nemec A, Musilek M, van der Reijden TJK, van den Barselaar M, Tjernberg I, *et al.* Description of *Acinetobacter venetianus* ex Di Cello *et al.* 1997 sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2009 ;59 : 1376–1381. doi :10.1099/ij.s.0.003541-0
14. Rafei R, Hamze M, Pailhoriès H, Eveillard M, Marsollier L, Joly-Guillou M-L, *et al.* Extrahuman epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon. Appl Environ Microbiol. 2015 ;81 : 2359–2367. doi :10.1128/AEM.03824-14
15. Al Atrouni A, Joly-Guillou M-L, Hamze M, Kempf M. Reservoirs of Non-baumannii *Acinetobacter* Species. Front Microbiol. 2016 ;7 : 49. doi :10.3389/fmicb.2016.00049
16. Zordan S, Prenger-Berninghoff E, Weiss R, van der Reijden T, van den Broek P, Baljer G, *et al.* Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Veterinary Clinics, Germany. Emerg Infect Dis. 2011 ;17 : 1751–1754. doi :10.3201/eid1709.101931
17. Eveillard M, Kempf M, Belmonte O, Pailhoriès H, Joly-Guillou M-L. Reservoirs of *Acinetobacter baumannii* outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections. Int J Infect Dis. 2013 ;17 : e802-805. doi : 10.1016/j.ijid.2013.03.021
18. Dijkshoorn L, van Aken E, Shunburne L, van der Reijden TJK, Bernards AT, Nemec A, *et al.* Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. Clin Microbiol Infect. 2005 ;11 : 329–332. doi :10.1111/j.1469-0691.2005.01093.x
19. Li G, Yang M, Zhou K, Zhang L, Tian L, Lv S, *et al.* Diversity of Duodenal and Rectal Microbiota in Biopsy Tissues and Luminal Contents in Healthy Volunteers. J Microbiol Biotechnol. 2015 ;25 : 1136–1145. doi :10.4014/jmb.1412.12047
20. Pédrón T, Mulet C, Dauga C, Frangeul L, Chervaux C, Grompone G, *et al.* A crypt-specific core microbiota resides in the mouse colon. mBio. 2012 ;3 : e00116-12. doi :10.1128/mBio.00116-12
21. Saffarian A, Touchon M, Mulet C, Tournéize R, Passet V, Brisse S, *et al.* Comparative genomic analysis of *Acinetobacter* strains isolated from murine colonic crypts. BMC Genomics. 2017 ;18 : 525. doi :10.1186/s12864-017-3925-x

22. Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin : comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J Clin Microbiol.* 1997 ;35 : 2819–2825.
23. Agodi A, Auxilia F, Barchitta M, Brusaferrero S, D'Alessandro D, Grillo OC, *et al.* Trends, risk factors and outcomes of healthcare-associated infections within the Italian network SPIN-UTI. *J Hosp Infect.* 2013 ;84 : 52–58. doi : 10.1016/j.jhin.2013.02.012
24. Morgan DJ, Liang SY, Smith CL, Johnson JK, Harris AD, Furuno JP, *et al.* Frequent Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Contamination of Gloves, Gowns, and Hands of Healthcare Workers. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010 ;31 : 716–721. doi :10.1086/653201
25. Longo F, Vuotto C, Donelli G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol.* 2014 ;37 : 119–127.
26. Munier A-L, Biard L, Rousseau C, Legrand M, Lafaurie M, Lomont A, *et al.* Incidence, risk factors, and outcome of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* acquisition during an outbreak in a burns unit. *J Hosp Infect.* 2017 ; doi : 10.1016/j.jhin.2017.07.020
27. De Vos D, Pirnay J-P, Bilocq F, Jennes S, Verbeken G, Rose T, *et al.* Molecular Epidemiology and Clinical Impact of *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* Complex in a Belgian Burn Wound Center. *PloS One.* 2016 ;11 : e0156237. doi : 10.1371/journal.pone.0156237
28. Leseva M, Arguirova M, Nashev D, Zamfirova E, Hadzhyiski O. Nosocomial infections in burn patients : etiology, antimicrobial resistance, means to control. *Ann Burns Fire Disasters.* 2013;26: 5–11.
29. Chastre J, Fagon J-Y. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165: 867–903. doi :10.1164/ajrccm.165.7.2105078
30. Behnia M, Logan SC, Fallen L, Catalano P. Nosocomial and ventilator-associated pneumonia in a community hospital intensive care unit: a retrospective review and analysis. *BMC Res Notes.* 2014;7: 232. doi :10.1186/1756-0500-7-232
31. Zhang Y, Yao Z, Zhan S, Yang Z, Wei D, Zhang J, *et al.* Disease burden of intensive care unit-acquired pneumonia in China: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.* 2014;29: 84–90. doi : 10.1016/j.ijid.2014.05.030
32. Chen M-Z, Hsueh P-R, Lee L-N, Yu C-J, Yang P-C, Luh K-T. Severe Community-Acquired Pneumonia due to *Acinetobacter baumannii*. *CHEST.* 2001;120: 1072–1077. doi :10.1378/chest.120.4.1072
33. Anstey NM, Currie BJ, Hassell M, Palmer D, Dwyer B, Seifert H. Community-Acquired Bacteremic *Acinetobacter* Pneumonia in Tropical Australia Is Caused by Diverse Strains of *Acinetobacter baumannii*, with Carriage in the Throat in At-Risk Groups. *J Clin Microbiol.* 2002;40: 685–686. doi :10.1128/JCM.40.2.685-686.2002
34. Ong CWM, Lye DCB, Khoo KL, Chua GSW, Yeoh SF, Leo YS, *et al.* Severe community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia: An emerging highly lethal infectious disease in the Asia-Pacific. *Respirology.* 2009;14: 1200–1205. doi :10.1111/j.1440-1843.2009.01630.x
35. Leung W-S, Chu C-M, Tsang K-Y, Lo F-H, Lo K-F, Ho P-L. Fulminant Community-Acquired *Acinetobacter baumannii* Pneumonia as a Distinct Clinical Syndrome. *CHEST.* 2006;129: 102–109. doi :10.1378/chest.129.1.102
36. Larcher R, Pantel A, Arnaud E, Sotto A, Lavigne J-P. First report of cavitary pneumonia due to community-acquired *Acinetobacter pittii*, study of virulence and overview of pathogenesis and treatment. *BMC Infect Dis.* 2017;17. doi :10.1186/s12879-017-2589-0
37. Zhou H-Y, Yuan Z, Du Y-P. Prior use of four invasive procedures increases the risk of *Acinetobacter baumannii* nosocomial bacteremia among patients in intensive care units: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.* 2014;22: 25–30. doi : 10.1016/j.ijid.2014.01.018
38. Marra AR, Camargo LFA, Pignatari ACC, Sukiennik T, Behar PRP, Medeiros EAS, *et al.* Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. *J Clin Microbiol.* 2011;49: 1866–1871. doi :10.1128/JCM.00376-11
39. Wu J, Gan T, Zhu Y, Cao J, Ji C, Wu Y, *et al.* Epidemiology and microbiology of nosocomial bloodstream infections: analysis of 482 cases from a retrospective surveillance study. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2015;16: 70–77. doi :10.1631/jzus. B1400108
40. Ballouz T, Aridi J, Afif C, Irani J, Lakis C, Nasreddine R, *et al.* Risk Factors, Clinical Presentation, and Outcome of *Acinetobacter baumannii* Bacteremia. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7. doi :10.3389/fcimb.2017.00156
41. Marchaim D, Levit D, Zigran R, Gordon M, Lazarovitch T, Carrico JA, *et al.* Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections in an endemic setting. *Future Microbiol.* 2017;12: 271–283. doi :10.2217/fmb-2016-0158

42. Liu Q, Li W, Du X, Li W, Zhong T, Tang Y, *et al.* Risk and Prognostic Factors for Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Complex Bacteremia: A Retrospective Study in a Tertiary Hospital of West China. *PloS One*. 2015;10: e0130701. doi : 10.1371/journal.pone.0130701
43. Park K-H, Shin J-H, Lee SY, Kim SH, Jang MO, Kang S-J, *et al.* The clinical characteristics, carbapenem resistance, and outcome of *Acinetobacter* bacteremia according to genospecies. *PloS One*. 2014;8: e65026. doi : 10.1371/journal.pone.0065026
44. Fitzpatrick MA, Ozer E, Bolon MK, Hauser AR. Influence of ACB complex genospecies on clinical outcomes in a U.S. hospital with high rates of multidrug resistance. *J Infect*. 2015;70: 144–152. doi : 10.1016/j.jinf.2014.09.004
45. Park YK, Jung S-I, Park K-H, Kim SH, Ko KS. Characteristics of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. other than *Acinetobacter baumannii* in South Korea. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39: 81–85. doi : 10.1016/j.ijantimicag.2011.08.006
46. Eber MR, Shardell M, Schweizer ML, Laxminarayan R, Perencevich EN. Seasonal and Temperature-Associated Increases in Gram-Negative Bacterial Bloodstream Infections among Hospitalized Patients. *PLOS ONE*. 2011;6: e25298. doi : 10.1371/journal.pone.0025298
47. Öncül O, Öksüz S, Acar A, Ülkür E, Turhan V, Uygur F, *et al.* Nosocomial infection characteristics in a burn intensive care unit: Analysis of an eleven-year active surveillance. *Burns*. 2014;40: 835–841. doi : 10.1016/j.burns.2013.11.003
48. Forson OA, Ayanka E, Olu-Taiwo M, Pappoe-Ashong PJ, Ayeh-Kumi PJ. Bacterial infections in burn wound patients at a tertiary teaching hospital in Accra, Ghana. *Ann Burns Fire Disasters*. 2017;30: 116–120.
49. Shaykh Baygloo N, Bouzari M, Rahimi F, Abedini F, Yadegari S, Soroushnia M, *et al.* Identification of Genomic Species of *Acinetobacter* Isolated from Burns of ICU Patients. *Arch Iran Med*. 2015;18: 638–642. doi : 0151810/AIM.005
50. Albrecht MC, Albrecht MA, Griffith ME, Murray CK, Chung KK, Horvath EE, *et al.* Impact of *Acinetobacter* infection on the mortality of burn patients. *J Am Coll Surg*. 2006;203: 546–550. doi : 10.1016/j.jamcollsurg.2006.06.013
51. Djordjevic Z, Folic MM, Zivic Z, Markovic V, Jankovic SM. Nosocomial urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species: Sensitivity to antibiotics and risk factors. *Am J Infect Control*. 2013;41: 1182–1187. doi : 10.1016/j.ajic.2013.02.018
52. Jean S-S, Coombs G, Ling T, Balaji V, Rodrigues C, Mikamo H, *et al.* Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of pathogens causing urinary tract infections in the Asia-Pacific region: Results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART), 2010–2013. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;47: 328–334. doi : 10.1016/j.ijantimicag.2016.01.008
53. Vranic SM, Zatric N, Rebic V, Aljicevic M, Abdulzaimovic A. The Most Frequent Isolates from Outpatients with Urinary Tract Infection. *Mater Socio-Medica*. 2017;29: 17–20. doi : 10.5455/msm.2017.29.17-20
54. Duszyńska W, Rosenthal VD, Szczesny A, Woźnica E, Ulfik K, Ostrowska E, *et al.* Urinary tract infections in intensive care unit patients - a single-centre, 3-year observational study according to the INICC project. *Anaesthesiol Intensive Ther*. 2016;48: 1–6. doi : 10.5603/AIT.2016.0001
55. Lob SH, Hoban DJ, Sahm DF, Badal RE. Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;47: 317–323. doi : 10.1016/j.ijantimicag.2016.01.015
56. Sheppard FR, Keiser P, Craft DW, Gage F, Robson M, Brown TS, *et al.* The majority of US combat casualty soft-tissue wounds are not infected or colonized upon arrival or during treatment at a continental US military medical facility. *Am J Surg*. 2010;200: 489–495. doi : 10.1016/j.amjsurg.2010.03.001
57. Johnson EN, Burns TC, Hayda RA, Hospenthal DR, Murray CK. Infectious complications of open type III tibial fractures among combat casualties. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2007;45: 409–415. doi : 10.1086/520029
58. Öncül O, Keskin Ö, Acar HV, Küçükardalı Y, Evrenkaya R, Atasoyu EM, *et al.* Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake. *J Hosp Infect*. 2002;51: 47–51. doi : 10.1053/jhin.2002.1205
59. Wang Y, Hao P, Lu B, Yu H, Huang W, Hou H, *et al.* Causes of Infection after Earthquake, China, 2008. *Emerg Infect Dis*. 2010;16: 974–975. doi : 10.3201/eid1606.091523
60. Ni S, Li S, Yang N, Zhang S, Hu D, Li Q, *et al.* Post-neurosurgical meningitis caused by *Acinetobacter baumannii*: case series and review of the literature. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8: 21833–21838.

61. Nie XM, Huang PH, Ye QF, Wan QQ. The Distribution, Drug Resistance, and Clinical Characteristics of *Acinetobacter baumannii* Infections in Solid Organ Transplant Recipients. *Transplant Proc.* 2015;47: 2860–2864. doi : 10.1016/j.transproceed.2015.09.037
62. Shields RK, Clancy CJ, Gillis LM, Kwak EJ, Silveira FP, Massih RCA, *et al.* Epidemiology, clinical characteristics and outcomes of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections among solid organ transplant recipients. *PloS One.* 2012;7: e52349. doi : 10.1371/journal.pone.0052349
63. Biderman P, Bugaevsky Y, Ben-Zvi H, Bishara J, Goldberg E. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in lung transplant patients in the cardiothoracic intensive care unit. *Clin Transplant.* 2015;29: 756–762. doi :10.1111/ctr.12575
64. Kitazono H, Rog D, Grim SA, Clark NM, Reid GE. *Acinetobacter baumannii* infection in solid organ transplant recipients. *Clin Transplant.* 2015;29: 227–232. doi :10.1111/ctr.12508
65. Vasselle A. Politique de lutte contre les infections nosocomiales. 2014. Report No.: 3188.
66. Sunenshine RH, Wright M-O, Maragakis LL, Harris AD, Song X, Hebden J, *et al.* Multidrug-resistant *Acinetobacter* infection mortality rate and length of hospitalization. *Emerg Infect Dis.* 2007;13: 97–103. doi :10.3201/eid1301.060716
67. Lee N-Y, Lee H-C, Ko N-Y, Chang C-M, Shih H-I, Wu C-J, *et al.* Clinical and economic impact of multidrug resistance in nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia. 2007. doi :10.1086/517954
68. Giske CG, Monnet DL, Cars O, Carmeli Y, ReAct-Action on Antibiotic Resistance. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52: 813–821. doi :10.1128/AAC.01169-07
69. Villar M, Cano ME, Gato E, Garnacho-Montero J, Miguel Cisneros J, Ruíz de Alegría C, *et al.* Epidemiologic and Clinical Impact of *Acinetobacter baumannii* Colonization and Infection. *Medicine (Baltimore).* 2014;93. doi :10.1097/MD.0000000000000036
70. Lee C-R, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, *et al.* Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7. doi :10.3389/fcimb.2017.00055
71. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;18: 268–281. doi :10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
72. Manchanda V, Sanchaita S, Singh N. Multidrug Resistant *Acinetobacter*. *J Glob Infect Dis.* 2010;2: 291–304. doi :10.4103/0974-777X.68538
73. Vaux S *et al.* BEH InVS 2012.
74. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. In: European Centre for Disease Prevention and Control. 16 Nov 2015
75. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013 | Antibiotic/Antimicrobial Resistance | CDC.
76. Organisation Mondiale de la Santé. Système mondiale de surveillance de la résistance aux antimicrobiens. 2016.
77. Draft global action plan on antimicrobial resistance, 78th worldhealth assembly. 2015.
78. WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf
79. Jones CL, Clancy M, Honnold C, Singh S, Snesrud E, Onmus-Leone F, *et al.* Fatal outbreak of an emerging clone of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* with enhanced virulence. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2015;61: 145–154. doi :10.1093/cid/civ225
80. Paterson DL, Harris PNA. Editorial commentary: the new *Acinetobacter* equation: hypervirulence plus antibiotic resistance equals big trouble. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2015;61: 155–156. doi :10.1093/cid/civ227
81. Touchon M, Cury J, Yoon E-J, Krizova L, Cerqueira GC, Murphy C, *et al.* The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences. *Genome Biol Evol.* 2014;6: 2866–2882. doi :10.1093/gbe/evu225
82. Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PloS One.* 2010;5: e10034. doi : 10.1371/journal.pone.0010034
83. Villalón P, Valdezate S, Cabezas T, Ortega M, Garrido N, Vindel A, *et al.* Endemic and epidemic *Acinetobacter baumannii* clones: a twelve-year study in a tertiary care hospital. *BMC Microbiol.* 2015;15: 47. doi :10.1186/s12866-015-0383-y

84. Wright MS, Iovleva A, Jacobs MR, Bonomo RA, Adams MD. Genome dynamics of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* during infection and treatment. *Genome Med.* 2016;8: 26. doi :10.1186/s13073-016-0279-y
85. Liu F, Zhu Y, Yi Y, Lu N, Zhu B, Hu Y. Comparative genomic analysis of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates reveals extensive genomic variation and diverse antibiotic resistance determinants. *BMC Genomics.* 2014;15. doi :10.1186/1471-2164-15-1163
86. Imperi F, Antunes LCS, Blom J, Villa L, Iacono M, Visca P, *et al.* The genomics of *Acinetobacter baumannii*: insights into genome plasticity, antimicrobial resistance and pathogenicity. *IUBMB Life.* 2011;63: 1068–1074. doi :10.1002/iub.531
87. Antunes LCS, Imperi F, Carattoli A, Visca P. Deciphering the Multifactorial Nature of *Acinetobacter baumannii* Pathogenicity. *PLOS ONE.* 2011;6: e22674. doi : 10.1371/journal.pone.0022674
88. Antunes LCS, Visca P, Towner KJ. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog Dis.* 2014;71: 292–301. doi :10.1111/2049-632X.12125
89. Adams MD, Goglin K, Molyneaux N, Hujer KM, Lavender H, Jamison JJ, *et al.* Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol.* 2008;190: 8053–8064. doi :10.1128/JB.00834-08
90. Fournier P-E, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, *et al.* Comparative Genomics of Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLOS Genet.* 2006;2: e7. doi : 10.1371/journal.pgen.0020007
91. Mugnier PD, Poirel L, Nordmann P. Functional Analysis of Insertion Sequence ISAb1, Responsible for Genomic Plasticity of *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol.* 2009;191: 2414–2418. doi :10.1128/JB.01258-08
92. Haytham Y. Etude de la séquence d'insertion IS1294b et de son implication dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries. 2015.
93. Merlin C, Toussaint A. Les éléments transposables bactériens. *Société Fr Génétique.* 1999;15.
94. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, *et al.* The role of ISAb1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;258: 72–77. doi :10.1111/j.1574-6968.2006.00195.x
95. Vila J, Ruiz J, Goñi P, Marcos A, Jimenez de Anta T. Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39: 1201–1203.
96. Maragakis LL, Perl TM. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2008;46: 1254–1263. doi :10.1086/529198
97. Yoon E-J, Courvalin P, Grillot-Courvalin C. RND-type efflux pumps in multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*: major role for AdeABC overexpression and AdeRS mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57: 2989–2995. doi :10.1128/AAC.02556-12
98. Norton MD, Spilkia AJ, Godoy VG. Antibiotic Resistance Acquired through a DNA Damage-Inducible Response in *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol.* 2013;195: 1335–1345. doi :10.1128/JB.02176-12
99. Petrova OE, Sauer K. Sticky Situations: Key Components That Control Bacterial Surface Attachment. *J Bacteriol.* 2012;194: 2413–2425. doi :10.1128/JB.00003-12
100. Tomaras AP, Flagler MJ, Dorsey CW, Gaddy JA, Actis LA. Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiol Read Engl.* 2008;154: 3398–3409. doi :10.1099/mic.0.2008/019471-0
101. Liou M-L, Soo P-C, Ling S-R, Kuo H-Y, Tang CY, Chang K-C. The sensor kinase BfmS mediates virulence in *Acinetobacter baumannii*. *J Microbiol Immunol Infect Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi.* 2014;47: 275–281. doi : 10.1016/j.jmii.2012.12.004
102. Álvarez-Fraga L, Pérez A, Rumbo-Feal S, Merino M, Vallejo JA, Ohneck EJ, *et al.* Analysis of the role of the LH92_11085 gene of a biofilm hyper-producing *Acinetobacter baumannii* strain on biofilm formation and attachment to eukaryotic cells. *Virulence.* 2016;7: 443–455. doi :10.1080/21505594.2016.1145335
103. Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infect Immun.* 2009;77: 3150–3160. doi :10.1128/IAI.00096-09
104. Choi CH, Lee JS, Lee YC, Park TI, Lee JC. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC Microbiol.* 2008;8: 216. doi :10.1186/1471-2180-8-216
105. Smani Y, Fàbrega A, Roca I, Sánchez-Encinales V, Vila J, Pachón J. Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58: 1806–1808. doi :10.1128/AAC.02101-13

106. Brossard KA, Campagnari AA. The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. *Infect Immun*. 2012;80: 228–233. doi :10.1128/IAI.05913-11
107. Bentancor LV, Camacho-Peiro A, Bozkurt-Guzel C, Pier GB, Maira-Litrán T. Identification of Ata, a multifunctional trimeric autotransporter of *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol*. 2012;194: 3950–3960. doi :10.1128/JB.06769-11
108. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiol Read Engl*. 2003;149: 3473–3484. doi :10.1099/mic.0.26541-0
109. Eijkelkamp BA, Hassan KA, Paulsen IT, Brown MH. Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. *BMC Genomics*. 2011;12: 126. doi :10.1186/1471-2164-12-126
110. Thompson MG, Black CC, Pavlicek RL, Honnold CL, Wise MC, Alamneh YA, *et al*. Validation of a novel murine wound model of *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58: 1332–1342. doi :10.1128/AAC.01944-13
111. de Breij A, Dijkshoorn L, Lagendijk E, van der Meer J, Koster A, Bloemberg G, *et al*. Do Biofilm Formation and Interactions with Human Cells Explain the Clinical Success of *Acinetobacter baumannii*? *PLoS ONE*. 2010;5. doi : 10.1371/journal.pone.0010732
112. Smani Y, McConnell MJ, Pachón J. Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. *PloS One*. 2012;7: e33073. doi : 10.1371/journal.pone.0033073
113. Smani Y, Dominguez-Herrera J, Pachón J. Association of the outer membrane protein Omp33 with fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *J Infect Dis*. 2013;208: 1561–1570. doi :10.1093/infdis/jit386
114. Zimblar DL, Arivett BA, Beckett AC, Menke SM, Actis LA. Functional features of TonB energy transduction systems of *Acinetobacter baumannii*. *Infect Immun*. 2013;81: 3382–3394. doi :10.1128/IAI.00540-13
115. Weidensdorfer M, Chae JI, Makobe C, Stahl J, Averhoff B, Müller V, *et al*. Analysis of Endothelial Adherence of *Bartonella henselae* and *Acinetobacter baumannii* Using a Dynamic Human Ex Vivo Infection Model. *Infect Immun*. 2016;84: 711–722. doi :10.1128/IAI.01502-15
116. Álvarez-Fraga L, Rumbo-Feal S, Pérez A, Gómez MJ, Gayoso C, Vallejo JA, *et al*. Global assessment of small RNAs reveals a non-coding transcript involved in biofilm formation and attachment in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. *PloS One*. 2017;12: e0182084. doi : 10.1371/journal.pone.0182084
117. Schweppe DK, Harding C, Chavez JD, Wu X, Ramage E, Singh PK, *et al*. Host-Microbe Protein Interactions during Bacterial Infection. *Chem Biol*. 2015;22: 1521–1530. doi : 10.1016/j.chembiol.2015.09.015
118. Castanon MJ, Gernot W, Winter L, Gerhard W. Plectin–intermediate filament partnership in skin, skeletal muscle, and peripheral nerve. *Histochem Cell Biol*. 2013;140: 33–55.
119. Al-Jassar C, Bikker H, Overduin M, Chidgey M. Mechanistic Basis of Desmosome-Targeted Diseases. *J Mol Biol*. 2013;425.
120. Nekrasova O, Green KJ. Desmosome assembly and dynamics. *Trends Cell Biol*. 2013;23: 537–546.
121. Smani Y, Docobo-Pérez F, López-Rojas R, Domínguez-Herrera J, Ibáñez-Martínez J, Pachón J. Platelet-activating Factor Receptor Initiates Contact of *Acinetobacter baumannii* Expressing Phosphorylcholine with Host Cells. *J Biol Chem*. 2012;287: 26901–26910. doi :10.1074/jbc.M112.344556
122. Jacobs AC, Hood I, Boyd KL, Olson PD, Morrison JM, Carson S, *et al*. Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infect Immun*. 2010;78: 1952–1962. doi :10.1128/IAI.00889-09
123. Stahl J, Bergmann H, Göttig S, Ebersberger I, Averhoff B. *Acinetobacter baumannii* Virulence Is Mediated by the Concerted Action of Three Phospholipases D. *PLOS ONE*. 2015;10: e0138360. doi : 10.1371/journal.pone.0138360
124. Rumbo C, Tomás M, Fernández Moreira E, Soares NC, Carvajal M, Santillana E, *et al*. The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. *Infect Immun*. 2014;82: 4666–4680. doi :10.1128/IAI.02034-14
125. Wang Y, Zhang K, Shi X, Wang C, Wang F, Fan J, *et al*. Critical role of bacterial isochorismatase in the autophagic process induced by *Acinetobacter baumannii* in mammalian cells. *FASEB J*. 2016;30: 3563–3577. doi :10.1096/fj.201500019R
126. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ*. 2015;22: 526–539. doi :10.1038/cdd.2014.216

