



HAL
open science

Premiers mécanismes de régulation d'exlBA, le facteur de virulence des souches de *Pseudomonas aeruginosa* de type PA7

Alice Berry

► **To cite this version:**

Alice Berry. Premiers mécanismes de régulation d'exlBA, le facteur de virulence des souches de *Pseudomonas aeruginosa* de type PA7. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT : 2019GREAV015 . tel-02352034

HAL Id: tel-02352034

<https://theses.hal.science/tel-02352034>

Submitted on 6 Nov 2019

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE
GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Virologie – Microbiologie - Immunologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Alice BERRY

Thèse dirigée par **Sylvie ELSÉN (EDCSV), CNRS**

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

Premiers mécanismes de régulation d'ExIBA, le facteur de virulence des souches de *Pseudomonas aeruginosa* de type PA7

Thèse soutenue publiquement le **9 mai 2019**,
devant le jury composé de :

Madame Patricia RENESTO

Directrice de Recherche, CNRS Délégation Alpes, Président du jury

Madame Sylvie CHEVALIER-LAURENCY

Professeure, Université Rouen-Normandie, Rapporteur

Madame Anne VIANNEY

Maître de Conférences, Université Lyon 1, Rapporteur

Monsieur Christophe BORDI

Professeur, Université Aix-Marseille, Examineur

Madame Isabelle MICHAUD-SORET

Directrice de Recherche, CNRS Délégation Alpes, Examineur

Madame Sylvie ELSÉN

Chargée de Recherche, CNRS Délégation Alpes, Directrice de Thèse



A mes parents et à ma sœur,

A ma famille et mes amis,

Au meilleur ami que j'ai eu durant ces 3 années : IHMA87...

*« Un savant dans son laboratoire n'est pas seulement un technicien :
c'est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels
qui l'impressionnent comme des contes de fées. »*

Marie Curie

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier les membres de mon jury pour avoir accepté d'examiner mon travail : les Pr Sylvie Chevalier-Laurency et Anne Vianney, rapportrices de ma thèse, ainsi que le Pr Christophe Bordi et les Dr Patricia Renesto et Isabelle Michaud-Soret, examinateurs. J'adresse des remerciements additionnels au Pr Bordi, pour son investissement lors de mes comités de suivi de thèse. Pour la même raison, je remercie également les Dr Sylvie Reverchon et Stephan Lacour.

Ma reconnaissance s'adresse au CEA, qui m'a attribué une bourse pour pouvoir effectuer ma thèse, ainsi qu'à Jean-jacques Feige, chef du laboratoire BCI, et Ina Attrée, chef de l'équipe PBRC, pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire et équipe pour ces 3 années. Ina, merci aussi pour ta bonne humeur que tu partages au sein de l'équipe !

Mes remerciements vont ensuite tout particulièrement à Sylvie, ma directrice de thèse. Tu m'as accompagnée pour « murir » scientifiquement tout en m'épanouissant au laboratoire. Merci pour tes nombreux conseils, toutes les discussions scientifiques et non scientifiques (même si en étant dans des bureaux séparés pour la rédaction il y en a beaucoup moins eu ces derniers mois !), pour ta patience et enfin pour ton aide précieuse, surtout en termes de clonage ou de conjugaison bactérienne (ce qui m'a permis de ne pas passer la totalité de ma thèse à ne faire que des mutants chez IHMA87) ! Bonne suite avec Julian et Enzo !

Je suis également reconnaissante envers chaque membre de l'équipe PBRC (Pathogénèse Bactérienne et Réponses Cellulaires) pour votre accueil, vos conseils et tous les bons moments partagés ensembles. Un petit plus pour Vivi, toujours là pour discuter « figures de papier » avec ton accent chantant ou pour des « brainstormings » manip' toujours fructueux ! Antoine, merci de participer à la poursuite du projet di-GMPc, j'aurais tellement voulu qu'il soit plus avancé ! Je compte sur toi et Sylvie pour démêler toute cette histoire ;) !

Je souhaite exprimer ma plus profonde gratitude à mes PBRC Girls (Emeline, Pauline, Stéphanie), sans qui cette aventure aurait été moins « pétillante » ! Merci pour votre soutien, pour tous les moments potins (et ça, il y en a eu !), les fameuses photos, les nombreuses sorties bar ou escape game, les rires, les émotions... Malgré les kilomètres voire les continents qui nous séparent dorénavant, rien ne s'arrête. Stéphanie, tu es la dernière représentante des PBRC Girls au labo, garde ton optimisme à toutes épreuves ! Tu pourras toujours dégainer WhatsApp quand tu auras besoin de critiquer IHMA87 qui « ne fait jamais ce que l'on attend de lui » ;) !

Un mot également pour Mme Cherrier. Vous m'avez transmis la passion pour la biologie au lycée et l'ambition nécessaire pour arriver jusque-là. Merci.

Enfin, une pensée pour mon entourage, ceux sans qui je ne serai pas la même !

Mes