127. Benn SC, Woolf CJ. Adult neuron survival strategies--slamming on the brakes. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5: 686–700. doi :10.1038/nrn1477
128. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed Res Int*. 2014;2014: 150845. doi :10.1155/2014/150845
129. Poreba M, Strózyk A, Salvesen GS, Drag M. Caspase substrates and inhibitors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5: a008680. doi :10.1101/cshperspect. a008680
130. Smani Y, Docobo-Pérez F, McConnell MJ, Pachón J. *Acinetobacter baumannii*-induced lung cell death: role of inflammation, oxidative stress and cytosolic calcium. *Microb Pathog*. 2011;50: 224–232. doi : 10.1016/j.micpath.2011.01.008
131. Krzysińska S, Frąckowiak H, Kaznowski A. *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex strains induce caspase-dependent and caspase-independent death of human epithelial cells. *Curr Microbiol*. 2012;65: 319–329. doi :10.1007/s00284-012-0159-7
132. Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, *et al*. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell Microbiol*. 2005;7: 1127–1138. doi :10.1111/j.1462-5822.2005. 00538.x
133. Lee JC, Oh JY, Kim KS, Jeong YW, Park JC, Cho JW. Apoptotic cell death induced by *Acinetobacter baumannii* in epithelial cells through caspase-3 activation. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 2001;109: 679–684.
134. Choi CH, Hyun SH, Lee JY, Lee JS, Lee YS, Kim SA, *et al*. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. *Cell Microbiol*. 2008;10: 309–319. doi :10.1111/j.1462-5822.2007. 01041.x
135. Choi CH, Hyun SH, Kim J, Lee YC, Seol SY, Cho DT, *et al*. Nuclear translocation and DNase I-like enzymatic activity of *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A. *FEMS Microbiol Lett*. 2008;288: 62–67. doi :10.1111/j.1574-6968.2008. 01323.x
136. Jin JS, Kwon S-O, Moon DC, Gurung M, Lee JH, Kim SI, *et al*. *Acinetobacter baumannii* Secretes Cytotoxic Outer Membrane Protein A via Outer Membrane Vesicles. *PLoS ONE*. 2011;6. doi : 10.1371/journal.pone.0017027
137. Moon DC, Choi CH, Lee JH, Choi C-W, Kim H-Y, Park JS, *et al*. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A modulates the biogenesis of outer membrane vesicles. *J Microbiol Seoul Korea*. 2012;50: 155–160. doi :10.1007/s12275-012-1589-4
138. Rumbo C, Fernández-Moreira E, Merino M, Poza M, Mendez JA, Soares NC, *et al*. Horizontal Transfer of the OXA-24 Carbapenemase Gene via Outer Membrane Vesicles: a New Mechanism of Dissemination of Carbapenem Resistance Genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55: 3084–3090. doi :10.1128/AAC.00929-10
139. Kwon S-O, Gho YS, Lee JC, Kim SI. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. *FEMS Microbiol Lett*. 2009;297: 150–156. doi :10.1111/j.1574-6968.2009. 01669.x
140. Ellis TN, Kuehn MJ. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 2010;74: 81–94. doi :10.1128/MMBR.00031-09
141. Koning RI, de Breij A, Oostergetel GT, Nibbering PH, Koster AJ, Dijkshoorn L. Cryo-electron tomography analysis of membrane vesicles from *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 T. *Res Microbiol*. 2013;164: 397–405. doi : 10.1016/j.resmic.2013.02.007
142. Li Z-T, Zhang R-L, Bi X-G, Xu L, Fan M, Xie D, *et al*. Outer membrane vesicles isolated from two clinical *Acinetobacter baumannii* strains exhibit different toxicity and proteome characteristics. *Microb Pathog*. 2015;81: 46–52. doi : 10.1016/j.micpath.2015.03.009
143. Liao Y-T, Kuo S-C, Chiang M-H, Lee Y-T, Sung W-C, Chen Y-H, *et al*. *Acinetobacter baumannii* Extracellular OXA-58 Is Primarily and Selectively Released via Outer Membrane Vesicles after Sec-Dependent Periplasmic Translocation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59: 7346–7354. doi :10.1128/AAC.01343-15
144. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*. 2002;298: 1911–1912. doi :10.1126/science.1072682
145. Israël A. The IKK Complex, a Central Regulator of NF-κB Activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2. doi :10.1101/cshperspect. a000158
146. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, *et al*. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999;162: 3749–3752.
147. Knapp S, Wieland CW, Florquin S, Pantophlet R, Dijkshoorn L, Tshimbalanga N, *et al*. Differential Roles of CD14 and Toll-like Receptors 4 and 2 in Murine *Acinetobacter* Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173: 122–129. doi :10.1164/rccm.200505-7300C

148. March C, Regueiro V, Llobet E, Moranta D, Morey P, Garmendia J, *et al.* Dissection of Host Cell Signal Transduction during *Acinetobacter baumannii* – Triggered Inflammatory Response. PLOS ONE. 2010;5: e10033. doi : 10.1371/journal.pone.0010033
149. Kim C-H, Jeong Y-J, Lee J, Jeon S-J, Park S-R, Kang M-J, *et al.* Essential role of toll-like receptor 4 in *Acinetobacter baumannii*-induced immune responses in immune cells. Microb Pathog. 2013;54: 20–25. doi : 10.1016/j.micpath.2012.08.008
150. Qiu H, KuoLee R, Harris G, Van Rooijen N, Patel GB, Chen W. Role of Macrophages in Early Host Resistance to Respiratory *Acinetobacter baumannii* Infection. PLoS ONE. 2012;7. doi : 10.1371/journal.pone.0040019
151. Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. Nat Rev Microbiol. 2017; doi :10.1038/nrmicro.2017.148
152. Kim C-H, Kim D-J, Lee S-J, Jeong Y-J, Kang M-J, Lee J-Y, *et al.* Toll-like receptor 2 promotes bacterial clearance during the initial stage of pulmonary infection with *Acinetobacter baumannii*. Mol Med Rep. 2014;9: 1410–1414. doi :10.3892/mmr.2014.1966
153. Moffatt JH, Harper M, Mansell A, Crane B, Fitzsimons TC, Nation RL, *et al.* Lipopolysaccharide-Deficient *Acinetobacter baumannii* Shows Altered Signaling through Host Toll-Like Receptors and Increased Susceptibility to the Host Antimicrobial Peptide LL-37. Infect Immun. 2013;81: 684–689. doi :10.1128/IAI.01362-12
154. Chaturvedi A, Pierce SK. How location governs Toll like receptor signaling. Traffic Cph Den. 2009;10: 621–628. doi :10.1111/j.1600-0854.2009. 00899.x
155. Noto MJ, Boyd KL, Burns WJ, Varga MG, Peek RM, Skaar EP. Toll-Like Receptor 9 Contributes to Defense against *Acinetobacter baumannii* Infection. Infect Immun. 2015;83: 4134–4141. doi :10.1128/IAI.00410-15
156. Moreira LO, Zamboni DS. NOD1 and NOD2 Signaling in Infection and Inflammation. Front Immunol. 2012;3. doi :10.3389/fimmu.2012.00328
157. Bist P, Dikshit N, Koh TH, Mortellaro A, Tan TT, Sukumaran B. The Nod1, Nod2, and Rip2 axis contributes to host immune defense against intracellular *Acinetobacter baumannii* infection. Infect Immun. 2014;82: 1112–1122. doi :10.1128/IAI.01459-13
158. Kang M-J, Jo S-G, Kim D-J, Park J-H. NLRP3 inflammasome mediates interleukin-1 β production in immune cells in response to *Acinetobacter baumannii* and contributes to pulmonary inflammation in mice. Immunology. 2017;150: 495–505. doi :10.1111/imm.12704
159. Dikshit N, Kale SD, Khameneh HJ, Balamuralidhar V, Tang CY, Kumar P, *et al.* NLRP3 inflammasome pathway has a critical role in the host immunity against clinically relevant *Acinetobacter baumannii* pulmonary infection. Mucosal Immunol. 2017; doi :10.1038/mi.2017.50
160. Kierdorf K, Fritz G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. J Leukoc Biol. 2013;94: 55–68. doi :10.1189/jlb.1012519
161. Bruhn KW, Pantapalangkoor P, Nielsen T, Tan B, Junus J, Hujer KM, *et al.* Host Fate is Rapidly Determined by Innate Effector-Microbial Interactions During *Acinetobacter baumannii* Bacteremia. J Infect Dis. 2015;211: 1296–1305. doi :10.1093/infdis/jiu593
162. Sanchez-Larrayoz AF, Elhosseiny NM, Chevrette MG, Fu Y, Giunta P, Spallanzani RG, *et al.* Complexity of complement resistance factors expressed by *Acinetobacter baumannii* needed for survival in human serum. J Immunol Baltim Md 1950. 2017; doi :10.4049/jimmunol.1700877
163. King LB, Pangburn MK, McDaniel LS. Serine protease PKF of *Acinetobacter baumannii* results in serum resistance and suppression of biofilm formation. J Infect Dis. 2013;207: 1128–1134. doi :10.1093/infdis/jis939
164. Koenigs A, Stahl J, Averhoff B, Göttig S, Wichelhaus TA, Wallich R, *et al.* CipA of *Acinetobacter baumannii* Is a Novel Plasminogen Binding and Complement Inhibitory Protein. J Infect Dis. 2016;213: 1388–1399. doi :10.1093/infdis/jiv601
165. Koenigs A, Zipfel PF, Kraiczy P. Translation Elongation Factor Tuf of *Acinetobacter baumannii* Is a Plasminogen-Binding Protein. PloS One. 2015;10: e0134418. doi : 10.1371/journal.pone.0134418
166. Kim SW, Choi CH, Moon DC, Jin JS, Lee JH, Shin J-H, *et al.* Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. FEMS Microbiol Lett. 2009;301: 224–231. doi :10.1111/j.1574-6968.2009. 01820.x
167. King LB, Swiatlo E, Swiatlo A, McDaniel LS. Serum resistance and biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2009;55: 414–421. doi :10.1111/j.1574-695X.2009. 00538.x
168. Feng Z, Jia X, Adams MD, Ghosh SK, Bonomo RA, Weinberg A. Epithelial innate immune response to *Acinetobacter baumannii* challenge. Infect Immun. 2014;82: 4458–4465. doi :10.1128/IAI.01897-14

169. Lin M-F, Tsai P-W, Chen J-Y, Lin Y-Y, Lan C-Y. OmpA Binding Mediates the Effect of Antimicrobial Peptide LL-37 on *Acinetobacter baumannii*. PLOS ONE. 2015;10: e0141107. doi : 10.1371/journal.pone.0141107
170. van Faassen H, KuoLee R, Harris G, Zhao X, Conlan JW, Chen W. Neutrophils play an important role in host resistance to respiratory infection with *Acinetobacter baumannii* in mice. Infect Immun. 2007;75: 5597–5608. doi :10.1128/IAI.00762-07
171. Tsuchiya T, Nakao N, Yamamoto S, Hirai Y, Miyamoto K, Tsujibo H. NK1.1(+) cells regulate neutrophil migration in mice with *Acinetobacter baumannii* pneumonia. Microbiol Immunol. 2012;56: 107–116. doi :10.1111/j.1348-0421.2011.00402.x
172. Qiu H, KuoLee R, Harris G, Chen W. High susceptibility to respiratory *Acinetobacter baumannii* infection in A/J mice is associated with a delay in early pulmonary recruitment of neutrophils. Microbes Infect. 2009;11: 946–955. doi : 10.1016/j.micinf.2009.06.003
173. Kamoshida G, Kikuchi-Ueda T, Tansho-Nagakawa S, Nakano R, Nakano A, Kikuchi H, *et al.* *Acinetobacter baumannii* escape from neutrophil extracellular traps (NETs). J Infect Chemother. 2015;21: 43–49. doi : 10.1016/j.jiac.2014.08.032
174. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 2004;303: 1532–1535. doi :10.1126/science.1092385
175. Lázaro-Díez M, Chapartegui-González I, Redondo-Salvo S, Leigh C, Merino D, Segundo DS, *et al.* Human neutrophils phagocytose and kill *Acinetobacter baumannii* and *A. pittii*. Sci Rep. 2017;7: 4571. doi :10.1038/s41598-017-04870-8
176. Bhuiyan MS, Ellett F, Murray GL, Kostoulas X, Cerqueira GM, Schulze KE, *et al.* *Acinetobacter baumannii* phenylacetic acid metabolism influences infection outcome through a direct effect on neutrophil chemotaxis. Proc Natl Acad Sci USA. 2016;113: 9599–9604. doi :10.1073/pnas.1523116113
177. Kamoshida G, Tansho-Nagakawa S, Kikuchi-Ueda T, Nakano R, Hikosaka K, Nishida S, *et al.* A novel bacterial transport mechanism of *Acinetobacter baumannii* via activated human neutrophils through interleukin-8. J Leukoc Biol. 2016;100: 1405–1412. doi :10.1189/jlb.4AB0116-023RR
178. García-Patiño MG, García-Contreras R, Licona-Limón P. The Immune Response against *Acinetobacter baumannii*, an Emerging Pathogen in Nosocomial Infections. Front Immunol. 2017;8. doi :10.3389/fimmu.2017.00441
179. Costa TRD, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, Prevost MS, Redzej A, Trokter M, *et al.* Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. Nat Rev Microbiol. 2015;13: 343–359. doi :10.1038/nrmicro3456
180. Harding CM, Kinsella RL, Palmer LD, Skaar EP, Feldman MF. Medically Relevant *Acinetobacter* Species Require a Type II Secretion System and Specific Membrane-Associated Chaperones for the Export of Multiple Substrates and Full Virulence. PLoS Pathog. 2016;12: e1005391. doi : 10.1371/journal.ppat.1005391
181. Harding CM, Pulido MR, Di Venzio G, Kinsella RL, Webb AI, Scott NE, *et al.* Pathogenic *Acinetobacter* species have a functional type I secretion system and contact-dependent inhibition systems. J Biol Chem. 2017;292: 9075–9087. doi :10.1074/jbc.M117.781575
182. Jacobs AC, Sayood K, Olmsted SB, Blanchard CE, Hinrichs S, Russell D, *et al.* Characterization of the *Acinetobacter baumannii* growth phase-dependent and serum responsive transcriptomes. FEMS Immunol Med Microbiol. 2012;64: 403–412. doi :10.1111/j.1574-695X.2011.00926.x
183. Eijkelkamp BA, Stroeher UH, Hassan KA, Paulsen IT, Brown MH. Comparative analysis of surface-exposed virulence factors of *Acinetobacter baumannii*. BMC Genomics. 2014;15: 1020. doi :10.1186/1471-2164-15-1020
184. Johnson TL, Waack U, Smith S, Mobley H, Sandkvist M. *Acinetobacter baumannii* is dependent on the type ii secretion system and its substrate lipa for lipid utilization and *in vivo* fitness. J Bacteriol. 2015;198: 711–719. doi :10.1128/JB.00622-15
185. Weber BS, Kinsella RL, Harding CM, Feldman MF. The Secrets of *Acinetobacter* Secretion. Trends Microbiol. 2017;25: 532–545. doi : 10.1016/j.tim.2017.01.005
186. Neil RB, Apicella MA. Role of HrpA in biofilm formation of *Neisseria meningitidis* and regulation of the hrpBAS transcripts. Infect Immun. 2009;77: 2285–2293. doi :10.1128/IAI.01502-08
187. Pérez A, Merino M, Rumbo-Feal S, Álvarez-Fraga L, Vallejo JA, Beceiro A, *et al.* The FhaB/FhaC two-partner secretion system is involved in adhesion of *Acinetobacter baumannii* AbH120-A2 strain. Virulence. 2016; 1–16. doi :10.1080/21505594.2016.1262313
188. Zoued A, Brunet YR, Durand E, Aschtgen M-S, Logger L, Douzi B, *et al.* Architecture and assembly of the Type VI secretion system. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res. 2014;1843: 1664–1673. doi : 10.1016/j.bbamcr.2014.03.018

189. Ho BT, Dong TG, Mekalanos JJ. A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell Host Microbe*. 2014;15: 9–21. doi : 10.1016/j.chom.2013.11.008
190. Boyer F, Fichant G, Berthod J, Vandenbrouck Y, Attree I. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics*. 2009;10: 104. doi :10.1186/1471-2164-10-104
191. Durand E, Cambillau C, Cascales E, Journet L. VgrG, Tae, Tle, and beyond: the versatile arsenal of Type VI secretion effectors. *Trends Microbiol*. 2014;22: 498–507. doi : 10.1016/j.tim.2014.06.004
192. Russell AB, Peterson SB, Mougous JD. Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12: 137–148. doi :10.1038/nrmicro3185
193. Suarez G, Sierra JC, Erova TE, Sha J, Horneman AJ, Chopra AK. A Type VI Secretion System Effector Protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* That Induces Host Cell Toxicity by ADP Ribosylation of Actin. *J Bacteriol*. 2010;192: 155–168. doi :10.1128/JB.01260-09
194. Jiang F, Waterfield NR, Yang J, Yang G, Jin Q. A *Pseudomonas aeruginosa* Type VI Secretion Phospholipase D Effector Targets Both Prokaryotic and Eukaryotic Cells. *Cell Host Microbe*. 2014;15: 600–610. doi : 10.1016/j.chom.2014.04.010
195. Weber BS, Miyata ST, Iwashkiw JA, Mortensen BL, Skaar EP, Pukatzki S, *et al*. Genomic and functional analysis of the type VI secretion system in *Acinetobacter*. *PloS One*. 2013;8: e55142. doi : 10.1371/journal.pone.0055142
196. Carruthers MD, Nicholson PA, Tracy EN, Munson RS. *Acinetobacter baumannii* utilizes a type VI secretion system for bacterial competition. *PloS One*. 2013;8: e59388. doi : 10.1371/journal.pone.0059388
197. Jacobs AC, Thompson MG, Black CC, Kessler JL, Clark LP, McQueary CN, *et al*. AB5075, a Highly Virulent Isolate of *Acinetobacter baumannii*, as a Model Strain for the Evaluation of Pathogenesis and Antimicrobial Treatments. *mBio*. 2014;5: e01076-01014. doi :10.1128/mBio.01076-14
198. Repizo GD, Gagné S, Foucault-Grunenwald M-L, Borges V, Charpentier X, Limansky AS, *et al*. Differential Role of the T6SS in *Acinetobacter baumannii* Virulence. *PloS One*. 2015;10: e0138265. doi : 10.1371/journal.pone.0138265
199. Wilharm G, Skiebe E, Higgins PG, Poppel MT, Blaschke U, Leser S, *et al*. Relatedness of wildlife and livestock avian isolates of the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* to lineages spread in hospitals worldwide. *Environ Microbiol*. 2017; n/a-n/a. doi :10.1111/1462-2920.13931
200. Imbert PR, Louche A, Luizet J-B, Grandjean T, Bigot S, Wood TE, *et al*. A *Pseudomonas aeruginosa* TIR effector mediates immune evasion by targeting UBAP1 and TLR adaptors. *EMBO J*. 2017; e201695343. doi :10.15252/embj.201695343
201. Piechaud M, Second L. [Studies of 26 strains of *Moraxella Iwoffii*]. *Ann Inst Pasteur*. 1951;80: 97–99.
202. Repizo GD, Viale AM, Borges V, Cameranesi MM, Taib N, Espariz M, *et al*. The Environmental *Acinetobacter baumannii* Isolate DSM30011 Reveals Clues into the Preantibiotic Era Genome Diversity, Virulence Potential, and Niche Range of a Predominant Nosocomial Pathogen. *Genome Biol Evol*. 2017;9: 2292–2307. doi :10.1093/gbe/evx162
203. Mussi MA, Limansky AS, Viale AM. Acquisition of Resistance to Carbapenems in Multidrug-Resistant Clinical Strains of *Acinetobacter baumannii*: Natural Insertional Inactivation of a Gene Encoding a Member of a Novel Family of β -Barrel Outer Membrane Proteins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49: 1432–1440. doi :10.1128/AAC.49.4.1432-1440.2005
204. Limansky AS, Mussi MA, Viale AM. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *J Clin Microbiol*. 2002;40: 4776–4778.
205. Mussi MA, Limansky AS, Relling V, Ravasi P, Arakaki A, Actis LA, *et al*. Horizontal gene transfer and assortative recombination within the *Acinetobacter baumannii* clinical population provide genetic diversity at the single *carO* gene, encoding a major outer membrane protein channel. *J Bacteriol*. 2011;193: 4736–4748. doi :10.1128/JB.01533-10
206. Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, Krastins B, Sarracino D, Nelson WC, *et al*. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103: 1528–1533. doi :10.1073/pnas.0510322103
207. Mougous JD, Cuff ME, Raunser S, Shen A, Zhou M, Gifford CA, *et al*. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*. 2006;312: 1526–1530. doi :10.1126/science.1128393
208. Hood RD, Singh P, Hsu F, Güvener T, Carl MA, Trinidad RRS, *et al*. A Type VI Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Targets a Toxin to Bacteria. *Cell Host Microbe*. 2010;7: 25–37. doi : 10.1016/j.chom.2009.12.007
209. Salomon D, Kinch LN, Trudgian DC, Guo X, Klimko JA, Grishin NV, *et al*. Marker for type VI secretion system effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111: 9271–9276. doi :10.1073/pnas.1406110111

210. Richards AM, Abu Kwaik Y, Lamont RJ. Code blue: *Acinetobacter baumannii*, a nosocomial pathogen with a role in the oral cavity. *Mol Oral Microbiol.* 2015;30: 2–15. doi :10.1111/omi.12072
211. Mammina C, Bonura C, Vivoli AR, Di Bernardo F, Sodano C, Saporito MA, *et al.* Co-colonization with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit patients. *Scand J Infect Dis.* 2013;45: 629–634. doi :10.3109/00365548.2013.782614
212. L Enos-Berlage J, Guvener ZT, E Keenan C, Mccarter L. Genetic determinants of biofilm development of opaque and translucent *Vibrio parahaemolyticus*. *Mol Microbiol.* 2005;55: 1160–82. doi :10.1111/j.1365-2958.2004. 04453.x
213. Aschtgen M-S, Bernard CS, Bentzmann SD, Llobès R, Cascales E. SciN Is an Outer Membrane Lipoprotein Required for Type VI Secretion in Enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2008;190: 7523–7531. doi :10.1128/JB.00945-08
214. Zhang L, Xu J, Xu J, Zhang H, He L, Feng J. TssB is essential for virulence and required for type VI secretion system in *Ralstonia solanacearum*. *Microb Pathog.* 2014;74: 1–7. doi : 10.1016/j.micpath.2014.06.006
215. Jander G, Rahme LG, Ausubel FM. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol.* 2000;182: 3843–3845.
216. Peleg AY, Jara S, Monga D, Eliopoulos GM, Moellering RC, Mylonakis E. *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53: 2605–2609. doi :10.1128/AAC.01533-08
217. Weber BS, Ly PM, Irwin JN, Pukatzki S, Feldman MF. A multidrug resistance plasmid contains the molecular switch for type VI secretion in *Acinetobacter baumannii*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112: 9442–9447. doi :10.1073/pnas.1502966112
218. Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL. Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism. *Exp Cell Res.* 1998;243: 359–366. doi :10.1006/excr.1998.4172
219. Tipton KA, Farokhyfar M, Rather PN. Multiple roles for a novel RND-type efflux system in *Acinetobacter baumannii* AB5075. *MicrobiologyOpen.* 2017;6. doi :10.1002/mbo3.418
220. Tipton KA, Rather PN. An ompR/envZ Two-Component System Ortholog Regulates Phase Variation, Osmotic Tolerance, Motility, and Virulence in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075. *J Bacteriol.* 2016; doi :10.1128/JB.00705-16
221. Fiorentino M, Ding H, Blanchard TG, Czinn SJ, Szein MB, Fasano A. *Helicobacter pylori*-induced disruption of monolayer permeability and proinflammatory cytokine secretion in polarized human gastric epithelial cells. *Infect Immun.* 2013;81: 876–883. doi :10.1128/IAI.01406-12
222. Caron TJ, Scott KE, Fox JG, Hagen SJ. Tight junction disruption: *Helicobacter pylori* and dysregulation of the gastric mucosal barrier. *World J Gastroenterol WJG.* 2015;21: 11411–11427. doi :10.3748/wjg.v21.i40.11411
223. Golovkine G, Faudry E, Bouillot S, Voulhoux R, Attrée I, Huber P. VE-cadherin cleavage by LasB protease from *Pseudomonas aeruginosa* facilitates type III secretion system toxicity in endothelial cells. *PLoS Pathog.* 2014;10: e1003939. doi : 10.1371/journal.ppat.1003939
224. Törmäkangas L, Markkula E, Lounatmaa K, Puolakkainen M. *Chlamydia pneumoniae* infection in polarized epithelial cell lines. *Infect Immun.* 2010;78: 2714–2722. doi :10.1128/IAI.01456-09
225. Ren H, Birch NP, Suresh V. An Optimised Human Cell Culture Model for Alveolar Epithelial Transport. *PLOS ONE.* 2016;11: e0165225. doi : 10.1371/journal.pone.0165225
226. Pena J, Fu Z, Schwarzer C, Machen TE. *Pseudomonas aeruginosa* Inhibition of Flagellin-Activated NF-κB and Interleukin-8 by Human Airway Epithelial Cells. *Infect Immun.* 2009;77: 2857–2865. doi :10.1128/IAI.01355-08
227. Duff C, Murphy PG, Callaghan M, McClean S. Differences in invasion and translocation of *Burkholderia cepacia* complex species in polarised lung epithelial cells *in vitro*. *Microb Pathog.* 2006;41: 183–192. doi : 10.1016/j.micpath.2006.07.005
228. Grainger CI, Greenwell LL, Lockley DJ, Martin GP, Forbes B. Culture of Calu-3 cells at the air interface provides a representative model of the airway epithelial barrier. *Pharm Res.* 2006;23: 1482–1490. doi :10.1007/s11095-006-0255-0
229. Zhu Y, Chidekel A, Shaffer TH. Cultured Human Airway Epithelial Cells (Calu-3): A Model of Human Respiratory Function, Structure, and Inflammatory Responses. *Crit Care Res Pract.* 2010;2010. doi :10.1155/2010/394578
230. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012;19: 107–120. doi :10.1038/cdd.2011.96

231. O'Grady EP, Mulcahy H, O'Callaghan J, Adams C, O'Gara F. *Pseudomonas aeruginosa* Infection of Airway Epithelial Cells Modulates Expression of Kruppel-Like Factors 2 and 6 via RsmA-Mediated Regulation of Type III Exoenzymes S and Y. *Infect Immun*. 2006;74: 5893–5902. doi :10.1128/IAI.00489-06
232. Harrison EM, Carter MEK, Luck S, Ou H-Y, He X, Deng Z, *et al*. Pathogenicity Islands PAPI-1 and PAPI-2 Contribute Individually and Synergistically to the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PA14. *Infect Immun*. 2010;78: 1437–1446. doi :10.1128/IAI.00621-09
233. Erridge C, Moncayo-Nieto OL, Morgan R, Young M, Poxton IR. *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharides are potent stimulators of human monocyte activation via Toll-like receptor 4 signalling. *J Med Microbiol*. 2007;56: 165–171. doi :10.1099/jmm.0.46823-0
234. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2011;1813: 878–888. doi : 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034
235. Wolf J, Rose-John S, Garbers C. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine*. 2014;70: 11–20. doi : 10.1016/j.cyto.2014.05.024
236. Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. *EMBO J*. 2011;30: 3481–3500. doi :10.1038/emboj.2011.286
237. Jeong J-Y, Yim H-S, Ryu J-Y, Lee HS, Lee J-H, Seen D-S, *et al*. One-step sequence- and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78: 5440–5443. doi :10.1128/AEM.00844-12
238. Morey P, Cano V, Martí-Llitas P, López-Gómez A, Regueiro V, Saus C, *et al*. Evidence for a non-replicative intracellular stage of nontypable *Haemophilus influenzae* in epithelial cells. *Microbiol Read Engl*. 2011;157: 234–250. doi :10.1099/mic.0.040451-0
239. Harcourt JL, Haynes LM. Establishing a liquid-covered culture of polarized human airway epithelial Calu-3 cells to study host cell response to respiratory pathogens *in vitro*. *J Vis Exp JoVE*. 2013; doi :10.3791/50157
240. Wright MS, Haft DH, Harkins DM, Perez F, Hujer KM, Bajaksouzian S, *et al*. New insights into dissemination and variation of the health care-associated pathogen *Acinetobacter baumannii* from genomic analysis. *mBio*. 2014;5: e00963-00913. doi :10.1128/mBio.00963-13
241. Li H, Liu F, Zhang Y, Wang X, Zhao C, Chen H, *et al*. Evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* revealed through whole-genome sequencing and comparative genomic analysis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59: 1168–1176. doi :10.1128/AAC.04609-14
242. Hornsey M, Loman N, Wareham DW, Ellington MJ, Pallen MJ, Turton JF, *et al*. Whole-genome comparison of two *Acinetobacter baumannii* isolates from a single patient, where resistance developed during tigecycline therapy. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66: 1499–1503. doi :10.1093/jac/dkr168
243. Ramos JL, Martínez-Bueno M, Molina-Henares AJ, Terán W, Watanabe K, Zhang X, *et al*. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 2005;69: 326–356. doi :10.1128/MMBR.69.2.326-356.2005
244. Cuthbertson L, Nodwell JR. The TetR family of regulators. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 2013;77: 440–475. doi :10.1128/MMBR.00018-13
245. Gebhardt MJ, Gallagher LA, Jacobson RK, Usacheva EA, Peterson LR, Zurawski DV, *et al*. Joint Transcriptional Control of Virulence and Resistance to Antibiotic and Environmental Stress in *Acinetobacter baumannii*. *mBio*. 2015;6: e01660-01615. doi :10.1128/mBio.01660-15
246. Borgeaud S, Metzger LC, Scignari T, Blokesch M. The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer. *Science*. 2015;347: 63–67. doi :10.1126/science.1260064
247. Cooper RM, Tsimring L, Hasty J. Inter-species population dynamics enhance microbial horizontal gene transfer and spread of antibiotic resistance. *eLife*. 2017;6. doi :10.7554/eLife.25950
248. Ringel PD, Hu D, Basler M. The Role of Type VI Secretion System Effectors in Target Cell Lysis and Subsequent Horizontal Gene Transfer. *Cell Rep*. 2017;21: 3927–3940. doi : 10.1016/j.celrep.2017.12.020
249. de Breij A, Gaddy J, van der Meer J, Koning R, Koster A, van den Broek P, *et al*. CsuA/BABCDE-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 to human airway epithelial cells and their inflammatory response. *Res Microbiol*. 2009;160: 213–218. doi : 10.1016/j.resmic.2009.01.002
250. Tipton KA, Dimitrova D, Rather PN. Phase-Variable Control of Multiple Phenotypes in *Acinetobacter baumannii* Strain AB5075. *J Bacteriol*. 2015;197: 2593–2599. doi :10.1128/JB.00188-15
251. Miaczynska M, Stenmark H. Mechanisms and functions of endocytosis. *J Cell Biol*. 2008;180: 7–11. doi :10.1083/jcb.200711073

252. Asrat S, de Jesús DA, Hempstead AD, Ramabhadran V, Isberg RR. Bacterial pathogen manipulation of host membrane trafficking. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30: 79–109. doi :10.1146/annurev-cellbio-100913-013439
253. Clementi CF, Håkansson AP, Murphy TF. Internalization and trafficking of nontypeable *Haemophilus influenzae* in human respiratory epithelial cells and roles of IgA1 proteases for optimal invasion and persistence. *Infect Immun.* 2014;82: 433–444. doi :10.1128/IAI.00864-13
254. Clementi C, Murphy T. Non-Typeable *Haemophilus influenzae* Invasion and Persistence in the Human Respiratory Tract. *Front Cell Infect Microbiol.* 2011;1. doi :10.3389/fcimb.2011.00001
255. Helaine S, Thompson JA, Watson KG, Liu M, Boyle C, Holden DW. Dynamics of intracellular bacterial replication at the single cell level. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107: 3746–3751. doi :10.1073/pnas.1000041107
256. Helaine S, Kugelberg E. Bacterial persisters: formation, eradication, and experimental systems. *Trends Microbiol.* 2014;22: 417–424. doi : 10.1016/j.tim.2014.03.008
257. Michiels JE, Van den Bergh B, Verstraeten N, Michiels J. Molecular mechanisms and clinical implications of bacterial persistence. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother.* 2016;29: 76–89. doi : 10.1016/j.drug.2016.10.002
258. Fisher RA, Gollan B, Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15: 453–464. doi :10.1038/nrmicro.2017.42
259. Lai C-C, Hsu H-L, Tan C-K, Tsai H-Y, Cheng A, Liu C-Y, *et al.* Recurrent bacteremia caused by the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Clin Microbiol.* 2012;50: 2982–2986. doi :10.1128/JCM.01194-12
260. Chung ES, Wi YM, Ko KS. Variation in formation of persister cells against colistin in *Acinetobacter baumannii* isolates and its relationship with treatment failure. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72: 2133–2135. doi :10.1093/jac/dkx102
261. Bhargava N, Sharma P, Capalash N. Pyocyanin Stimulates Quorum Sensing-Mediated Tolerance to Oxidative Stress and Increases Persister Cell Populations in *Acinetobacter baumannii*. *Infect Immun.* 2014;82: 3417–3425. doi :10.1128/IAI.01600-14
262. Marchaim D, Perez F, Lee J, Bheemreddy S, Hujer AM, Rudin S, *et al.* “Swimming in resistance”: Co-colonization with carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* or *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Infect Control.* 2012;40: 830–835. doi : 10.1016/j.ajic.2011.10.013
263. Wright MS, Jacobs MR, Bonomo RA, Adams MD. Transcriptome Remodeling of *Acinetobacter baumannii* during Infection and Treatment. *mBio.* 2017;8: e02193-16. doi :10.1128/mBio.02193-16
264. Wang-Lin SX, Olson R, Beanan JM, MacDonald U, Balthasar JP, Russo TA. The Capsular Polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* Is an Obstacle for Therapeutic Passive Immunization Strategies. *Infect Immun.* 2017;85. doi :10.1128/IAI.00591-17
265. Wang JA, Meyer TF, Rudel T. Cytoskeleton and motor proteins are required for the transcytosis of *Neisseria gonorrhoeae* through polarized epithelial cells. *Int J Med Microbiol IJMM.* 2008;298: 209–221. doi : 10.1016/j.ijmm.2007.05.004
266. Wang J, Gray-Owen S, Knorre A, F. Meyer T, Dehio C. Opa binding to cellular CD66 receptors mediates the transcellular traversal of *Neisseria gonorrhoeae* across polarized T84 epithelial cell monolayers. 1998. doi :10.1046/j.1365-2958.1998. 01102.x
267. Golovkine G, Faudry E, Bouillot S, Elsen S, Attrée I, Huber P. *Pseudomonas aeruginosa* Transmigrates at Epithelial Cell-Cell Junctions, Exploiting Sites of Cell Division and Senescent Cell Extrusion. *PLoS Pathog.* 2016;12: e1005377. doi : 10.1371/journal.ppat.1005377
268. Choi K-H, DeShazer D, Schweizer HP. mini-Tn7 insertion in bacteria with multiple glmS-linked attTn7 sites: example *Burkholderia mallei* ATCC 23344. *Nat Protoc.* 2006;1: 162–169. doi :10.1038/nprot.2006.25
269. Paget MS. Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. *Biomolecules.* 2015;5: 1245–1265. doi :10.3390/biom5031245
270. Paget MSB, Helmann JD. The sigma70 family of sigma factors. *Genome Biol.* 2003;4: 203.
271. Fujita M, Tanaka K, Takahashi H, Amemural A. Transcription of the principal sigma-factor genes, *rpoD* and *rpoS*, in *Pseudomonas aeruginosa* is controlled according to the growth phase. *Mol Microbiol.* 1994;13: 1071–1077. doi :10.1111/j.1365-2958. 1994.tb00498.x

ANNEXES

Annexe 1. A *Pseudomonas aeruginosa* TIR effector mediates immune evasion by targeting UBAP1 and TLR adaptors

Imbert PRC, Louche A, Luizet JB, Grandjean T, Bigot S, Wood TE, **Gagné S**, Blanco A, Wunderley L, Terradot L, Woodman P, Garvis S, Filloux A, Guery A & Salcedo SP
EMBO J. 2017 ; 36(13) :1869-1887.

Imbert *et al.* ont identifié une protéine PumA (*Pseudomonas* UBAP1 modulator) modulant la voie de signalisation de NF- κ B chez les cellules eucaryotes infectées par la souche PA7 de *P. aeruginosa*. PumA est capable *via* son domaine TIR (Toll/Interleukin 1 Receptor) d'interagir avec les protéines TIRAP (TIR-containing Adaptor Protein) et Myd88 (Myeloid Differentiation primary response 88) impliquées dans les voies de signalisation des TLR menant à l'activation de NF- κ B. Leur interaction inhibe l'activation de NF- κ B et cette propriété est transférable à la souche PA14 de *P. aeruginosa* indiquant que PumA seul suffit à l'inhibition de la voie. L'importance de PumA a été montrée *in vivo* : son mutant a une virulence atténuée lors de l'infection de *C. elegans* et de souris. PumA interagit également avec UBAP1 (UBiquitin-Associated Protein 1) un composant essentiel du complexe ESCRT-I (Endosomal-Sorting Complex Required For Transport) impliqué dans la sortie des composants ubiquitinés des corps à vésicule multiple. UBAP1 a été récemment impliquée dans la régulation de NF- κ B. Elle permet la dégradation des récepteurs à cytokines en évitant leur accumulation au niveau intracellulaire. PumA bloque la signalisation par le TNFR *via* UBAP1. Il est supposé que par son interaction avec UBAP1, PumA augmente son activité et permette la dégradation de composants de la voie de signalisation inhibant la réponse *via* le TNFR.

Pour conclure cette étude a permis de mettre en évidence la fonction et le rôle d'une nouvelle protéine bactérienne avec un domaine TIR, PumA, dans la virulence de PA7. J'ai contribué à cette étude en réalisant des tests de cytotoxicité.

A *Pseudomonas aeruginosa* TIR effector mediates immune evasion by targeting UBAP1 and TLR adaptors

Paul RC Imbert¹, Arthur Louche¹, Jean-Baptiste Luizet¹, Teddy Grandjean², Sarah Bigot¹, Thomas E Wood³, Stéphanie Gagné¹, Amandine Blanco¹, Lydia Wunderley⁴, Laurent Terradot¹, Philip Woodman⁴, Steve Garvis⁵, Alain Filloux³ , Benoit Guery² & Suzana P Salcedo^{1,*} 

Abstract

Bacterial pathogens often subvert the innate immune system to establish a successful infection. The direct inhibition of downstream components of innate immune pathways is particularly well documented but how bacteria interfere with receptor proximal events is far less well understood. Here, we describe a Toll/interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing protein (PumA) of the multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* PA7 strain. We found that PumA is essential for virulence and inhibits NF- κ B, a property transferable to non-PumA strain PA14, suggesting no additional factors are needed for PumA function. The TIR domain is able to interact with the Toll-like receptor (TLR) adaptors TIRAP and MyD88, as well as the ubiquitin-associated protein 1 (UBAP1), a component of the endosomal-sorting complex required for transport I (ESCRT-I). These interactions are not spatially exclusive as we show UBAP1 can associate with MyD88, enhancing its plasma membrane localization. Combined targeting of UBAP1 and TLR adaptors by PumA impedes both cytokine and TLR receptor signalling, highlighting a novel strategy for innate immune evasion.

Keywords *Pseudomonas*; TIR domain; TLR adaptors; UBAP1; virulence

Subject Categories Microbiology, Virology & Host Pathogen Interaction

DOI 10.15252/embj.201695343 | Received 27 July 2016 | Revised 29 March 2017 | Accepted 5 April 2017 | Published online 8 May 2017

The EMBO Journal (2017) 36: 1869–1887

Introduction

Microbial pathogen recognition by innate immune receptors initiates a progression of molecular interactions and signalling events assuring host defence. In bacterial infections, detection of surface

components, such as peptidoglycan, lipopolysaccharides and flagellin by Toll-like receptors (TLR) 2, 4 and 5, respectively, is essential for induction of pro-inflammatory cytokines and type I interferon (IFN) responses. Specific sorting and signalling adaptor proteins bridge activated receptors with downstream kinases to initiate signalling cascades via Toll/interleukin 1 receptor (TIR) domains present on both the adaptors and the cytosolic face of TLRs (Brubaker *et al*, 2015). Upon TLR2 or TLR4 activation, the TIR-containing adaptor protein (TIRAP) recruits myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) that interacts with the TLR via its TIR domain (Fitzgerald *et al*, 2001; Horng *et al*, 2001; Kagan & Medzhitov, 2006). MyD88 oligomerization and recruitment of specific kinases leads to the formation of myddosomes, signalling platforms that induce NF- κ B translocation into the nucleus and subsequent transcription of pro-inflammatory associated genes (Nagpal *et al*, 2011; Bonham *et al*, 2014). TLR4 activation also results in induction of a type I IFN via another set of adaptors, TRAM and TRIF (Fitzgerald *et al*, 2001; Yamamoto *et al*, 2002; Kagan *et al*, 2008). In the case of the MyD88-dependent TLR5, the identity of a sorting adaptor remains undefined and the role of TIRAP unclear although it has been implicated in proper TLR5 signalling in epithelial cells (Choi *et al*, 2013).

Microbial pathogens have been shown to counter these host defence pathways. Most bacterial immune-modulatory proteins described to date rely on inhibition of downstream signalling components, such as MAP kinases and transcription factors (reviewed in Rosadini & Kagan, 2015). In contrast, few examples of direct blocking at the level of initial receptor–adaptor complexes are known. Some bacterial pathogens rely on TIR domain-containing proteins to perturb TIR-dependent interactions (Newman *et al*, 2006; Cirl *et al*, 2008; Salcedo *et al*, 2008, 2013), essential in innate immune signalling. The growing number of bacterial TIR proteins recently identified in both Gram-negative and Gram-positive human

¹ Laboratory of Molecular Microbiology and Structural Biochemistry, Centre National de la Recherche Scientifique, University of Lyon, Lyon, France

² EA 7366 Recherche Translationnelle Relations Hôte-Pathogènes, Faculté de Médecine Pôle Recherche, Université Lille 2, Lille, France

³ MRC Centre for Molecular Bacteriology and Infection, Imperial College London, London, UK

⁴ School of Biological Sciences, Faculty of Biology Medicine and Health, University of Manchester, Manchester Academic Health Science Centre, Manchester, UK[†]

⁵ Laboratoire de Biologie et Modélisation, Ecole Normale Supérieure, UMR5239, Lyon, France

*Corresponding author. Tel: +33 437652915; E-mail: suzana.salcedo@ibcp.fr

[†]Correction added on 3 July 2017, after first online publication: affiliation 4 has been corrected

pathogens (Spear *et al*, 2012; Askarian *et al*, 2014; Zou *et al*, 2014) highlights the importance of this immune evasion strategy in disease. However, the molecular mechanisms underlying most TIR-dependent virulence strategies remain to be defined.

We focused on a previously uncharacterized TIR domain-containing protein of the multi-drug resistant pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PA7, that we called PumA. *P. aeruginosa* PA7 lacks genes encoding the type III secretion system (T3SS) and its cognate effector proteins that are normally associated with strong induction of cell death, a hallmark of acute *P. aeruginosa* infections (reviewed by Filloux, 2011). In addition, PA7 does not show high lytic capacity towards epithelial cells due to exolysin A (ExlA) as described for the haemorrhagic pneumonia-causing strain of the same family (Elsen *et al*, 2014; Reboud *et al*, 2016). We thus took advantage of the absence of traditional virulence factors in this *P. aeruginosa* strain to study the molecular interactions involved in TIR-mediated bacterial targeting of events proximal to receptor–adaptor signalling complexes and to dissect PumA function. We found that the PumA *Pseudomonas* TIR domain-containing protein is essential for PA7 virulence conferring a previously unrecognized ability to *Pseudomonas* to down-modulate innate immune responses during infection. We show that PumA directly interacts with both TIRAP and MyD88 to control TLR signalling. Uniquely, it also targets the ubiquitin-associated protein 1 (UBAP1), a recently discovered component of the endosomal-sorting complex required for transport I (ESCRT-I; Stefani *et al*, 2011). UBAP1 is known to play a key role in selective sorting of ubiquitinated endosomal cargo on multi-vesicular bodies (MVB), via its interaction with VPS37A and other components of ESCRT-I namely TSG101 (Wunderley *et al*, 2014), as well as with the ESCRT regulator, His domain protein tyrosine phosphatase (HDPTP; Stefani *et al*, 2011). UBAP1 has been shown to control endosomal sorting of ubiquitinated EGFR (Stefani *et al*, 2011) as well as ubiquitin-dependent degradation of antiviral surface proteins (Agromayor *et al*, 2012) and integrins (Kharitidi *et al*, 2015). More recently, UBAP1 was shown to modulate steady-state trafficking of cytokine receptors in non-stimulated cells (Mamińska *et al*, 2016). UBAP1 is expressed in a wide range of tissues, but when deleted in mice, it is lethal for embryos (Agromayor *et al*, 2012).

We propose that this novel *Pseudomonas* effector modulates UBAP1 function, hence the name PumA (for *Pseudomonas* UBAP1 modulator A), which confers to this TIR domain-containing protein the distinctive ability to also interfere with cytokine receptor signalling. Targeting of both TLR adaptors and UBAP1 by PumA is not spatially restricted as we found UBAP1 can associate with MyD88 in host cells. Our results thus highlight a novel role of bacterial TIR domains and place UBAP1 sorting in the context of TLR signalling.

Results

PumA is required for *Pseudomonas aeruginosa* PA7 virulence *in vivo*

In *Pseudomonas*, TIR domain-containing proteins were first identified in an *in silico* study in *P. aeruginosa* and the plant pathogen *P. syringae* (Zhang *et al*, 2011). Analysis of currently available genomes shows that several plant strains encode such proteins as

well as additional human pathogenic strains of *P. stutzeri* and *P. aeruginosa*. The closest orthologue is found in the plant pathogen *P. viridiflava*. The TIR domain of PumA spans the first 136 amino acids of PumA (Appendix Fig S1A and B), with no significant sequence/structure homologies detected for the C-terminal domain (amino acid 137–303) and no signal peptide. Analysis of the PA7 genome shows *pumA* (PSPA7_2375) is within the genomic island RGP56, which displays a G+C content of 58.5% in contrast to the average 66.5% in the remaining genome. Interestingly, using Geneious (Kearse *et al*, 2012), we found the *pumA* gene itself has an even larger reduction in G+C content (46.6%) (Appendix Fig S1C), suggesting that it is not a conserved gene within its immediate genetic context.

We assessed the potential role of PumA in virulence by infecting the nematode *Caenorhabditis elegans*, a well-established model for *P. aeruginosa* allowing for rapid assessment of virulence (Garvis *et al*, 2009). Infection with the highly virulent strain *P. aeruginosa* PA14 which contains virulence factors such as the T3SS but no TIR protein resulted in 50% lethality at day 5. The PA7 wild-type strain caused 50% lethality 7 days after inoculation. In contrast, we found that the PA7 $\Delta pumA$ mutant showed a slight but significant attenuation in virulence in *C. elegans* (Fig 1A). These differences were not due to an *in vitro* growth defect of the mutant (Appendix Fig S2A) nor to a problem in expression of PumA in the wild-type *P. aeruginosa* PA7 strain (Appendix Fig S2B).

We then used an acute *in vivo* infection model to evaluate the involvement of *pumA* in *P. aeruginosa* induced lung injury. Mice infected with $\Delta pumA$ showed a clear increased survival compared to wild-type strain (Fig 1B). A dose of 4.10^7 CFU of PA7 induced 100% lethality after 52 h against 62.5% survival after 96 h for the $\Delta pumA$ mutant. Bacterial clearance and cellular recruitment were then analysed with a lower inoculum of 3.10^7 CFU. PA7 $\Delta pumA$ infected mice showed decreased cell recruitment (Fig 1C) and an enhanced lung bacterial clearance in bronchoalveolar lavages (BAL) compared to the wild-type strain (Fig 1D). The bacterial dissemination measured with the spleen bacterial load was equivalent between the two groups (Fig 1E). Together these results show that PumA is required for *P. aeruginosa* PA7 infection.

PumA inhibits NF- κ B translocation into the nucleus during infection *in vitro*

As bacterial TIR proteins down-modulate NF- κ B activation (Newman *et al*, 2006; Cirl *et al*, 2008; Salcedo *et al*, 2008, 2013; Spear *et al*, 2012; Askarian *et al*, 2014; Zou *et al*, 2014), we infected the lung carcinoma epithelial cell line A549, a well-established cellular model for *Pseudomonas* infection and analysed NF- κ B translocation into the nucleus after one hour of infection by confocal microscopy. We developed an automated analysis of p65/RelA fluorescence in relation to DAPI labelling using a specific ImageJ plugin from images obtained by confocal microscopy (Fig EV1A) which allowed us to clearly differentiate between TNF α -treated and mock-infected cells (Figs 2A and EV1B). Infection with the three heat-killed *P. aeruginosa* strains, wild-type PA7, isogenic mutant $\Delta pumA$ or wild-type PA14 resulted in significant induction of NF- κ B translocation into the nucleus, although to a lower level than TNF α -treated cells (Fig 2A). When cells were infected with PA7, there was no significant induction of

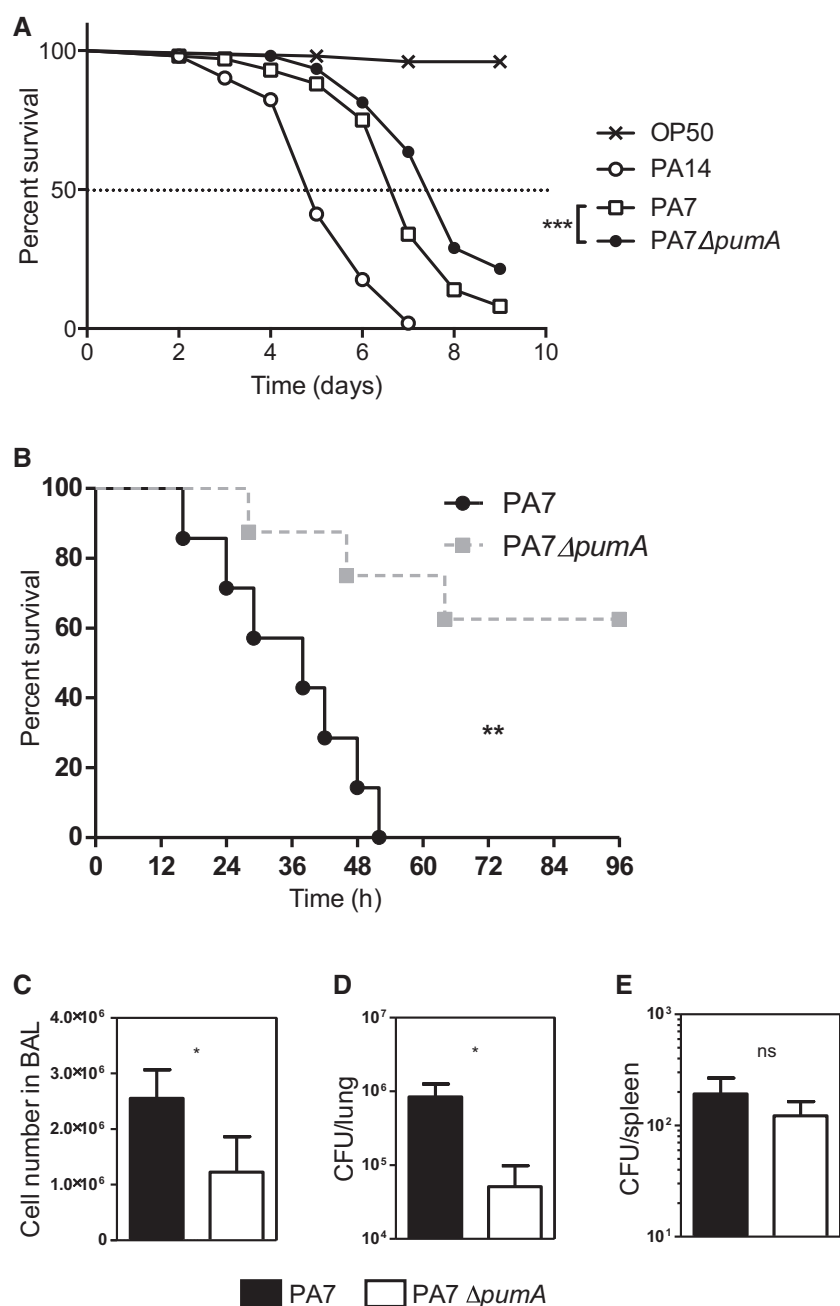


Figure 1. PumA is required for *Pseudomonas aeruginosa* PA7 virulence *in vivo*.

A *Caenorhabditis elegans* survival curve. Fifty *C. elegans* were infected with *E. coli* OP50 and with highly virulent strain *P. aeruginosa* PA14. One hundred *C. elegans* were infected with *P. aeruginosa* PA7 and PA7 $\Delta pumA$. Test of Mantel–Cox was used with *** $P = 0.0002$.

B To establish an *in vivo* model of acute infection, mice were intranasally infected with 4×10^7 CFU *P. aeruginosa* PA7 or PA7 $\Delta pumA$ strains ($n = 7$ /group). Lethality was monitored for 96 h, and a test of Mantel–Cox was used, with ** $P = 0.0035$.

C–E Mice were intranasally infected with 3×10^7 CFU *P. aeruginosa* PA7 or PA7 $\Delta pumA$ strains ($n = 7$ /group). Cells from bronchoalveolar lavage (BAL) were counted (C). Bacterial load in the lungs (D) and dissemination (E) were assessed through cultured lung or spleen homogenate. Non-parametric two-tailed Mann–Whitney test was carried out with (C) * $P = 0.0173$, (D) * $P = 0.0364$ and (E) $P = 0.3629$. All data correspond to mean $\pm$ standard error.

NF- κ B when compared with the mock-infected negative control (Fig 2B), suggesting PA7 blocks NF- κ B translocation into the nucleus. In contrast, $\Delta pumA$ infection promoted NF- κ B nuclear translocation, attaining activation levels similar to those observed with heat-killed bacteria. The inability of *pumA* mutants to block

NF- κ B nuclear transport was complemented by chromosomal expression of this gene under an arabinose-inducible promoter (Fig 2C). Importantly, when *pumA* expression was repressed with glucose, no complementation of NF- κ B inhibition was observed (Fig 2B). Addition of arabinose had no effect on NF- κ B

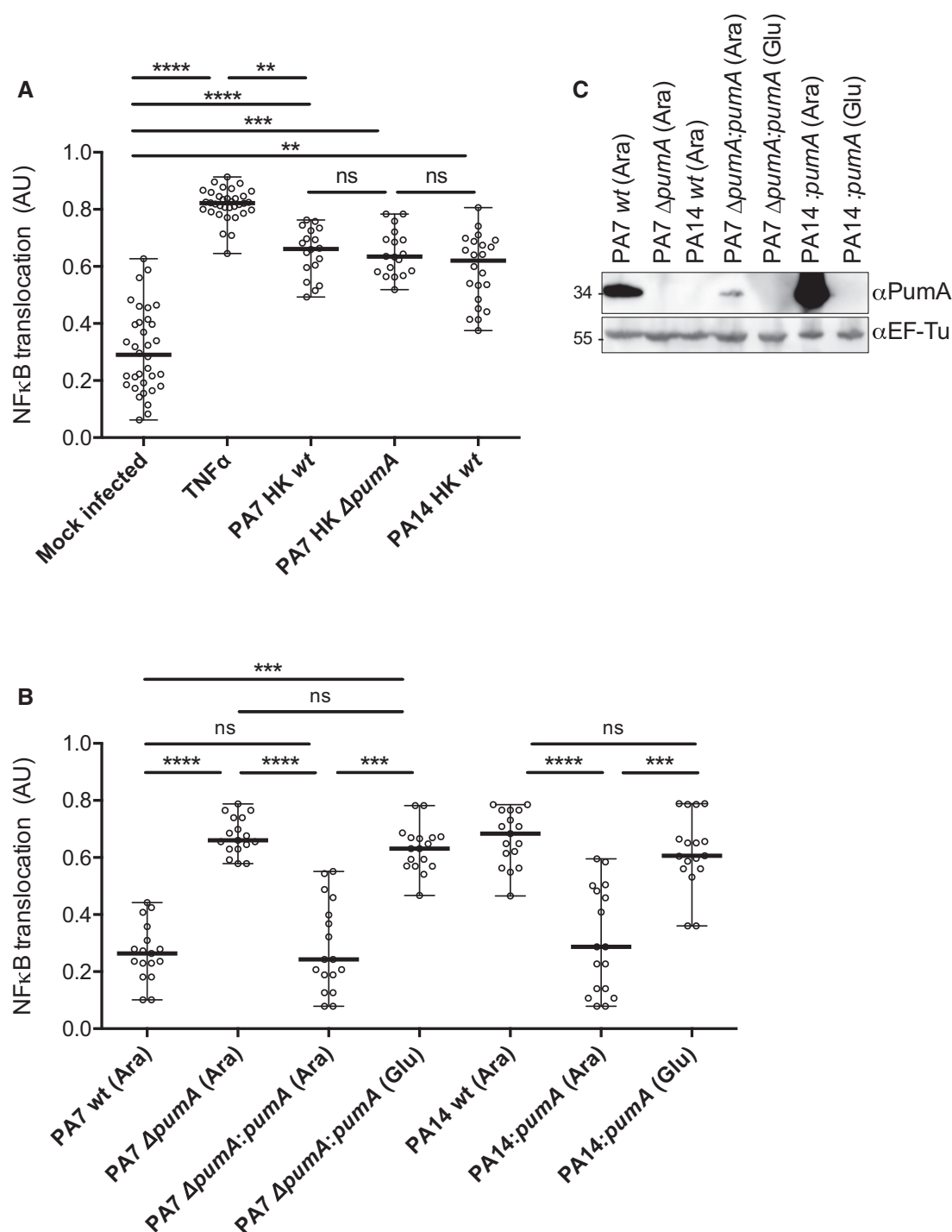


Figure 2. Puma is essential for control of NF-κB translocation into the nucleus during *Pseudomonas aeruginosa* infection of human A549 lung epithelial cells.

A Quantification of fluorescence ratio between nuclear NF-κB (p65) and nuclear DAPI staining. Negative control corresponds to uninfected cells that underwent all steps of the experiment. Positive control corresponds to full NF-κB activation with TNFα (1 μg/ml). A549 cells were incubated for 1 h with heat-killed (HK) bacteria to establish maximum activation induced by *Pseudomonas* infection.

B Cells were infected for 1 h with either *P. aeruginosa* PA7 wt, Δpuma, Δpuma:puma (Ara) induced with 1% arabinose, Δpuma:puma (Glu) repressed with 0.5% glucose, PA14 wt, PA14:puma (Ara) induced with 1% arabinose and PA14:puma (Glu) repressed with 0.5% glucose. For consistency, arabinose was also included for the infections with wild-type and deletion mutant strains.

C Western blots from representative inocula used for the infection experiments, showing expression of Puma (34 kDa) in the different *P. aeruginosa* strains visualized using a polyclonal rabbit anti-Puma with control blot against the standard cytoplasmic protein EF-Tu (45 kDa) below.

Data information: For (A) and (B), between 200 and 400 cells per condition were counted and data correspond to median ± standard error from three independent experiments. Non-parametric one-way ANOVA Kruskal–Wallis test, with Dunn's multiple comparisons test was performed; **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$.

translocation (Fig 2B versus EV1B). Furthermore, absence of NF- κ B nuclear translocation was not due to reduced immune detection of the mutant strain as incubation of host cells with heat-killed Δ pumA resulted in equivalent levels of NF- κ B activation to the wild-type PA7 (Fig 2A). To further support that the differences observed relate to PumA and are not indirect, we verified that all strains showed equivalent levels of membrane permeability (Fig EV2A), the global protein composition of the cell envelope was not altered in a pumA mutant (Fig EV2B), and no differences were observed in cytotoxicity (Fig EV2C and D) nor host cell adhesion (Fig EV2E) between wild-type PA7 and isogenic Δ pumA mutant. Together these results show that PumA is responsible for *P. aeruginosa* PA7 inhibition of NF- κ B nuclear translocation during infection.

We then investigated whether expression of PumA alone could confer the ability to block NF- κ B translocation to a different *Pseudomonas* strain. We chose PA14, which does not contain pumA and is known to be more virulent due to the presence of several virulence factors, namely those secreted by the T3SS. As expected, cells infected with wild-type PA14 showed high levels of NF- κ B translocation into the nucleus (Fig 2B). Induction of pumA from the PA14 chromosome, which did not impact membrane permeability (Fig EV2A), was sufficient to enable this highly virulent strain to block NF- κ B accumulation in the nucleus of infected cells (Fig 2B). These data indicate that PumA expression in *P. aeruginosa* is necessary and sufficient for NF- κ B inhibition, highlighting its central role in immune evasion.

PumA translocation into host cells during infection *in vitro*

We next sought to determine whether PumA could be secreted by *Pseudomonas*. Fractionation of bacterial cells grown in liquid culture indicates that PumA is mostly cytoplasmic and to a lesser extent associated with the inner membrane (Appendix Fig S3A). The protein was not detected in the outer membrane fractions nor could it be found in the supernatant indicating absence of secretion into the extracellular milieu *in vitro*. To determine whether PumA could be found inside host cells during infection, we fused chromosomal PumA with the TEM1 β -lactamase. Although the presence of other β -lactamases in PA7 and/or potential bacterial lysis resulted in non-specific cleavage of the CCF2 substrate within host cells infected with the wild-type strain, significant levels of coumarin fluorescing cells following infection with a strain containing PumA-TEM1 (Appendix Fig S3B) suggest that PumA is translocated into host cells during infection.

PumA is associated with both TIRAP and MyD88 at the plasma membrane and intracellular compartments

To determine the mechanism by which PumA interferes with NF- κ B activity, PumA was expressed in mammalian cells. We found PumA localized mostly at the plasma membrane, with some intracellular distribution, independently of the tag and in both immortal HeLa cells (Fig EV3A, top panel) and primary mouse embryonic fibroblasts (MEFs, Fig EV3B). As this localization was reminiscent of that of the TLR adaptor TIRAP (Fig EV3A and B), we co-transfected cells with PumA and TIRAP. We found extensive co-localization, in particular at the plasma membrane in both HeLa and MEFs (Fig 3A

and B). We observed these results with any combination of tags (HA, Myc or GFP) for both proteins.

In contrast with TIRAP, MyD88 is mostly localized in intracellular structures that do not label the plasma membrane. We therefore co-expressed MyD88 with PumA. Surprisingly, we found enrichment of PumA in a proportion of MyD88-positive structures in both cell types although to a lesser extent than that observed with TIRAP (Fig 3A and B). These results were confirmed by structured illumination microscopy (SIM) to enable imaging at higher resolution (Fig 3C and D). PumA enrichment was observed with PumA tagged with Myc or HA and MyD88 fused to either HA, FLAG or Myc. Curiously, this phenotype was exacerbated when GFP-PumA, normally at the cell surface (Fig EV3) was co-expressed with MyD88, resulting in the majority of GFP-PumA being recruited to MyD88-positive compartments (Fig EV3C).

The TIR domain of PumA is responsible for interaction with both TIRAP and MyD88

We then investigated whether the TIR domain present in the first 136 amino acids of PumA was responsible for membrane targeting. PumA_{1–136} was also efficiently targeted to the plasma membrane (Fig 4A). However, unlike TIRAP and another bacterial TIR protein BtpA/TcpB which are known to interact with specific phospholipids of the plasma membrane (Kagan & Medzhitov, 2006; Radhakrishnan et al, 2009), PumA and PumA_{1–136} did not show any lipid binding properties when incubated with phosphoinositide phosphate strips (Fig 4B). We then tested whether PumA could interact with TIRAP, which could explain its membrane localization. We found that TIRAP-GFP and Myc-PumA co-immunoprecipitated (co-IP) suggesting TIRAP and PumA could be part of the same complex (Fig 4C). This association was confirmed using purified His-tagged PumA or PumA_{1–136} immobilized on Ni-NTA resin, which both retained HA-TIRAP (Fig 4D).

As we had also observed enrichment of PumA in MyD88-positive compartments, we investigated whether PumA could interact with this adaptor protein. Although we did not observe an interaction between GFP-MyD88 and Myc-PumA (Fig 4C) nor HA-PumA and Myc-MyD88 (Appendix Fig S4A), using co-IP assays, His-PumA or PumA_{1–136} were able to retain HA-MyD88 (Fig 5A), suggesting PumA is also able to interact with MyD88. To confirm these results, we took advantage of the strong enrichment in MyD88-positive compartments when MyD88 is co-expressed with the GFP-tagged version of PumA (Fig EV3C) and carried out co-IP in these conditions. Indeed, GFP-PumA and Myc-MyD88 could be co-immunoprecipitated as well as GFP-PumA and Myc-TIRAP (Fig 5B), suggesting that PumA can interact with MyD88. As a control for non-specific TIR–TIR interactions, we tested the ability of PumA to interact with TLR2, also by co-IP. Indeed, GFP-PumA could interact with FLAG-TIRAP but not FLAG-TLR2, suggesting some level of specificity in PumA targeting (Appendix Fig S4B and C).

Finally, we co-expressed in *E. coli* His-PumA_{1–136} with His-MBP (Fig 5C), His-MBP-TIRAP (Fig 5D) or His-MBP-MyD88 (Fig 5E) and we could clearly see co-elution of both TIRAP and MyD88 in contrast to the His-MBP control (also see Appendix Fig S4D).

We next sought to determine whether the C-terminus of PumA_{137–303} could also participate in these interactions. Lack of expression of His-PumA_{137–303} in *E. coli* prevented us from purifying

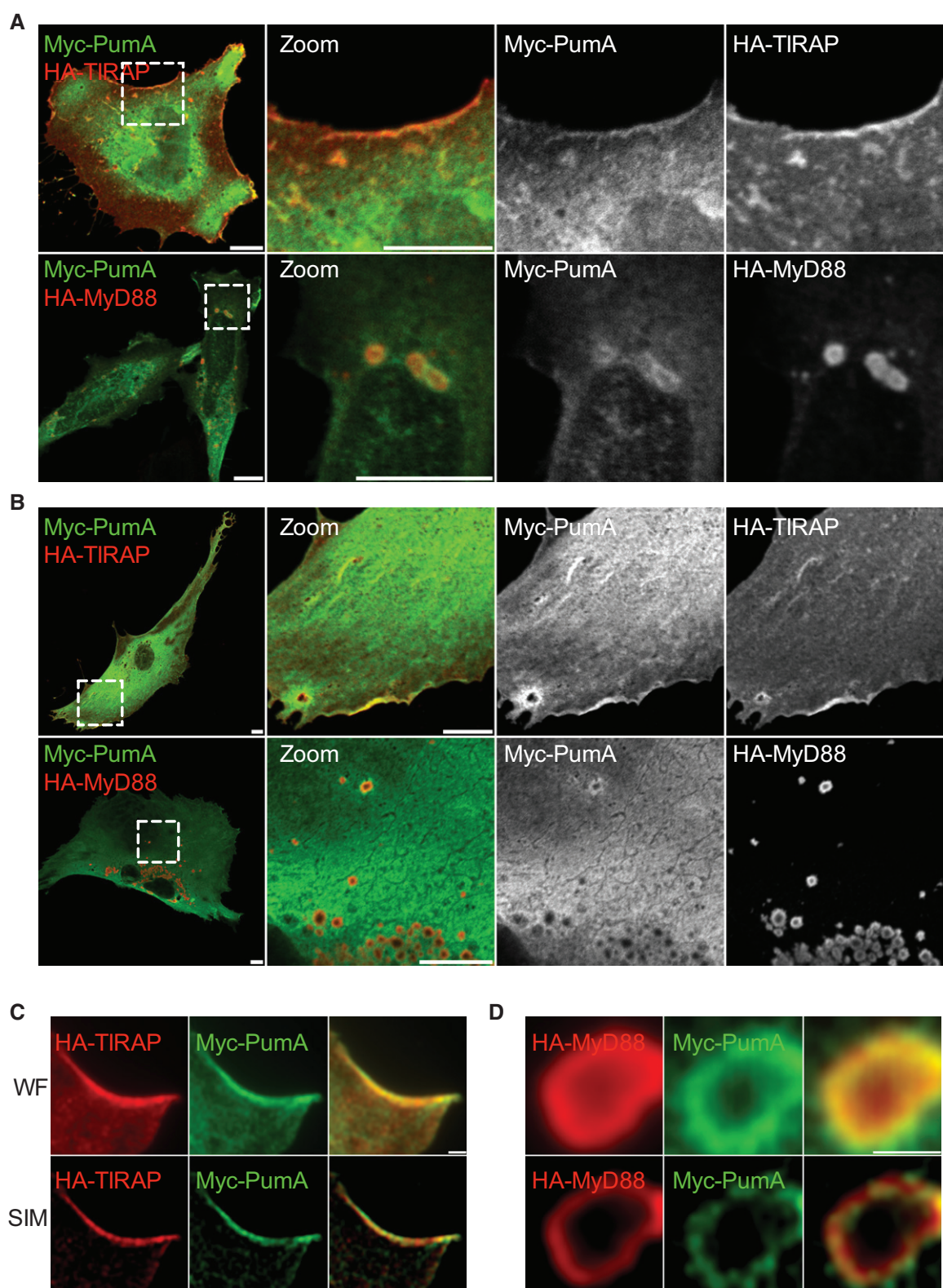


Figure 3. PumA co-localizes with TIRAP at the plasma membrane and to a lesser extent with intracellular MyD88, when ectopically expressed in host cells.

A, B Confocal microscopy of HeLa cells (A) and mouse embryonic fibroblast (MEFs) (B) co-expressing Myc-PumA and adaptor proteins HA-TIRAP (top panel) and HA-MyD88 (bottom panel). Cells were fixed after 10 h of transfection. Scale bars correspond to 10 μm.

C, D Representative micrographs obtained by super resolution structure illumination microscopy (SIM) of MEFs co-expressing (C) Myc-PumA and TIRAP and (D) Myc-PumA and HA-MyD88. Wide field (WF) is shown in top panels and structured illumination of wide field (SIM) in bottom panels. Scale bars correspond to 1 μm.

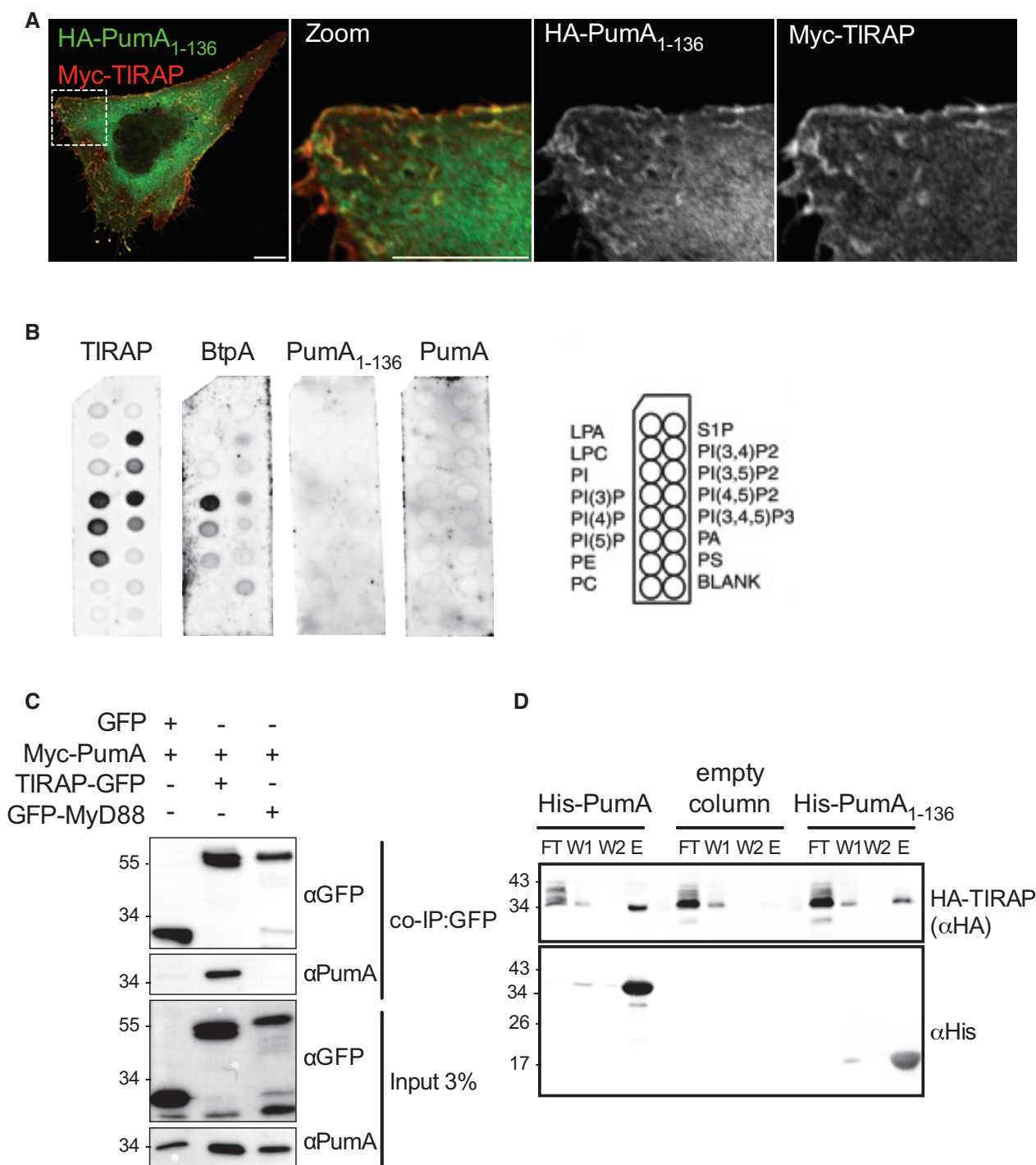


Figure 4. The TIR domain of PumA is required for plasma membrane targeting and interaction with TIRAP.

A Confocal microscopy of HeLa cells co-expressing HA-PumA₁₋₁₃₆ (TIR domain) and Myc-TIRAP labelled with anti-HA (green) and anti-Myc (red) antibodies. Cells were fixed after 10 h of transfection. Scale bars correspond to 10 μ m.

B PIP strip binding of purified TIRAP, BtpA (*Brucella* TIR protein A), PumA₁₋₁₃₆ or full-length PumA. Scheme on the right indicates the identity of each phospholipid on the PIP strips.

C Co-immunoprecipitation (co-IP) assay from cells co-expressing Myc-PumA and GFP (control) or Myc-PumA with either TIRAP-GFP or GFP-MyD88. The co-IP was revealed using an anti-PumA antibody, binding to beads using an anti-GFP antibody and the inputs (shown below) using both anti-GFP and anti-PumA antibodies.

D Pull-down assay using extracts from cells expressing HA-TIRAP against His-PumA or His-PumA₁₋₁₃₆ immobilized on a Ni-NTA resin. Empty column was used as a control for non-specific binding. Interactions were visualized by Western blotting using anti-HA antibody, and column binding with anti-His (lower blot). Flow-through (FT), two washes (W1 and W2) and elution (E) are shown for each sample.

Source data are available online for this figure.

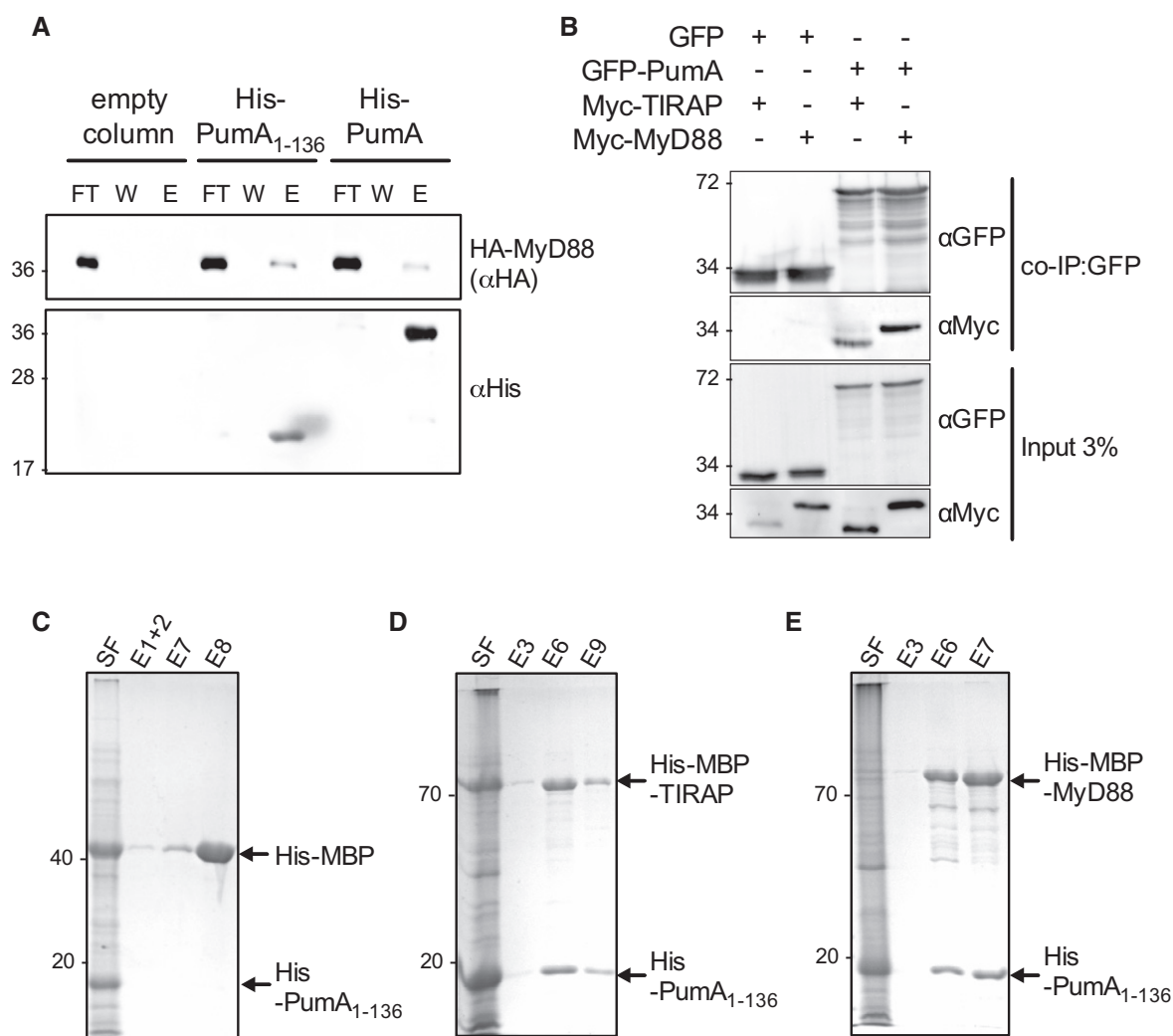


Figure 5. PumaA is also capable of interacting with MyD88.

A Pull-down assay using extracts from cells expressing HA-MyD88 against His-PumA or His-PumA₁₋₁₃₆ immobilized on a Ni-NTA resin. Empty column was used as a control for non-specific binding. Interactions were visualized by Western blotting using anti-HA antibody, and column binding with anti-His (lower blot). Non-bound fraction (FT), last wash (W) and elution (E) are shown for each sample and the molecular weights indicated (kDa).

B Co-immunoprecipitation (co-IP) assay from cells expressing GFP-PumA and either Myc-TIRAP or Myc-MyD88. GFP was used as a control for non-specific binding. The co-IP was revealed using an anti-Myc antibody, the fraction bound to GFP-trapping beads using an anti-GFP antibody and the inputs (shown on the bottom two images) using both anti-Myc and anti-GFP antibodies.

C–E Co-purification of His-PumA₁₋₁₃₆ co-expressed in *E. coli* BL21 with either (C) His-MBP (control), (D) His-MBP-TIRAP or (E) His-MBP-MyD88. Interactions were visualized with coomassie blue stained gels. Soluble fraction (SF) and selected elutions (E) are shown for each sample and the molecular weights indicated (kDa).

Source data are available online for this figure.

this domain. We therefore carried out co-IP experiments with GFP-PumA₁₃₇₋₃₀₃ expressed in host cells. We could not detect any interaction between PumA₁₃₇₋₃₀₃ and TIRAP (Fig EV4A) nor between PumA₁₃₇₋₃₀₃ and MyD88 (Fig EV4B). However, it is important to note that expression of PumA₁₃₇₋₃₀₃ results in loss of plasma membrane localization. Instead, we observed formation of cellular aggregates that are positive for FK2 labelling (Fig EV4C), which recognizes mono- and poly-ubiquitinated proteins and could correspond to misfolded protein. For this reason, we cannot completely exclude a role of the C-terminus of PumA in these interactions. Nonetheless, our data identify TIRAP and MyD88 as host cell targets

of PumA, which mediates interaction with these adaptor proteins via its TIR domain.

PumA interacts with the ESCRT-I component UBAP1

As PumA was able to interact with both TIRAP and MyD88, two key adaptors in TLR signalling, we hypothesized PumA's function was to block all immune pathways dependent on these adaptors. Using an *in vitro* luciferase assay, we tested key immune receptors implicated in *Pseudomonas* infection. Surprisingly, we found PumA could not only block TLR4, TLR5 and IL-1 β but also the TNF receptor,

which is not dependent on TIR–TIR interactions (Fig EV5A). TNFR1 inhibition was specific to PumA as expression of the *Brucella* TIR domain-containing protein BtpA/TcpB did not have any significant effect (Fig EV5B). We therefore carried a yeast two-hybrid screen to identify an alternative target of PumA and found UBAP1, a key component of the ESCRT-I mediating trafficking and sorting of ubiquitinated cargo proteins on MVBs (Stefani *et al*, 2011; Agromayor *et al*, 2012). This interaction was confirmed by co-IP from cells co-expressing PumA and UBAP1 (Fig 6A and B) as well as by pull-down using purified PumA or PumA_{1–136} and cell extracts with either streptavidin-tagged UBAP1 (Fig 6C) or Myc-UBAP1 (Appendix Fig S5A). These results were specific to PumA as the *Brucella* TIR protein BtpA/TcpB did not show any interaction (Fig 6C). Furthermore, PumA_{137–303} could not co-IP UBAP1 (Fig EV4D) supporting a role of the TIR domain in targeting UBAP1. Not surprisingly, microscopy analysis of cells expressing both PumA and UBAP1 showed significant co-localization at the plasma membrane and intracellular compartments (Appendix Fig S5C).

We next investigated whether PumA is interacting with UBAP1 in the context of the ESCRT-I machinery. As over-expression of UBAP1 could result in its mislocalization, we carried out endogenous co-IP from cells expressing HA-PumA. Full-length PumA not only interacted very efficiently with endogenous UBAP1 but more importantly also co-immunoprecipitated TSG101 (Fig 6D), confirming PumA is targeting the ESCRT-I machinery. As expected, PumA also interacted with endogenous TIRAP (Fig 6D). The TIR domain of PumA only weakly interacted with endogenous UBAP1 and TIRAP (Fig 6E), whereas the C-terminus of PumA showed no interactions (Fig 6F).

While we were conducting this work, another study reported UBAP1 participates in control of TNFR1 and other cytokine receptor trafficking (Mamińska *et al*, 2016). Our data along with this recently published study thus suggest that PumA interaction with UBAP1 results in inhibition of the TNF receptor-mediated pathway. To determine whether PumA was targeting two different types of cellular compartments, one with UBAP1 controlling the TNFR pathway and another containing TLR adaptors, we analysed whether UBAP1 was excluded from TIRAP and MyD88 containing compartments. We first analysed their intracellular localization following transfection as we were not able to detect endogenous UBAP1 with currently available antibodies. Extensive co-localization was observed at the plasma membrane and intracellular structures when co-expressing UBAP1 and TIRAP (Fig 7A), with no visible impact on the normal distribution of TIRAP. However, in the case of MyD88, co-expression with UBAP1 resulted in accumulation of this adaptor at the plasma membrane, not seen in cells expressing MyD88 alone (Fig 7A, bottom panel and B). Quantification of membrane enrichment of MyD88 in cells expressing UBAP1 showed MyD88 membrane association was even more striking in the presence of UBAP1 (Fig 7C) than that observed when co-expressing TIRAP with MyD88 (Kagan & Medzhitov, 2006), suggesting UBAP1 could be participating in MyD88 intracellular sorting.

To determine whether UBAP1 could be interacting with these TLR adaptors, we carried out biochemical analysis of cells co-expressing UBAP1 and either TIRAP or MyD88. We could efficiently detect an interaction between UBAP1 and MyD88 by co-IP (Appendix Fig S5D and E) but not UBAP1 and membrin (Appendix Fig S5E), used as a control eukaryotic protein with the same tag. In the case of TIRAP, the co-IP was much less efficient

(Appendix Fig S5D). These results suggest that UBAP1 may be associated with MyD88-containing compartments and to a lesser extent TIRAP, consistent with our microscopy observations. To confirm these results and ensure these interactions were taking place with UBAP1 in the context of the ESCRT-I, we determined whether MyD88 and TIRAP could interact with endogenous UBAP1 and TSG101. We found that HA-MyD88 co-immunoprecipitated both components of the ESCRT-I as well as endogenous TIRAP (Fig 7D), as expected. However, we did not observe an interaction between HA-TIRAP and endogenous UBAP1 nor TSG101 (Fig 7E), suggesting that only MyD88 can be found associated with the ESCRT-I.

Overall, these data suggest that PumA mediates interactions with UBAP1 in the context of ESCRT-I, which can itself associate with the TLR adaptor MyD88, also targeted by this *P. aeruginosa* effector protein.

Pseudomonas aeruginosa* PA7 induces a decrease of TNFR1 in a PumA-dependent manner during infection *in vitro

It is well described in the literature that inhibition of UBAP1 induces intracellular accumulation of EGFR, LTβR and TNFR1 (Stefani *et al*, 2011; Mamińska *et al*, 2016). To establish a link between PumA interaction with UBAP1 and the ability of PumA to reduce TNFα-dependent signalling (Fig EV5A), we analysed the levels of TNFR1 during infection. In wild-type PA7 infected A549 cells, we observed a decrease of TNFR1 compared to the negative control (Fig 7F). In contrast, the mutant lacking PumA was not able to reduce the levels of TNFR1 in infected cells and this phenotype could be fully restored by expression of PumA in the complemented strain. This is consistent with PumA targeting of UBAP1 and enhancing its activity during infection *in vitro*. Interestingly, we did not see any impact on the overall levels of TIRAP during infection (Fig 7F) suggesting that PumA is not inducing TIRAP degradation as was previously reported for BtpA (Sengupta *et al*, 2010).

Discussion

Many pathogens have developed sophisticated strategies to evade or modify host immune responses to their advantage. We have found that the TIR domain-containing protein PumA plays a major role in the virulence of multi-drug resistant *P. aeruginosa* PA7 strain. PumA ensures efficient inhibition of innate immune responses by interacting with MyD88 and TIRAP, key adaptor proteins for IL-1R and the main relevant TLRs in *Pseudomonas* infection (TLR4 and TLR5), as well as UBAP1 which regulates cytokine receptor pathways. These results identify UBAP1 as a novel cellular target for bacterial pathogens.

Pseudomonas aeruginosa is an important human pathogen associated with high level of mortality in nosocomial infections and cystic fibrosis patients. Most *P. aeruginosa* strains rely on a multitude of virulence factors to control host cellular pathways, including effectors delivered by the T3SS. However, in a cystic fibrosis context, colonizing strains modulate levels of expression of some of these virulence factors (Hauser *et al*, 2011), namely down-regulation of the T3SS (Jain *et al*, 2004) and undergo a remarkable accumulation of pathoadaptive mutations (Marvig *et al*, 2014). The

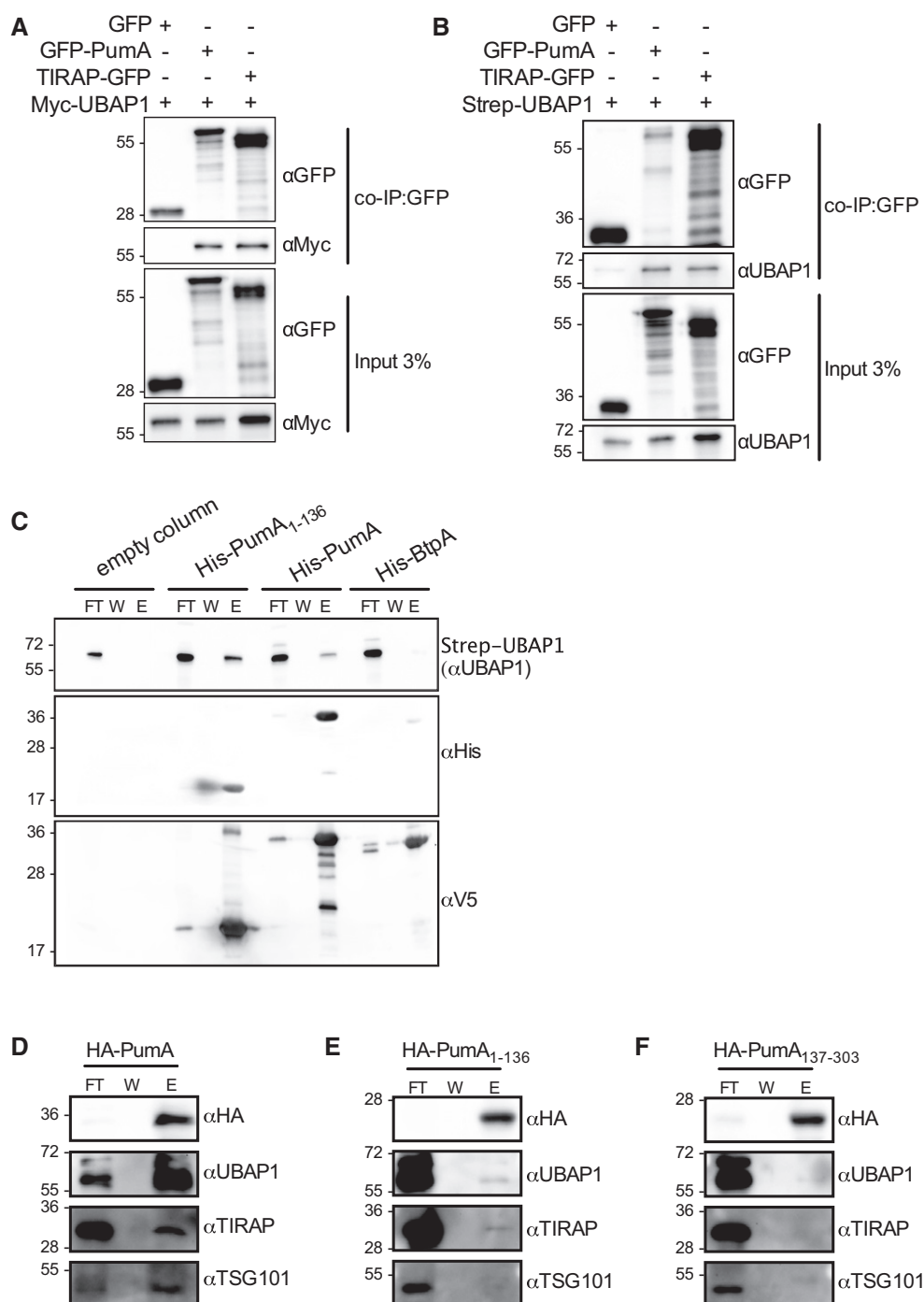


Figure 6. Identification of UBAP1 as a novel host protein targeted by the bacterial TIR domain of PumA.

A, B Co-immunoprecipitation (co-IP) assay from cells expressing Myc-UBAP1 (A) or Strep-UBAP1 (B) with either GFP, GFP-PumA or TIRAP-GFP. The co-IPs were revealed using an anti-Myc (A) or anti-UBAP1 (B) antibodies, the fractions bound to GFP-trapping beads using an anti-GFP antibody and the inputs using anti-Myc, anti-GFP or anti-UBAP1 antibodies as indicated.

C Pull-down assay using extracts from cells expressing Strep-UBAP1 against His-PumA or His-PumA₁₋₁₃₆ immobilized on a Ni-NTA resin. Empty column was used as a control for non-specific binding. Interactions were visualized by Western blotting using anti-UBAP1 antibody, and column binding with anti-His (middle blot), followed by anti-V5 (lower blot), necessary for detection of BtpA, which for reasons we do not understand cannot be easily detected with the anti-His antibody (Appendix Fig S5B).

D–F Endogenous co-IP from cells expressing (D) HA-PumA, (E) HA-PumA₁₋₁₃₆ and (F) HA-PumA₁₃₇₋₃₀₃. The fractions bound to HA-trapping beads were probed with anti-HA, anti-UBAP1, anti-TIRAP and anti-TSG101 antibodies. Non-bound fraction (FT), last wash (W) and elution (E) are shown for each sample and the molecular weights indicated (kDa).

Source data are available online for this figure.

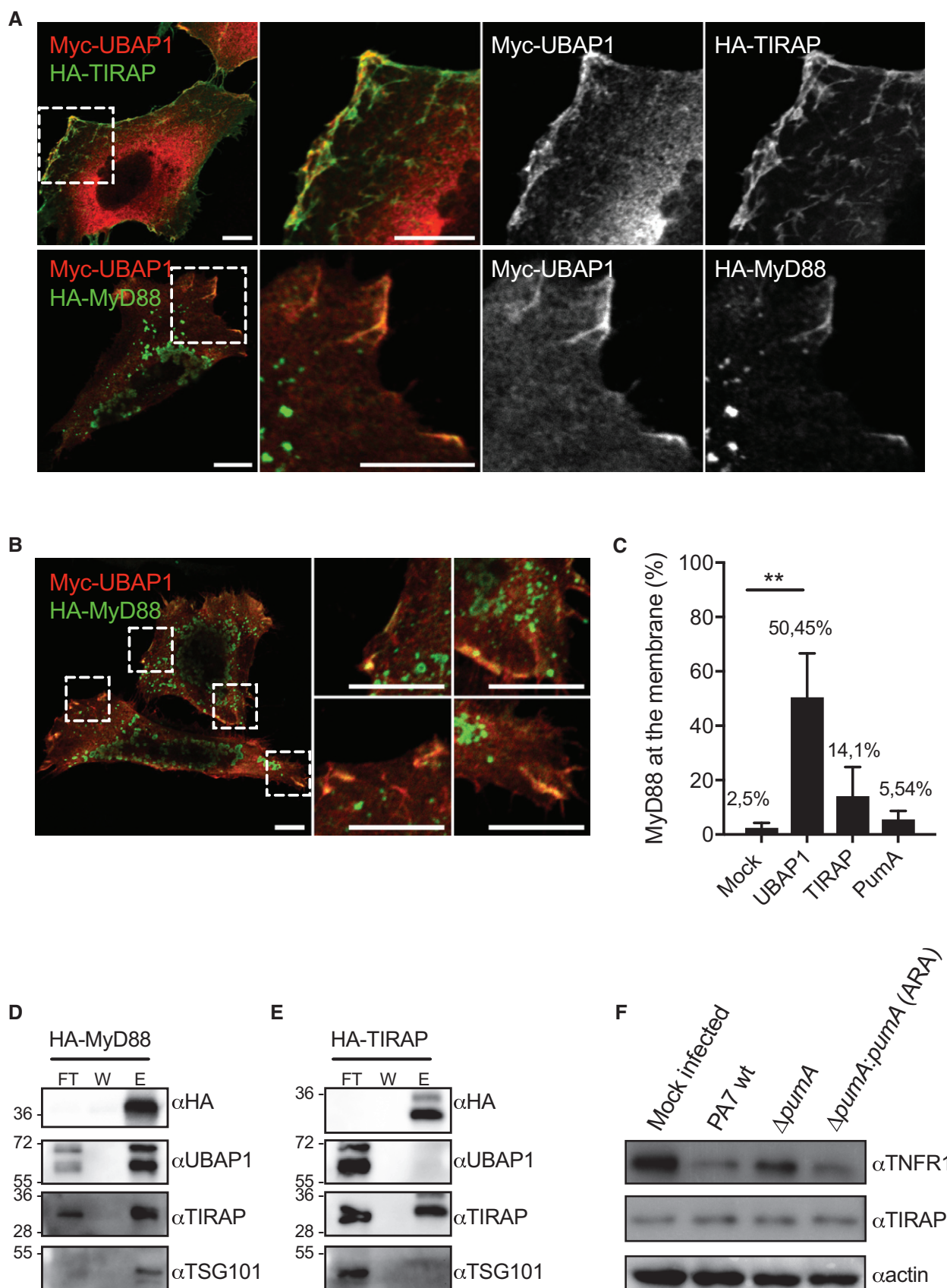


Figure 7.

Figure 7. Analysis of the impact of UBAP1 on TIRAP and MyD88.

- A Representative micrographs obtained by confocal microscopy of HeLa cells co-expressing Myc-UBAP1 (red) and adaptor proteins HA-TIRAP (green, top panel) or HA-MyD88 (green, bottom panel). Cells were fixed after 10 h of transfection. Scale bars correspond to 10 μ m.
- B Different zoomed images showing HA-MyD88 (green) recruitment to the plasma membrane in the presence of Myc-UBAP1 (red). Scale bars correspond to 10 μ m.
- C Quantification of plasma membrane localization of MyD88 in cells expressing MyD88 alone or with either UBAP1, TIRAP or PumA. At least 200 cells were enumerated in three independent experiments, and membrane localization was defined under the strict criteria of clear line at the plasma membrane. Cells with MyD88-positive vesicles in close proximity to the plasma membrane were not counted as positive. Non-parametric one-way ANOVA Kruskal–Wallis test was performed, with Dunn's multiple comparisons test. $^{**}P < 0.01$.
- D, E Endogenous co-IP from cells expressing (D) HA-MyD88 and (E) HA-TIRAP. The fractions bound to HA-trapping beads were probed with anti-HA, anti-UBAP1, anti-TIRAP and anti-TSG101 antibodies. Non-bound fraction (FT), last wash (W) and elution (E) are shown for each sample and the molecular weights indicated (kDa).
- F Western blot of TNFR1 in A549 cells infected for 1 h with either *P. aeruginosa* PA7 wt, Δ pumA or Δ pumA:pumA (Ara) induced with 1% arabinose. A mock-infected sample was included as a negative control. The same blot was also probed for TIRAP and actin to control loading.

Source data are available online for this figure.

PA7-related *P. aeruginosa* strains lack the 20-Kb-long genomic region encoding the T3SS core components and all genes encoding secreted effectors but contains several additional genomic islands and potential novel virulence factors (Pirnay et al, 2009; Roy et al, 2010; Cadoret et al, 2014; Freschi et al, 2015). In some of these strains, such as CLJ1, an exolysin secreted by a two-partner secretion system is responsible for hypervirulence (Elsen et al, 2014). However, in PA7, this exolysin is detected at only low levels in the secretome and is not responsible for cytotoxicity (Reboud et al, 2016), suggesting an alternative pathogenicity mechanism. In this context, we hypothesize that PumA might be underlying an alternative pathogenicity mechanism to allow PA7 persistence within a host. Consistently, we observed a clear attenuation in virulence for a PA7 strain lacking *pumA* in both *C. elegans* and in a mouse lung infection model. Interestingly, no impact in the ability of the *pumA* mutant to disseminate systemically was observed suggesting a role in control of local pathology. This type of *P. aeruginosa* infection based on persistence and colonization rather than rapid cytotoxicity could be relevant in specific clinical contexts such as infection of wound and burn patients, aggravated by the high level of multi-drug resistance. It is interesting to note that other *Pseudomonas* contain a TIR domain protein, namely several strains pathogenic in plants. In this context, it will be interesting to analyse the role of the orthologous TIR protein in the plant pathogens *P. syringae* or *P. viridiflava* with over 90% identity to PumA in amino acid sequence for the TIR domain, regarding control of plant responses as these functions may be relevant across taxonomic kingdoms.

Pseudomonas is not the only bacterial pathogen to take advantage of the TIR domain to engage TIR–TIR interactions which are essential components of innate immune signalling. Bacterial targeting of TLRs has been best described for uropathogenic *E. coli* TcpC (Cirl et al, 2008) and *Brucella* BtpA, also known as TcpB (Cirl et al, 2008; Salcedo et al, 2008), even though their molecular mode of action remains elusive. *Brucella* relies on an additional TIR protein, BtpB to down-modulate inflammation during infection (Salcedo et al, 2013). TcpC was shown to interfere with MyD88-dependent and independent pathways to down-modulate TLR signalling and contribute to kidney pathology (Cirl et al, 2008; Yadav et al, 2010). In the case of *Brucella*, BtpA/TcpB has been described as a mimic of TIRAP, since it can directly bind specific phosphoinositides of the plasma membrane (Radhakrishnan et al, 2009). This is clearly distinct from PumA that shows no significant lipid binding properties. In addition, BtpA/TcpB was also shown to bind TIRAP, which results in its increased ubiquitination and degradation during

infection (Sengupta et al, 2010), which also differs from PumA which despite TIRAP binding does not induce its degradation. Several studies have followed disputing the precise target of BtpA/TcpB with some proposing preferential binding to MyD88 (Chaudhary et al, 2011). One key question that remains unanswered is how these bacterial TIR proteins are entering host cells and where do they localize during infection? No direct imaging of bacterial TIR proteins has been described. In the case of TcpC, internalization into host cells was observed but the export mechanism was not identified (Cirl et al, 2008), whereas no data are available regarding *Salmonella*, *Yersinia*, *Staphylococcus* and *Enterococcus*. In the case of *Brucella*, depending on the fusion tags, translocation into host cells of BtpA/TcpB or BtpB was dependent or independent of the T4SS (Salcedo et al, 2013) whereas a separate group has proposed that BtpA/TcpB is cell permeable and may enter host cells in a passive manner (Radhakrishnan & Splitter, 2010). Unfortunately, PumA fusion with CyaA resulted in its cleavage preventing us from using this system. Using different fluorescent tags and the specific anti-PumA antibody, we were not able to confidently visualize it inside host cells during infection. We were however able to detect intracellular PumA using a TEM1 fusion. Further work needs to be carried out to confirm translocation of PumA into host cells and define the intracellular location of PumA during infection. PumA was also not found in the bacterial culture supernatant *in vitro*, suggesting that contact-dependent delivery is involved. How PumA is entering host cells will have to be further investigated, but since the T3SS is not present in PumA-encoding strains, it suggests that host cell delivery would need an alternative secretion pathway.

It is important to note that TIR domains are widespread in multicellular organisms, such as in plants (role in disease resistance) and amoebas (dual role in ingestion of bacteria and immune-like functions) as well as in numerous bacterial genera that include cyanobacteria and other non-pathogenic bacteria (Zhang et al, 2011). This suggests these domains have evolved as an essential protein–protein interaction platform that could have additional functions. Indeed, recently the TIR domain of TcpC has been shown to directly interact with the NACHT leucine-rich repeat PYD protein 3 (NLRP3) inflammasome and caspase-1, besides MyD88, to perturb inflammasome activation (Waldhuber et al, 2016). There are also additional potential targets yet to be identified for BtpA/TcpB since it interferes with microtubule dynamics (Radhakrishnan et al, 2011; Felix et al, 2014) and induces unfolded protein response (Smith et al, 2013).

This notion that bacterial TIR domains provide a broad interaction platform is supported by our observations. We found that in addition to directly interacting with TIRAP and MyD88, PumA also targets the ESCRT-I machinery by binding to UBAP1 as PumA could co-immunoprecipitate endogenous UBAP1 and TSG101. All these interactions seem to be mediated by the TIR domain of PumA, but endogenous co-IP experiments showed that the full-length PumA is required for efficient interactions to occur. It is likely that TIR–TIR interactions are taking place with TIRAP and MyD88. In the case of UBAP1, the PumA interacting domain remains to be identified. All yeast two-hybrid preys identified in our screen encoded for a region containing amino acid 45–164, present between two key functional domains: the N-terminal UBAP1-MVB12-associated (UMA) domain (residues 17–63) that binds the central stalk of ESCRT-I Vps37 and the central domain (residues 159–308), containing the recently identified key binding site for HDPTP which can act as a cargo adaptor (Gahloth *et al*, 2016). The C-terminal portion of UBAP1 includes a SOUBA domain (residues 381–502) known to bind ubiquitin (Agromayor *et al*, 2012). UBAP1 is a key component of ESCRT-I that enables sorting of ubiquitinated cargo on MVBs. PumA may be binding an intermediate region of UBAP1 that could partially overlap with that interacting with HDPTP. Further work is now necessary to confirm this hypothesis. In view of the recent work implicating UBAP1 in restriction of constitutive NF- κ B signalling (Mamińska *et al*, 2016), PumA could be impacting the activation of TNFR pathway through UBAP1. Depletion of UBAP1 was shown to induce intracellular accumulation of the cytokine receptors in endosomal compartments (Mamińska *et al*, 2016), which leads to increase in constitutive levels of NF- κ B, since UBAP1 cannot ensure proper steady-state cytokine receptor (such as LT β R and TNFR1) sorting and subsequent degradation. Since *in vitro* experiments suggest PumA is blocking TNF receptor-mediated pathway, PumA could be enhancing activity of UBAP1. This phenotype is specific of PumA since we observed no effect of another bacterial TIR domain-containing protein BtpA/TcpB which does not interact with UBAP1 and its ectopic expression does not result in inhibition of the TNF-induced pathway. Consistent with our hypothesis, wild-type PA7 decreases the levels of TNFR1 in A549 cells in a PumA-dependent manner suggesting targeting of UBAP1 is occurring during infection and could enhance its activity.

In an attempt to determine whether distinct intracellular locations were targeted by PumA to enable interaction with TLR adaptors and the ESCRT-I component UBAP1, we analysed whether UBAP1 was excluded from TIRAP or MyD88-enriched compartments. Surprisingly, co-IP experiments revealed endogenous UBAP1 itself and TSG101 could be found associated with MyD88 but not TIRAP, suggesting that the ESCRT-I machinery may be interacting with specific TLR adaptors. We therefore propose that additional crosstalk between these pathways may exist. MyD88 has been shown to interact with TLRs and with TIRAP via its TIR domain or the death domain. It remains to be demonstrated whether UBAP1 interacts directly with MyD88 but our data strongly suggest they can be found in the same complex, namely at the plasma membrane. Interestingly, co-expression of MyD88 and UBAP1 resulted in MyD88 enhanced plasma membrane targeting, to higher levels than that previously described for TIRAP (Kagan & Medzhitov, 2006). Further work is required to determine if UBAP1 interaction with MyD88 promotes

activation of TLR signalling and whether PumA could disrupt this interaction. A few studies have suggested the implication of ESCRT-I or MVBs in the control of TLR pathways. In *Drosophila*, ESCRT-0 components modulate endosomal sorting of Toll (Husebye *et al*, 2006; Huang *et al*, 2010). ESCRT have been also shown to negatively regulate TLR7 and 9 to enable recycling of these receptors following ubiquitination (Chiang *et al*, 2012). More interestingly, inhibition of endosomal sorting via ESCRT-I increases LPS-induced signalling (Husebye *et al*, 2006), suggesting it is playing a role in sorting and degradation of activated receptor complexes.

In conclusion, our study describes a *P. aeruginosa* effector PumA that targets UBAP1 in the context of ESCRT-I and plays a major role in virulence. In addition, our data associate UBAP1 to MyD88, highlighting a potential larger role of endosomal sorting by ESCRT-I in regulation of TLR signalling.

Materials and Methods

Strains

Pseudomonas aeruginosa strains used in this study were wild-type PA7, PA14 or derived strains and were routinely cultured in liquid Luria Bertani (LB) medium. Antibiotics were added to *P. aeruginosa* cultures, when appropriate, at the following concentrations: 150 μ g/ml tetracycline and 750 μ g/ml carbenicillin. When indicated, arabinose at 1% or glucose at 0.5% was added to cultures. For *Escherichia coli* cultures, antibiotics were added when necessary at the following concentrations: 50 μ g/ml kanamycin and 50 μ g/ml ampicillin.

Construction of *Pseudomonas* Δ pumA mutant and complemented strains

The 500 base pairs upstream and 500 base pairs downstream of *pumA* gene (*PSPA7_2375*; NC_009656.1.) were amplified from *P. aeruginosa* PA7 genomic DNA to do overlapping PCR, using primers 5'-TTTGGGCCCAAGACGATCAGCGGCACC-3', 5'-ATCGGCTCTGCCCTATGCCATCTTTTAACTCCATCCTTGTAAATTC-3', 5'-GGATGGAGTTAAAAAGATGGCATAGGGCAGAGCCGAT-3' and 5'-TTTGATCACAACCTACCCCGATGCGTT-3', respectively. Then, the PCR product was sub-cloned into pGEM[®]-T Easy Vector (PROMEGA) and ligated into pKNG208 (Cadoret *et al*, 2014) following digestion with *SpeI* and *ApaI* to generate pKNG208- Δ pumA. This plasmid was introduced into *P. aeruginosa* PA7 by conjugation where it is incapable of autonomous replication. Homologous recombination events were primary selected using tetracycline resistance (150 μ g/ml) in *Pseudomonas* isolation agar (PIA) plates and secondary selected using sucrose 6% sensitivity in LB agar plates during 2–3 days at room temperature. PCR and sequencing analyses confirmed the *pumA* wild-type gene was deleted and Western blotting showed absence of PumA production of the PA7 Δ pumA strain (Appendix Fig S2B).

The mini-CTX- P_{BAD} plasmid was constructed by cloning the *Sall*-*AraC*- P_{BAD} -*SacI* fragment from pJN105 vector (Newman & Fuqua, 1999) into the 6711 bp *Sall*/*SacI* DNA fragment from miniCTX-lacZ vector (Hoang *et al*, 1998). *PSPA7_2375* gene was amplified with an artificial Shine-Dalgarno (AAGAAG) and cloned into mini-CTX- P_{BAD} digested by *SpeI*/*SacI* using the SLIC method (Jeong *et al*, 2012).

Primers used were 5'-AGCCCGGGGATCCACTAGTAGGAGGTGA GATATACAATGGCGGTCTTCATTAGTTA-3' and 5'-ACCATCCAGT GCAGGAGCTCCTATGCGCGCGCCACGGG-3'.

Construction of PA7 *pumA::bla1* strain

The 500 base pairs upstream and downstream of *pumA* stop codon from *P. aeruginosa* PA7 genomic DNA and *blaM* gene from pJC121 plasmid (Myeni et al, 2013) were PCR amplified using primers 5'-ATTACGCGTTAACCCGGGCCCAGGATGTTGACGGCTATC-3', 5'-CAGCGTTTCTGGTGC GCGCGGCCACGG-3', 5'-CTGATTAAGTAGGG CAGAGCCGATCAGCTC-3', 5'-ACACTGGCGGCCGTTACTAGTGCTG GACTGGCGCACTA-3', 5'-TGGCCGCGCGCACCAGAAACGCTGGT GAAA-3' and 5'-ATCGGCTCTGCCCTACTTAATCAGTGAGGCACC T-3' and used in overlapping PCR. DNA product was then cloned by the SLIC method (Jeong et al, 2012) into pKNG208 (Cadoret et al, 2014) digested by *ApaI*/*SpeI* to generate pKNG208-*pumA::bla1* vector.

Construction of eukaryotic expression vectors

The PumA constructs were obtained by cloning in the gateway pDONR™ (Life Technologies) and then cloned in the pENTRY Myc, HA or GFP vectors. The following primers were used 5'-GGGGA CAAGTTTGTAACAAAAAGCAGGCTTCGCGGTCTTCATTAGTTATT CCCACG-3' and 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCC TATGCGCGCGGCCACGGGGTAGC-3'. PumA₁₋₁₃₆ was constructed with the following primers: 5'-GGGG ACAAGTTTGTAACAAAAA GCAGGCTTCATGGCGGTCTTCATTAGTTATTCC -3'; 5'-GGGGACCA CTTTGTAACAAAGCTGGGTCTTAACGGGACTGATCAGGATTAG AG-3'. PumA₁₃₇₋₃₀₃ with 5'-GGGGACAAGTTTGTAACAAAAAAGCA GGCTTC ATTGAGGATGTTGACGGCTA-3'; 5'-GGGGACCACTTTG TACAAGAAAGCTGGGTCTATGCGCGCGGCCACGGGGTAGC -3'.

Construction of prokaryotic expression vectors

The full-length *P. aeruginosa* PA7 *pumA* and its TIR domain (residues 1–136) were cloned into pET151/D-Topo (Invitrogen)—which carries the T7 promoter, N-terminal 6xHis and V5 tags, protease recognition site for tobacco etch virus (TEV) protease and ampicillin resistance gene. The following primers were used: 5'-CAC CATGGCGGTCTTCATTAGTTATTCC-3' and 5'-TGATCGGCTCT GCCCTATGC-3' for *pumA*; the same forward primer and 5'-CTAACGGGACTGATCAGGATTAGAG-3' for *pumA* TIR domain. BtpA was cloned in this same vector. The HA-TIRAP and HA-Myd88 vector was used as a template to clone TIRAP and Myd88, respectively, into pRSF-MBP vector. This vector corresponds to pRSFDuet-1 (Novagen) but modified to insert 6xHis-MBP from pETM-41 vector (EMBL) behind the cloning multiple site.

Cell culture and transfections

HeLa, HEK 293T and A549 cells (all obtained from ATCC) were grown in DMEM supplemented with 10% of foetal calf serum (FCS). Mouse embryonic fibroblasts were prepared as described previously (Conner, 2001) and maintained in DMEM supplemented with 10% (FCS). All cells were transiently transfected using Fugene (Roche) for 24 h, according to manufacturer's instructions.

Pseudomonas infection of A549 cells

For adhesion assays and microscopy analysis of NF-κB, cells were first seeded into 24-well tissue culture plates at 2×10^5 cells/well (to obtain a monolayer) or 5×10^4 cells/well, respectively. Cells were infected with overnight cultures at a MOI of 10 or 100 of *P. aeruginosa* in 500 µl of complete medium per well. Plates were centrifuged at $400 \times g$ for 5 min and then incubated for 1 h at 37°C with 5% CO₂ atmosphere. Cells were then washed five times with DMEM and either lysed or fixed. In the case of the cytotoxicity assays, cells were incubated for longer periods with complete media. When indicated, arabinose at 1% or glucose at 0.5% was added.

For NF-κB experiments, exponential phase cultures were also used, but no differences were detected. After 1 h, medium was removed and cells were washed two times with ice-cold PBS. Control samples were always performed by incubating cells with mock inocula and following the exact same procedure as for the infection.

For adhesion assays, cells were lysed with 500 µl of 0.1% Triton solution and pipetted vigorously several times. Lysed samples were harvest, and serial 10-fold dilutions in PBS were plated on LB agar to enumerate CFUs.

For Western blot analysis of TNFR1, cells were seeded in six-well plates at 2×10^5 cells/well and infected as described above. At 1 h post-infection, cells were washed with ice-cold PBS 2 times, were collected and lysed directly with loading buffer. For each sample, six wells were pooled.

Cell cytotoxicity exerted by bacteria was quantified with the cytotoxicity detection kit-LDH (Roche), which measures the activity of cellular lactate dehydrogenase released into the supernatants. The assays were performed according to the instructions of the manufacturer.

For propidium iodide staining, A549 cells were maintained in DMEM media supplemented with 10% FCS. Cells were seeded at 1×10^5 cells/ml in 96-well plate to achieve confluent monolayers. Cells were then infected with overnight cultures of *P. aeruginosa* or mutants supplemented with arabinose to a final concentration of 2% (as indicated) at a MOI of 100. The plates were centrifuged at $400 \times g$ for 5 min and incubated for 1 h at 37°C. After 1 h of infection, cells were washed three times with PBS then incubated with complete media (without red phenol) containing propidium iodide and labelling measured during 6 h every 15 min with a Tecan Infinite M1000.

Immunofluorescence labelling and microscopy

Cells were fixed in Antigenfix (DiaPath), at room temperature for 10 min. Cells were then labelled at RT with primary antibody mix diluted in 0.1% saponin in PBS with 1% BSA and 10% horse serum for blocking. Primary antibody was incubated for 1 h followed by two washes in 0.1% saponin in PBS. Secondary antibodies were then mixed and incubated for a further 30 min, followed by two washes in 0.1% saponin in PBS, one wash in PBS and one wash in distilled water before mounting with Prolong Gold. Samples were examined on a Zeiss LSM710 or Zeiss LSM800 laser scanning confocal microscopes for image acquisition. Images of $1,024 \times 1,024$ pixels were then assembled using plugin FigureJ from ImageJ.

For immunofluorescence microscopy analysis of NF-κB, cells were permeabilized for 6 min with 0.1% Triton in PBS, followed by a blocking for 1 h with 2% BSA in PBS. Primary antibodies were

incubated for 1 h followed by two washes in 2% BSA in PBS, 30-min incubation for secondary antibodies, two washes in 2% BSA in PBS, one wash in PBS and one wash in water before mounting with Prolong Gold (Life Technologies). Samples were examined on a Zeiss LSM710 laser scanning confocal microscope for image acquisition. Images of $2,648 \times 2,648$ pixels were then passed through a specific plugin of ImageJ developed by L. Plantevin, based on a previous study (Noursadeghi *et al*, 2008); raw images were treated with a median filter and threshold moments, afterwards total NF- κ B was subtracted from the Dapi channel to obtain cytoplasmic NF- κ B. Total NF- κ B was then subtracted from cytoplasmic NF- κ B to obtain nuclear NF- κ B (Fig EV1A). Quantification was always done by counting at least 200 cells per condition in minimum three independent experiments, for a total of at least 600 host cells analysed per condition.

Antibodies and reagents

Primary antibodies used were rabbit anti-p65 from Santa Cruz (clone C-20, ref. sc-372) at 1/250, mouse anti-myc9E10 (developed by Bishop, J.M. was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, created by the NICHD of the NIH and maintained at the University of Iowa), mouse anti-HA (Eurogentec, clone 16B12, ref. MMS-101R), rabbit anti-HA (Sigma, ref. H6908), rabbit anti-GFP (Amsbio, ref. TP401), rabbit anti-UBAP1 (Proteintech, ref. 12385-1-AP), mouse anti-His (Sigma, clone HIS-1, ref. H1029), mouse anti-FLAG (Sigma, clone M2, ref. F1804) all at 1/1000 and mouse anti-TNFR1 (Santa Cruz, clone H-5, ref. sc-8436) and rabbit anti-TSG101 (Atlas Antibodies, ref. HPA006161) both at 1/200. Rabbit polyclonal anti-PumA serum was obtained by repeated immunization of rabbits with purified PumA (Eurogentec) and was used at 1/1,000 for Western blot and for immunofluorescence microscopy. Purified BtpA was used to obtain chicken anti-BtpA (Eurogentec). Anti-EF-Tu antibody (kind gift from R. Voulhoux) was used at 1/10,000.

Secondary antibodies used were anti-rabbit, mouse, chicken or rat conjugated with Alexas-488, -555 or -647 all from Jackson ImmunoResearch. When necessary, phalloidin-568 (1/1,000) was used to label the actin cytoskeleton and DAPI nuclear dye (1/1,000) for the host cell nucleus. For Western blots, anti-mouse or rabbit-HRP antibodies were used at 1/5,000.

TEM translocation assay

HeLa cells were seeded in a 96-well plates at 1×10^4 cells/well overnight. Cells were then infected with an MOI of 100 by centrifugation at 4°C, 400 g for 5 min and 1 at 37°C 5% CO₂. Cells were washed with HBSS containing 2.5 mM probenecid. Then, 6 μ l of CFF2 mix (as described by Life Technologies protocol) and 2.5 mM probenecid were added to each well, and incubated for 1.5 h at room temperature in the dark. Cells were finally washed with PBS, fixed using Antigenfix and analysed immediately by confocal microscopy (Zeiss LSM800) or flow cytometry (MACSQuant10 analyser).

Luciferase activity assay

HEK 293T cells were seeded in a 96-well plates at 2×10^4 cells/well overnight, and cells were transiently transfected with FuGENE® 6

(Promega) for 24 h for a total of 0.4 μ g of DNA consisting of 50 ng TLR plasmids, 200 ng of pBIIXLuc reporter plasmid, 5 ng of control Renilla luciferase (pRL-null, Promega) and 50 ng of myc-PumA expression vector. The total amount of DNA was kept constant by adding empty vector. Where indicated, cells were treated with *E. coli* LPS (1 μ g/ml) and Flagellin FLA-ST (1 μ g/ml), all obtained from InvivoGen, for 6 h. In the case of IL-1 β and TNFR, endogenous receptors were stimulated with IL-1 β (100 ng/ml) and TNF α (100 ng/ml), respectively. Cells were then lysed and luciferase activity measured using Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega).

Yeast two-hybrid screen

Full-length *pumA* cloned in pB27 (N-LexA-bait-C fusion) was used in a ULTimate screen against a human normal lung-RP1 library (Hybrigenics).

Protein expression and purification

Escherichia coli BL21 star (DE3) cells carrying pET151D topo-*pumA*, pET151D topo-*pumA*_{1–136}, or pRSFDuet-TIRAP or MyD88 plasmids were grown in 1 L Luria Bertani (LB) media containing ampicillin or kanamycin according to the plasmid at 37°C until an OD₆₀₀ value of 0.5–0.8 was reached. Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to final concentration of 1 mM, and culture was further grown overnight at 20°C. Cells were harvested by centrifugation at 6,000 $\times$ g for 20 min at 4°C.

Bacterial pellets were lysed by sonication in cold lysis buffer (40 mM Tris-HCl pH8, 250 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 1% (v/v) Triton X-100) supplemented with DNase-I, lysozyme and protease inhibitor tablets (Roche). Extracts were cleared at 16,000 $\times$ g for 20 min at 4°C and loaded onto a 5 ml His-Trap column or 5 ml MBP-Trap column (GE Healthcare) pre-equilibrated with buffer A (40 mM Tris [pH8], 250 mM NaCl, 5% glycerol). The column was washed successively with buffer A, 10% v/v buffer B (buffer A with 500 mM imidazole), 1M NaCl and eluted in a gradient of buffer B (His-Trap) or wash in buffer A and eluted in buffer A containing 20 mM maltose (MBP-Trap).

Proteins used for lipid binding assay were incubated with TEV protease, 1mM DTT and 0.5 mM EDTA, dialysed against buffer A at 4°C overnight. The untagged recombinant protein was purified through a second His-trap column. Pure fractions were pooled, concentrated and applied to size exclusion chromatography (Superdex 75 10/300; GE Healthcare).

Fractions were analysed by SDS-PAGE.

Pull-downs from cell extracts

Human embryonic kidney (HEK) 293T cells were seeded at 5×10^5 in 10-cm cell culture dish in Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies) supplemented with 10% foetal bovine serum. Cells were incubated overnight in a 37°C humidified atmosphere of 5% CO₂. Cells were transiently transfected with different plasmids (8 μ g) using FuGENE 6 (Promega). 22 h after infection, cells were washed in ice-cold PBS, harvested and resuspended in 200 μ l of RIPA buffer (Sigma) supplemented with phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma) and protease inhibitor

cocktail (Roche). Extracts were then centrifuged at 17,000 g at 4°C for 20 min. The supernatant was incubated with 50 µg of His tag recombinant protein during 2 h at 4°C, then incubated within gravity flow column (Agilent) containing 80 µl Ni-NTA agarose beads (Macherey-Nagel) during 1 h beforehand washed in water and pre-equilibrated in equilibrium buffer 20 mM Tris–HCl pH7.5, 250 mM NaCl. The column was washed successively three times in equilibrium buffer supplemented with 25 mM imidazole, three times in equilibrium buffer and eluted in equilibrium buffer supplemented with 500 mM imidazole. Proteins eluted were separated by SDS–PAGE, transferred to a PVDF membrane, incubated with specific primary antibodies for 1 h and detected with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies by using Clarity™ Western ECL Blotting Substrate (Bio-Rad).

Co-immunoprecipitations

HEK 293T cells were cultured in 100 mm × 20 mm cell culture dishes at 4×10^5 cells/dish overnight. Cells were transiently transfected with 14.7 µl of Torpedo^{DNA} (Ibidi) for 24 h for a total of 5 µg of DNA/plate. On ice, after two washes with cold PBS, cells were collected by with a cell scraper and centrifuged at 80 g at 4°C during 5 min. Cell lysis and processing for co-immunoprecipitation were done as described by either GFP-Trap®_A kit (Chromotek) or with the Pierce™ HA Epitope Antibody Agarose conjugate (Thermo scientific).

For endogenous co-IP, HeLa cells were cultured in 100 mm × 20 mm cell culture dishes at 1×10^6 cells/dish overnight. Cells were transiently transfected and collected as described above. Cell lysis and processing for co-immunoprecipitation were done following the manufacturers' instructions (Pierce™ HA Epitope Antibody Agarose conjugate, Thermo scientific) but using 100 µl of beads and increasing the number of washes to 5.

Co-expression analysis

Escherichia coli BL21 star (DE3) cells harbouring both pET151D topo-*pumA*_{1–136} and pRSF-Duet vector-TIRAP (or Myd88 or empty vector) plasmids were grown in LB media containing ampicillin and kanamycin at 37°C until an OD₆₀₀ value of 0.5–0.8 and induced with 2 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside overnight at 20°C.

Cells were lysed and loaded onto a 5 ml MBP column as described in the protein expression and purification section. Fractions were analysed by SDS–PAGE.

Lipid binding assays

Lipid binding assays were performed as described previously (Marek & Kagan, 2012). Briefly, phosphoinositide phosphate (PIP) strips (Echelon Biosciences) were saturated in blocking buffer (10 mM Tris [pH8], 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, 0.1% Ovalbumin) for 1 h at room temperature under shaking. Strips were probed for 2 h at room temperature with each recombinant protein (2.5 µg) in the presence of the specific anti-protein antibody. PIP strips were then washed in blocking buffer three times for 10 min each and probed with an HRP-conjugated anti-rabbit IgG or anti-Hen IgY for

30 min in blocking buffer. Bound protein was detected using Clarity™ Western ECL Blotting Substrate.

Caenorhabditis elegans infection

The slow killing assay was performed as described previously (Garvis *et al*, 2009). Each independent assay consisted of three replicates. Briefly, five 60 mm NGM plates were inoculated with 60 µl of overnight culture of each bacterial strain and incubated at 37°C overnight. Plates were seeded with L4 stage hermaphrodite fer-15 worms (10 per plate). Plates were then incubated at 25°C and scored each day for live worms. A worm was considered dead when it no longer responded to touch. *Escherichia coli* was used as a control. Animal survival was plotted using GraphPad Prism version 6.0 for Mac, GraphPad Software, La Jolla, California, USA. Survival curves are considered significantly different from the control when *P*-values are < 0.05. Prism calculates survival fractions using the product limit (Kaplan–Meier) method. Prism compares survival curves by two methods: the log-rank test (also called the Mantel–Cox test) and the Gehan–Breslow–Wilcoxon test.

Mouse model of *Pseudomonas* acute infection

Wild-type C57BL6/J male mice, 8–10 weeks old, were purchased from Janvier laboratories. Mice were randomized before the experiments and infection were performed blindly. Following a light anaesthesia with isoflurane (Baxter), a pulmonary infection model was induced by intranasal instillation with 3×10^7 CFU of *P. aeruginosa* PA7 or PA7Δ*pumA* strains (except for survival studies conducted with lethal inocula of 4×10^7 CFU/mouse). All mice were sacrificed at 24 h or survival was monitored for 96 h.

To establish bacterial burden, mouse lungs and spleens were homogenized in sterile tubes with PBS. Lung and spleen homogenates were sequentially diluted and cultured on Lysogeny Broth agar plates for 24 h at 37°C to assess bacterial load. Bronchoalveolar lavage (BAL) was done as follows: lungs from each experimental group were washed with a total of 1.5 ml sterile phosphate-buffered saline (PBS). The recovered lavage fluid was centrifuged (200 g for 10 min), and red blood cells from the cellular pellet were lysed with 300 µl of ACK Lysis Buffer (Gibco). Cell counts were performed directly by optical microscopy.

Ethics statement

All experiments involving animals were carried out in compliance with French and European regulations on the care and protection of laboratory animals (European Commission Directive 86/609 and the French Act #2001–486, issued on June 6, 2001) and performed by certified personnel. The study and all experimental protocols associated were registered and approved by the French authorities (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche—Direction Générale pour la Recherche et l'Innovation—Secrétariat Autorisation de projet, registration number 00481.01). Animals were housed at the Lille University Animal Research Facility (Département Hospitalo-Universitaire de Recherche Expérimentale de Lille, France) accredited by the French Ministry of Agriculture for animal care and use in research (#B59–350009).

Fractionation of *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa strains were grown in LB for 4 h and adjusted to OD₆₀₀ 20 in 1 ml cold 50 mM Tris–HCl pH 8.0 with 1 mM EDTA and protease inhibitors (Roche). All subsequent steps were conducted at 4°C. The cell samples were sonicated three times at 30-s intervals, with the resulting cellular debris pelleted by centrifugation three times at 4,000 g for 5 min, taking the uppermost supernatant for each spin. The total membrane fraction was separated from the soluble fraction by ultracentrifugation at 100,000 g for 1 h. After washing the membrane pellet thoroughly in sonication buffer, the inner membrane fraction was solubilized in 200 µl 50 mM Tris–HCl pH 7.6 with 2% (v/v) sodium lauroyl sarcosinate for 1 h with gentle agitation. The outer membrane fraction was pelleted by ultracentrifugation at 100,000 g for 1 h, washed and resuspended in sonication buffer. The preparation of supernatant samples separation by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and subsequent immunoblotting has been described previously (Hachani *et al*, 2011). Immunodetection was conducted using monoclonal antibodies against RNA polymerase (NeoClone) and polyclonal antibodies against PilQ, XcpY (Michel *et al*, 1998) and LasB.

Expanded View for this article is available online.

Acknowledgements

This work was funded by the FINOVI foundation under a Young Researcher Starting Grant and the Cystic Fibrosis French Foundation Vaincre la Mucoviscidose (VLM), grant RF20130500897. SS and SB are supported by INSERM and CNRS staff scientist contracts, respectively. SG and JBL are funded by the Région Rhône-Alpes ARC1 Santé fellowships. PI and AL by the VLM and FINOVI grants. TW is supported by a Wellcome Trust PhD fellowship. We thank the following people: L. Plantevin for programming of ImageJ plugin; V. Gueguen-Chaignon and the Protein Science Facility (SFR Biosciences, France) for protein purification and plasma resonance experiments; R. Voulhoux (CNRS UMR7255, Aix-Marseille University, France) for anti-EF-Tu and LasB antibodies, PA7 strain and vectors pKNG208; G. Ball (CNRS UMR7255, Aix-Marseille University, France) for advice on genetics of PA7; S. Lory (Harvard Medical School, USA) for anti-PilQ antibody; pCMV-HA-MyD88 was a gift from B. Beutler (UT Southwestern Medical Center, USA; Addgene plasmid # 12287), FLAG-TLR5 from R. Medzhitov (Yale University, USA; Addgene plasmid # 13088), TIRAP-GFP and GFP-MyD88 from J. Kagan (Harvard Medical School, USA); HA-TIRAP from L. O'Neil (Trinity College Dublin, Ireland); Myc-TIRAP from A. Weber; L. Alexopolou (CIML, France) FLAG-TLR2 and FLAG-TLR4. We also thank the PLATIM of the SFR Biosciences for help with microscopy, T. Henry (CIRI, Lyon) for discussion and J. Kagan (Harvard Medical School, USA) for discussion and critical reading of the manuscript.

Author contributions

PRCI performed the majority of the experiments. AL carried out all purifications, pull-down and co-expression experiments. J-BL, TG, SB, SG, TEW, LW, SG, AB and SPS also performed experiments. PRCI, AL, SB, LT, AF, BG, PW, SPS conceived and designed experiments. All authors analysed data. SPS wrote the manuscript. All authors contributed to and corrected the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Agromayor M, Soler N, Caballe A, Kueck T, Freund SM, Allen MD, Bycroft M, Perisic O, Ye Y, McDonald B, Scheel H, Hofmann K, Neil SJD, Martin-Serrano J, Williams RL (2012) The UBAP1 subunit of ESCRT-I interacts with ubiquitin via a SOUBA domain. *Structure* 20: 414–428
- Askarian F, van Sorge NM, Sangvik M, Beasley FC, Henriksen JR, Sollid JUE, van Strijp JAG, Nizet V, Johannessen M (2014) A *Staphylococcus aureus* TIR domain protein virulence factor blocks TLR2-mediated NF-κB signaling. *J Innate Immun* 6: 485–498
- Bonham KS, Orzalli MH, Hayashi K, Wolf AI, Glanemann C, Weninger W, Iwasaki A, Knipe DM, Kagan JC (2014) A promiscuous lipid-binding protein diversifies the subcellular sites of toll-like receptor signal transduction. *Cell* 156: 705–716
- Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC (2015) Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol* 33: 257–290
- Cadoret F, Ball G, Douzi B, Voulhoux R (2014) Txc, a new type II secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA7, is regulated by the TtsS/TtsR two-component system and directs specific secretion of the CbpE chitin-binding protein. *J Bacteriol* 196: 2376–2386
- Chaudhary A, Ganguly K, Cabantous S, Waldo GS, Micheva-Viteva SN, Nag K, Hlavacek WS, Tung C-S (2011) The *Brucella* TIR-like protein TcpB interacts with the death domain of MyD88. *Biochem Biophys Res Commun* 417: 299–304
- Chiang C-Y, Engel A, Opaluch AM, Ramos I, Maestre AM, Secundino I, De Jesus PD, Nguyen QT, Welch G, Bonamy GMC, Miraglia LJ, Orth AP, Nizet V, Fernandez-Sesma A, Zhou Y, Barton GM, Chanda SK (2012) Cofactors required for TLR7- and TLR9-dependent innate immune responses. *Cell Host Microbe* 11: 306–318
- Choi YJ, Jung J, Chung HK, Im E, Rhee SH (2013) PTEN regulates TLR5-induced intestinal inflammation by controlling Mal/TIRAP recruitment. *FASEB J* 27: 243–254
- Cirl C, Yadav M, Fischer H, Wagner H, Svanborg C, Miethke T (2008) Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nat Med* 14: 399–406
- Conner DA (2001) Mouse embryo fibroblast (MEF) feeder cell preparation. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 23: Unit 23.2–23.2.7
- Elsen S, Huber P, Bouillot S, Couté Y, Fournier P, Dubois Y, Timsit JF, Maurin M, Attrée 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
- Felix C, Kaplan-Türköz B, Ranaldi S, Koelblen T, Terradot L, O'callaghan D, Vergunst AC (2014) The *Brucella* TIR domain containing proteins BtpA and BtpB have a structural WxxxE motif important for protection against microtubule depolymerisation. *Cell Commun Signal* 12: 53.
- Filloux A (2011) Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: an essay on diversity, evolution, and function. *Front Microbiol* 2: 155
- Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, O'Neill LA (2001) Mal (MyD88-adaptor-like) is required for toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413: 78–83
- Freschi L, Jeukens J, Kukavica-Ibrulj I, Boyle B, Dupont M-J, Laroche J, Laroche S, Maaroufi H, Fothergill JL, Moore M, Winsor GL, Aaron SD, Barbeau J, Bell SC, Burns JL, Cámara M, Cantin A, Charette SJ, Dewar K, Déziel É *et al* (2015) Clinical utilization of genomics data produced by the international *Pseudomonas aeruginosa* consortium. *Front Microbiol* 6: 1036

- Gahloth D, Levy C, Heaven G, Stefani F, Wunderley L, Mould P, Cliff MJ, Bella J, Fielding AJ, Woodman P, Tabernero L (2016) Structural basis for selective interaction between the ESCRT regulator HD-PTP and UBAP1. *Structure* 24: 2115–2126
- Garvis S, Munder A, Ball G, De Bentzmann S, Wiehlmann L, Ewbank JJ, Tümmler B, Filloux A (2009) *Caenorhabditis elegans* semi-automated liquid screen reveals a specialized role for the chemotaxis Gene cheB2 in *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *PLoS Pathog* 5: e1000540
- Hachani A, Lossi NS, Hamilton A, Jones C, Bleves S, Albesa-Jové D, Filloux A (2011) Type VI secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*: secretion and multimerization of VgrG proteins. *J Biol Chem* 286: 12317–12327
- Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA (2011) Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 24: 29–70
- Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, Schweizer HP (1998) A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212: 77–86
- Horng T, Barton GM, Medzhitov R (2001) TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2: 835–841
- Huang HR, Chen ZJ, Kunes S, Chang GD, Maniatis T (2010) Endocytic pathway is required for *Drosophila* Toll innate immune signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 8322–8327
- Husebye H, Halaas Ø, Stenmark H, Tunheim G, Sandanger Ø, Bogen B, Brech A, Latz E, Espevik T (2006) Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J* 25: 683–692
- Jain M, Ramirez D, Seshadri R, Cullina JF, Powers CA, Schulert GS, Bar-Meir M, Sullivan CL, McColley SA, Hauser AR (2004) Type III secretion phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strains change during infection of individuals with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 42: 5229–5237
- Jeong J-Y, Yim H-S, Ryu J-Y, Lee HS, Lee J-H, Seen D-S, Kang SG (2012) One-step sequence- and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies. *Appl Environ Microbiol* 78: 5440–5443
- Kagan JC, Medzhitov R (2006) Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* 125: 943–955
- Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R (2008) TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol* 9: 361–368
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647–1649
- Kharitidi D, Apaja PM, Manteghi S, Suzuki K, Malitskaya E, Roldan A, Gingras M-C, Takagi J, Lukacs GL, Pause A (2015) Interplay of endosomal pH and ligand occupancy in integrin $\alpha 5 \beta 1$ ubiquitination, endocytic sorting, and cell migration. *Cell Rep* 13: 599–609
- Mamińska A, Bartosik A, Banach-Orłowska M, Pilecka I, Jastrzębski K, Zdzalik-Bielecka D, Castanon I, Poulain M, Neyen C, Wolińska-Nizioł L, Toruń A, Szymańska E, Kowalczyk A, Piwocka K, Simonsen A, Stenmark H, Fürthauer M, Gonzalez-Gaitan M, Miaczynska M (2016) ESCRT proteins restrict constitutive NF- κ B signaling by trafficking cytokine receptors. *Sci Signal* 9: ra8
- Marek LR, Kagan JC (2012) Phosphoinositide binding by the Toll adaptor dMyD88 controls antibacterial responses in *Drosophila*. *Immunity* 36: 612–622
- Marvig RL, Sommer LM, Molin S, Johansen HK (2014) Convergent evolution and adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* within patients with cystic fibrosis. *Nat Genet* 47: 57–64
- Michel G, Bleves S, Ball G, Lazdunski A, Filloux A (1998) Mutual stabilization of the XcpZ and XcpY components of the secretory apparatus in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 144: 3379–3386
- Myeni S, Child R, Ng TW, Kupko JJ, Wehrly TD, Porcella SF, Knodler LA, Celli J (2013) *Brucella* modulates secretory trafficking via multiple type IV secretion effector proteins. *PLoS Pathog* 9: e1003556
- Nagpal K, Plantinga TS, Sirois CM, Monks BG, Latz E, Netea MG, Golenbock DT (2011) Natural loss-of-function mutation of myeloid differentiation protein 88 disrupts its ability to form myddosomes. *J Biol Chem* 286: 11875–11882
- Newman JR, Fuqua C (1999) Broad-host-range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* araBAD promoter and the araC regulator. *Gene* 227: 197–203
- Newman RM, Salunkhe P, Godzik A, Reed JC (2006) Identification and characterization of a novel bacterial virulence factor that shares homology with mammalian Toll/interleukin-1 receptor family proteins. *Infect Immun* 74: 594–601
- Noursadeghi M, Tsang J, Haustein T, Miller RF, Chain BM, Katz DR (2008) Quantitative imaging assay for NF- κ B nuclear translocation in primary human macrophages. *J Immunol Methods* 329: 194–200
- Pirnay J-P, Bilocq F, Pot B, Cornelis P, Zizi M, Van Eldere J, Deschaght P, Vaneechoutte M, Jennes S, Pitt T, De Vos D (2009) *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLoS One* 4: e7740
- Radhakrishnan GK, Yu Q, Harms JS, Splitter GA (2009) *Brucella* TIR domain-containing protein mimics properties of the toll-like receptor adaptor protein TIRAP. *J Biol Chem* 284: 9892–9898
- Radhakrishnan GK, Splitter GA (2010) Biochemical and functional analysis of TIR domain containing protein from *Brucella melitensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 397: 59–63
- Radhakrishnan GK, Harms JS, Splitter GA (2011) Modulation of microtubule dynamics by a TIR domain protein from the intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Biochem J* 439: 79–83
- Reboud E, Elsen S, Bouillot S, Golovkine G, Basso P, Jeannot K, Attrée I, Huber P (2016) Phenotype and toxicity of the recently discovered exlA-positive *Pseudomonas aeruginosa* strains collected worldwide. *Environ Microbiol* 18: 3425–3439
- Rosadini CV, Kagan JC (2015) Microbial strategies for antagonizing Toll-like-receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol* 32: 61–70
- Roy PH, Tetu SG, Larouche A, Elbourne L, Tremblay S, Ren Q, Dodson R, Harkins D, Shay R, Watkins K, Mahamoud Y, Paulsen IT (2010) Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PLoS One* 5: e8842
- Salcedo SP, Marchesini MI, Lelouard H, Fugier E, Jolly G, Balor S, Muller A, Lapaque N, Demaria O, Alexopoulou L, Comerchi DJ, Ugalde RA, Pierre P, Gorvel J-P (2008) *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. *PLoS Pathog* 4: e21
- Salcedo SP, Marchesini MI, Degos C, Terwagne M, Von Bargen K, Lepidi H, Herrmann CK, Santos Lacerda TL, Imbert PRC, Pierre P, Alexopoulou L, Letesson J-J, Comerchi DJ, Gorvel J-P (2013) BtpB, a novel *Brucella* TIR-containing effector protein with immune modulatory functions. *Front Cell Infect Microbiol* 3: 28
- Sengupta D, Koblansky A, Gaines J, Brown T, West AP, Zhang D, Nishikawa T, Park S-G, Roop RM, Ghosh S (2010) Subversion of innate immune responses by *Brucella* through the targeted degradation of the TLR signaling adapter, MAL. *J Immunol* 184: 956–964

- Smith JA, Khan M, Magnani DD, Harms JS, Durward M, Radhakrishnan GK, Liu Y-P, Splitter GA (2013) Brucella induces an unfolded protein response via TcpB that supports intracellular replication in macrophages. *PLoS Pathog* 9: e1003785
- Spear AM, Rana RR, Jenner DC, Flick-Smith HC, Oyston PCF, Simpson P, Matthews SJ, Byrne B, Atkins HS (2012) A Toll/interleukin (IL)-1 receptor domain protein from *Yersinia pestis* interacts with mammalian IL-1/Toll-like receptor pathways but does not play a central role in the virulence of *Y. pestis* in a mouse model of bubonic plague. *Microbiology* 158: 1593–1606
- Stefani F, Zhang L, Taylor S, Donovan J, Rollinson S, Doyotte A, Brownhill K, Bennion J, Pickering-Brown S, Woodman P (2011) UBAP1 is a component of an endosome-specific ESCRT-I complex that is essential for MVB sorting. *Curr Biol* 21: 1245–1250
- Waldhuber A, Snyder G, Römmeler F, Cirl C, Müller T, Xiao T, Svanborg C, Miethke T (2016) A comparative analysis of the mechanism of toll-like receptor-disruption by TIR-containing protein C from uropathogenic *Escherichia coli*. *Pathogens* 5: 25
- Wunderley L, Brownhill K, Stefani F, Tabernero L, Woodman P (2014) The molecular basis for selective assembly of the UBAP1-containing endosome-specific ESCRT-I complex. *J Cell Sci* 127: 663–672
- Yadav M, Zhang J, Fischer H, Huang W, Lutay N, Cirl C, Lum J, Miethke T, Svanborg C (2010) Inhibition of TIR domain signaling by TcpC: MyD88-dependent and independent effects on *Escherichia coli* virulence. *PLoS Pathog* 6: e1001120
- Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S (2002) Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 169: 6668–6672
- Zhang Q, Zmasek CM, Cai X, Godzik A (2011) TIR domain-containing adaptor SARM is a late addition to the ongoing microbe-host dialog. *Dev Comp Immunol* 35: 461–468
- Zou J, Baghdadyan AS, Payne SJ, Shankar N (2014) A TIR domain protein from *E. faecalis* attenuates MyD88-Mediated signaling and NF- κ B activation. *PLoS One* 9: e112010



License: This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Annexe 2. Construction de souches GFP d'Ab.

Pour visualiser Ab et notamment les souche hypervirulentes, nous avons voulu construire des souches fluorescentes ayant une intensité de fluorescence homogène et forte. Notre stratégie concista à introduire un plasmide contenant le gène codant la GFP. A mon arrivée dans la laboratoire, Guillermo Repizo avait construit les souches 17978 pX5k-GFP et DSM30011 pX5k-GFP (Figure 30A). L'expression de la GFP de ce plasmide produit une forte intensité de fluorescence mais elle n'est pas homogène au sein de la population bactérienne. De plus, les cassettes de résistances du plasmide ne sont pas compatibles avec les résistances naturelles aux antibiotiques des souches cliniques hypervirulentes.

L'introduction d'un autre plasmide, dont l'expression de la GFP est sous contrôle du promoteur Ptac inductible par l'IPTG, a été testé (données non montrées). Après différents temps d'induction, l'expression de la GFP n'est pas suffisamment forte et homogène. Nous n'avons donc pas retenu cette construction.

Avec l'aide de Sarah Bigot, nous avons donc décidé d'une stratégie différente en insérant directement le gène codant la GFP au niveau chromosomique. Pour cela, un plasmide pUC18-miniTn7 a été construit. Ce vecteur mini-Tn7 permet une insertion spécifique aux sites *attTn7* au niveau du chromosome [269]. Nous avons donc utilisé cette stratégie avec les souches 17978 et DSM30011 mais nous avons obtenu des transformants uniquement pour la souche 17978. Malheureusement une partie seulement de la population est fluorescente. De plus, la fluorescence faible produite ne permet pas lors d'infection de différencier les bactéries de l'auto-fluorescence des cellules eucaryotes. Cette faiblesse pourrait s'expliquer par la présence d'une seule copie du gène codant la GFP dans le génome bactérien ne permettant pas une production de GFP suffisante (données non montrées).

Pour pallier à cette faible intensité de la GFP, nous avons par transformation naturelle inséré le gène codant la sfGFP, permettant une insertion ciblée au niveau du gène *CysI*. Cette stratégie a déjà permis la construction de souches d'Ab [4]. De plus, la sfGFP a une fluorescence plus puissante et un repliement dans l'espace plus rapide que la GFP utilisée

dans les précédentes constructions. Cette construction a été faite en collaboration avec X. Charpentier qui utilise cette méthode dans son laboratoire.

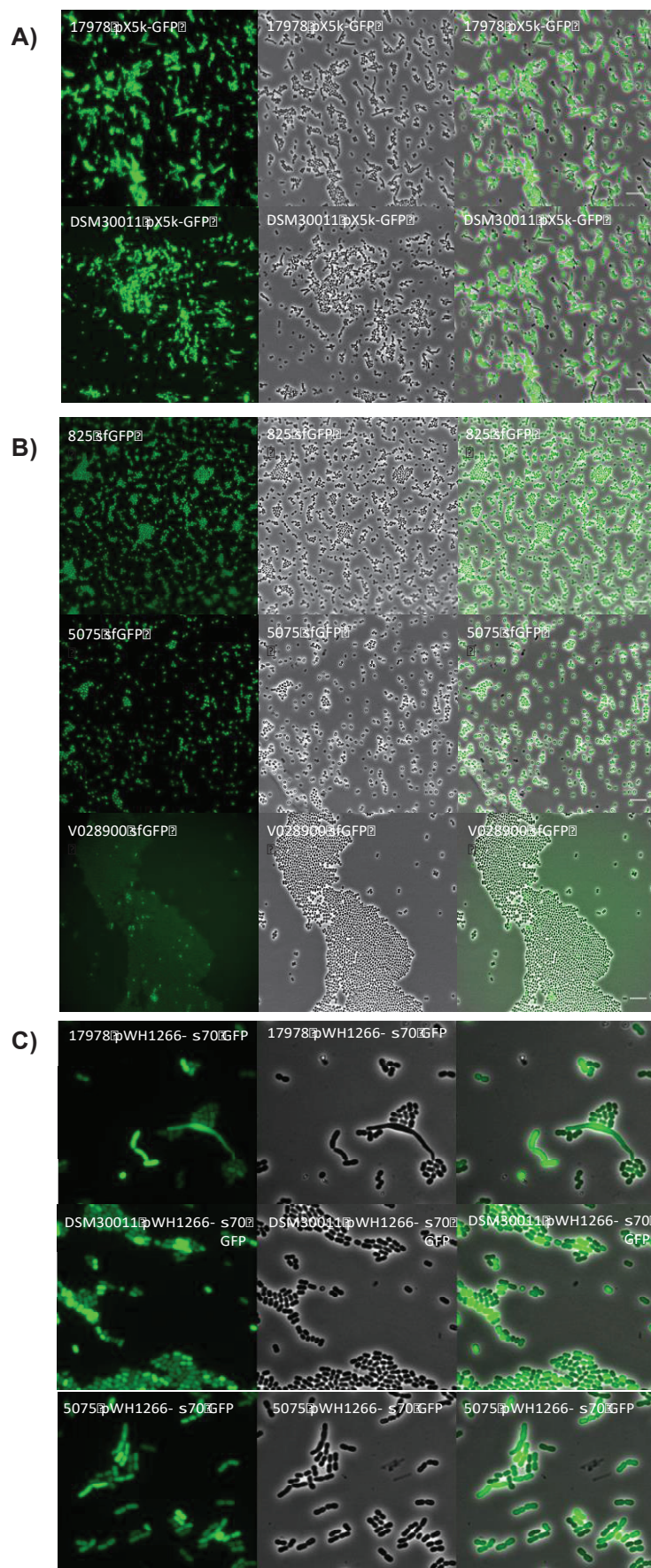


Figure 31. Images de microscopie à épifluorescence des constructions d'Ab exprimant la GFP.

A) Ab possédant le plasmide pX5k-GFP, B) la GFP intégrée au niveau du gène *CysI* ou C) possédant une GFP plasmidique sous influence du promoteur $\sigma 70$. De gauche à droite : image montrant l'expression de la GFP par Ab, Ab en contraste de phase et la superposition des deux canaux. Echelle 10 μ m.

Des clones ont été obtenus pour les souches 825, 5075 et V028900 (Figure 31B). L'observation au microscope des clones obtenus de la souche 5075 montre une expression homogène et assez forte de la GFP (Figure 31B). Au contraire, seule une très faible proportion de la population de la souche V028900 exprime la GFP (Figure 31B). Par ailleurs, cette transformation est orientée pour permettre l'intégration du gène d'intérêt en interrompant le gène *CysI*, codant pour une protéine appariée à une sulfite réductase présente chez la souche 17978. Une expérience préliminaire d'infection indique que l'interruption du gène *cysI* pourrait affecter la capacité d'invasion de la souche 5075 (données non montrées). L'hétérogénéité de l'expression de la GFP, l'absence de transformants chez plusieurs souches et l'interruption du gène *cysI*, nous a conduit à abandonner cette construction.

Le génome de l'ensemble des souches n'est pas encore séquencé ainsi il est difficile de concevoir une intégration ciblée. C'est pourquoi nous avons effectué une dernière tentative pour exprimer la GFP à l'aide d'un plasmide. Le problème d'hétérogénéité d'expression pourrait venir d'un problème de reconnaissance du promoteur de la GFP chez *Ab*. Nous avons donc fusionné la GFP à la séquence promotrice spécifiquement reconnue par $\sigma 70$ d'*Ab*. Ce promoteur est un des promoteurs majeurs contrôlant l'expression des gènes essentiels à la bactérie, présent sous une forme conservée chez l'ensemble des bactéries à Gram-négatif [269–271]. La construction pWH1266- $\sigma 70$ GFP a été introduite avec succès chez les quatre souches étudiées. Cependant l'expression de la GFP n'est pas homogène et certaines souches notamment la 17978 pWH1266- $\sigma 70$ GFP semblent avoir des problèmes importants de division (Figure 31C).

Pour conclure nous n'avons pas réussi à obtenir une construction où la population exprime une GFP homogène chez toutes les souches.

Annexe 3. Mise en place du modèle de monocouche épithéliale pulmonaire polarisée : utilisation des Calu3

Des inserts de culture avec différentes tailles de pore ont été testés pour la mise en place du modèle de cellules Calu3 polarisées. Les cellules cultivées dans les inserts ayant un pore de 3 μm ou 1 μm ont la même courbe de tendance en ce qui concerne l'évaluation de la TER par rapport au temps (Figure 32A). Les valeurs de résistance augmentent de façon significative jusqu'à 7 jours de culture en inserts puis se stabilisent. Cependant les valeurs sont plus élevées pour les monocouches cultivées dans des inserts avec des pores de 3 μm .

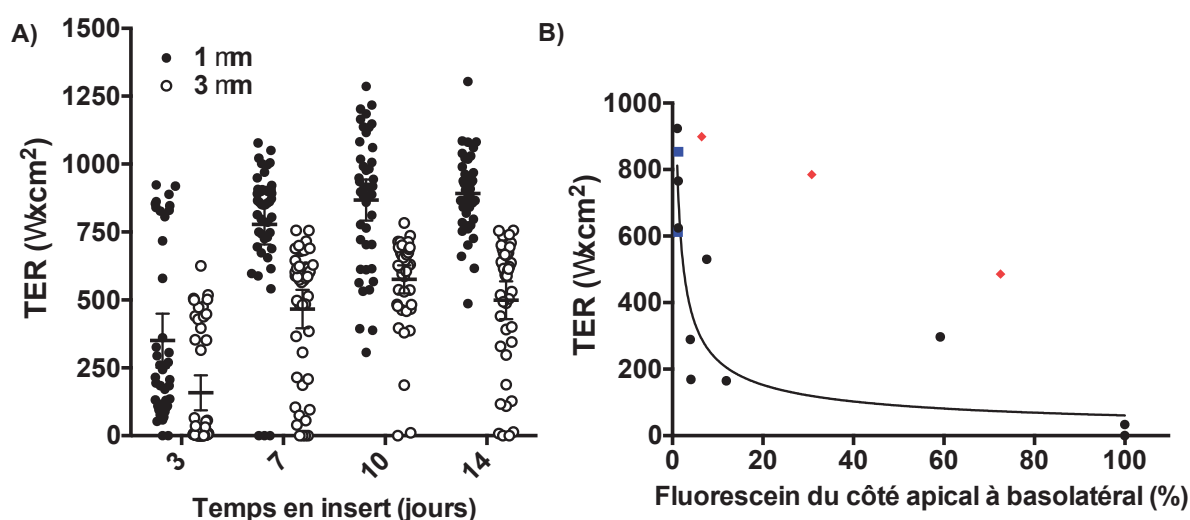


Figure 32. Mise en place du modèle cellulaire polarisé des cellules Calu3.

A) Evaluation de la résistance transépithéliale des cellules pulmonaires humaines polarisées Calu3 en inserts avec une taille de pore de 1 ou 3 μm . B) Evaluation du passage passif de la fluorescéine du compartiment apical au compartiment basolatéral en fonction de la polarisation des cellules (■) après centrifugation ou (•) non des inserts ayant des pores de 3 μm ou (♦) de 1 μm .

La perméabilité des monocouches cellulaires a été comparée en fonction des tailles de pore des inserts dans lesquels elles sont cultivées et de leurs TER. Pour cela le passage de la fluorescéine, du côté apical au côté basolatéral, a été quantifié. L'équivalent de 100% de passage est obtenu en évaluant le passage de la fluorescéine à travers la membrane d'un insert sans cellules. Le passage de la fluorescéine d'un compartiment à l'autre, à valeur de résistance égale, est moins important à travers la monocouche cellulaire

cultivée dans les inserts avec une taille de pore de 3 μm . Moins de 5% de fluorescéine passe à travers les monocouches ayant une résistance $\geq 300 \Omega\text{cm}^2$ (Figure 32B).

Nous avons ensuite vérifié que la centrifugation des puits, une étape importante lors du protocole d'infection des cellules, n'ait aucun effet sur la polarisation de la monocouche. L'imperméabilité de la monocouche cellulaire polarisée est préservée après centrifugation des puits (Figure 32B).

Après ces différentes mises au point, nous avons donc choisi d'effectuer les premières infections sur des cellules polarisées en insert ayant un TER supérieur à $300 \Omega\text{cm}^2$ avec des pores de 3 μm . Une fois polarisées, les cellules Calu3 sont infectées par Ab durant une heure. Afin d'éliminer les bactéries extracellulaires, deux antibiotiques sont ajoutés au milieu de culture cellulaire (hygromycine B à 300 $\mu\text{g/mL}$ et apramycine à 50 $\mu\text{g/mL}$). Ces derniers ont été choisis car toutes les souches y sont sensibles (Tableau en Annexe 6). Nous avons évalué la TER après 4h, 8h ou 24h d'infection. Une baisse de la TER de la monocouche formée de cellules Calu3 est observée pour tous les puits infectés. Cette diminution est également constatée pour les puits n'ayant pas été infectés (Figure 33). Différents tests comme le lavage des cellules infectées avec du milieu de culture cellulaire ou du PBS et la centrifugation en condition d'infection ont été réalisés afin de savoir quelles conditions pourraient affecter la polarisation des cellules. Aucune de ces conditions ne sont responsables de la déstabilisation enregistrée. Ainsi, nous en sommes en venu à la conclusion que l'évaluation successive en elle-même de la TER, en introduisant l'électrode dans le puit, entraîne cette déstabilisation de la monocouche.

Les cellules Calu3 polarisées à l'aide de cette méthode, expliquée ci-dessus, sont dans un environnement « liquide » (LCC), aussi bien côté apical recouverte de milieu de culture cellulaire que basolatéral baignant dans ce milieu. D'après Grainger *et al.*, les cellules Calu3 polarisées en condition de culture air-liquide (AIC), avec un côté apical dépourvu de milieu de culture cellulaire et un côté basolatéral en contact avec le milieu apportant les éléments nutritifs nécessaire aux cellules, fournissent un modèle plus représentatif de la barrière épithéliale pulmonaire [228]. Par conséquent, ce mode de culture a été mis en place afin de nous rapprocher davantage du modèle physiologique de la barrière

épithéliale pulmonaire mais également afin d'avoir un modèle robuste permettant l'évaluation successive la TER.

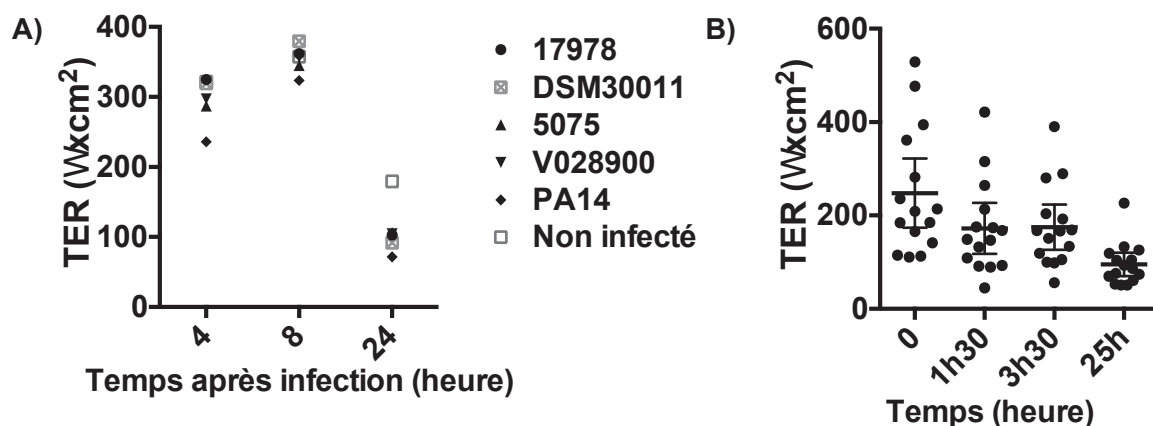


Figure 33. Diminution progressive de la résistance transépithéliale des monocouches de cellules Calu3 polarisées.

Les cellules Calu3 polarisées en inserts avec une taille de pore de 3 μ m ont été infectées pendant 1h puis traitées aux antibiotiques (hygromycine B à 300 μ g/mL et apramycine à 50 μ g/mL). La TER a été évaluée à 4h, 8h ou 24h après infection.

La TER en condition de culture LCC et AIC augmente jusqu'à atteindre un maximum et se stabilise après respectivement 10 et 11 jours ensuite (Figure 34). En revanche les valeurs absolues de la TER des cellules cultivées en conditions AIC sont plus faibles que celle obtenues en condition LCC, ce qui est consistant avec les données présentes dans la littérature [228].

Nous avons décidé pour nos expériences d'infection qu'après évaluation de la TER et une fois que celle-ci indique une polarisation complète, les cellules n'ont pas été manipulées les 3 jours précédant l'infection pour ne pas perturber la monocouche cellulaire. Les cellules ont ensuite été infectées dans les conditions identiques à celles utilisées précédemment.

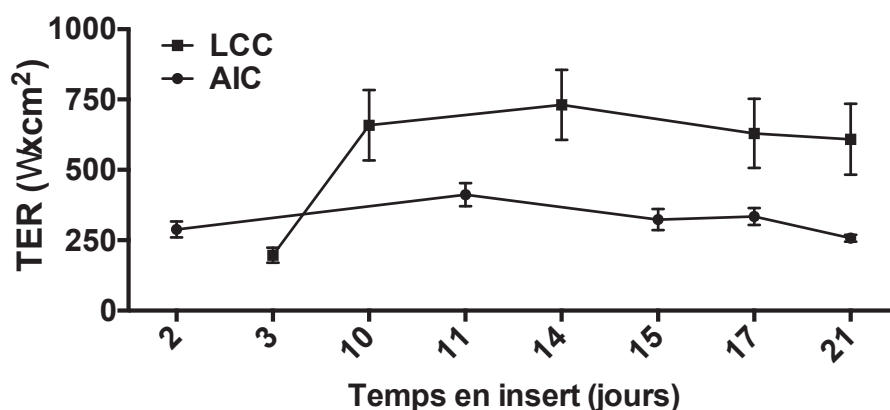


Figure 34. Comparaison de la polarisation de la monocouche de cellules Calu3 cultivées en condition LCC ou AIC.

Évaluation de la TER des cellules Calu3 polarisées en inserts ayant des pores de 3 μ m cultivées en LCC ou en AIC.

Annexe 4. Mise au point du système rapporteur A549-Dual.

Dans un premier temps le système A549-Dual a été testé. Les cellules A549-Dual sont stimulées par ajouts des différents ligands dès leur mise en plaque. La mesure de l'activité de la SEAP a été réalisée à 24h et 48h après la mise en contact des ligands et des cellules (Figure 35). Une augmentation de l'activité de la SEAP après 24h et 48h de stimulation par tous les ligands est enregistrée reflétant l'activation de la voie NF- κ B. Seul le TNF α permet une stimulation significativement plus importante de la voie NF- κ B que celle intrinsèque des cellules non stimulées (Figure 35A).

Ensuite l'activation de la voie NF- κ B a été quantifiée après ajout des ligands aux cellules cette fois adhérentes, puisque l'infection des cellules eucaryotes par Ab se fait dans ces conditions (Figure 35B). Nous avons obtenu une nette augmentation de l'activité de la SEAP chez les cellules A549-Duals. Encore une fois, l'activité de la SEAP des cellules stimulées par le TNF α est significativement plus importante que celle des cellules non stimulées à 24h et 48h (Figure 35B). Pour les autres ligands l'expression de la SEAP n'est pas significativement différente par rapport aux cellules non stimulées.

En conclusion la voie NF- κ B est stimulée par les ligands testés et indique que le système rapporteur est fonctionnel dans les conditions testées.

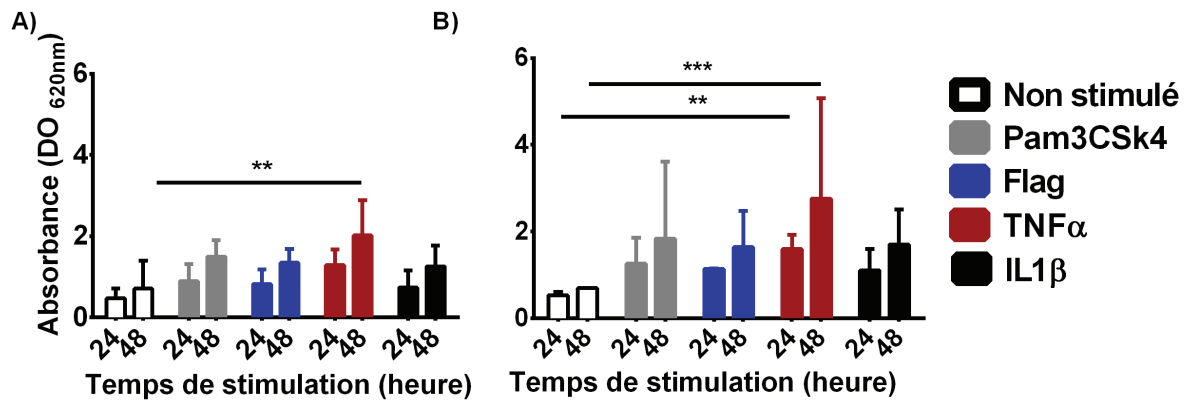


Figure 35. Mise au point des conditions d'utilisations du système de gène rapporteur permettant l'évaluation de l'activation de la voie NF-κB.

Les cellules A549-Dual porteuses du système rapporteur pour l'activation de NFκB ont été stimulées par des ligands ajoutés aux cellules A) en suspension B) ou aux cellules adhérentes. Les ligands utilisés sont Pam3CSK4 ou la flagelline reconnus respectivement par les TLR2 et TLR5 et induisent l'activation de la voie NF-κB. Les cytokines IL-1β ou TNFα reconnu par leur récepteur respectivement IL-1R et TNFR servent de contrôle induisant l'activation de la voie NF-κB. La détection de l'activité de la SEAP dans les surnageants se fait par mesure de la DO à 620 nm après 24h ou 48h de stimulation et reflète l'activation de la voie NF-κB. Les différences significatives ont été calculées à l'aide de Graph Pad Prism (Two Ways ANOVA). ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; l'absence de statistique indique que les différences sont non significatives.

Annexe 5. Souches utilisées au cours de cette étude

Tableau 2. Souches utilisées au cours de l'étude

Souches	Caractéristiques
<i>A. baumannii</i> 17978	Souche pathogène de référence
<i>A. baumannii</i> 17978 Δ tssM mutant	Souche pathogène de référence dépourvue d'un SST6 actif
<i>A. baumannii</i> DSM30011	Souche environnementale
<i>A. baumannii</i> DSM30011 Δ tssM	Souche environnementale dépourvue d'un SST6 actif
<i>A. baumannii</i> DSM30011 Δ tssMptssM	Souche environnementale complémentée ayant un SST6 actif
<i>A. baumannii</i> 5075	Souche/Isolat clinique hypervirulente MDR
<i>A. baumannii</i> V028900	Souche/Isolat clinique hypervirulente MDR
<i>A. baumannii</i> 825	Souche/Isolat clinique MDR
<i>A. baumannii</i> 244	Souche/Isolat clinique MDR
<i>A. baumannii</i> 242	Souche/Isolat clinique MDR
<i>P. aeruginosa</i> PA14	Pathogène humain
<i>K. pneumoniae</i>	Pathogène humain
<i>E. coli</i> DH5 α	Souche non pathogène

Annexe 6. Résistance aux antibiotiques d'Ab

Tableau 3. Résistance aux antibiotiques des souches d'Ab

Souche d'Ab	Concentration (µg/mL)	15	50	100	200	300	500
17978	Apramycine	/	/	/	/	/	/
	Kanamycine	/	/	/	/	/	/
	Gentamycine	/	S	S	S	S	S
	Tétracycline	/	/	/	/	/	/
	Ampicilline	/	R	R	R	R	S
	Rifampicine	/	S	S	S	S	S
	Carbenicilline	/	/	R	S	S	S
	Hygromycine B	/	/	R	S	S	S
DSM30011	Apramycine	/	S	S	S	S	S
	Kanamycine	/	S	S	S	S	S
	Gentamycine	/	S	S	S	S	S
	Tétracycline	/	S	S	S	S	S
	Ampicilline	/	R	S	S	S	S
	Rifampicine	/	S	S	S	S	S
	Carbenicilline	/	/	S	S	S	S
	Hygromycine B	/	/	R	R	S	S
5075	Apramycine	/	S	S	S	S	S
	Kanamycine	/	R	R	R	R	R
	Gentamycine	/	R	R	R	R	R
	Tétracycline	/	S	S	S	S	S
	Ampicilline	/	R	R	R	R	R
	Rifampicine	/	S	S	S	S	S
	Carbenicilline	/	R	R	R	R	R
	Hygromycine B	/	/	R	S	S	S
V028900	Apramycine	/	S	S	S	S	S
	Kanamycine	R	R	R	R	/	/
	Gentamycine	R	R	R	R	/	/
	Tétracycline	S	S	S	S	S	S
	Ampicilline	/	R	R	R	R	R
	Rifampicine	/	/	/	/	/	/
	Carbenicilline	R	R	R	R	R	R
	Hygromycine B	/	/	R	R	S	S
	Chloramphénicol	R	R	S	S	S	S

R indique que la souche est résistante

S indique que la souche est sensible

/ indique que la sensibilité de la souche à cet antibiotique ou à cette concentration n'a pas été testée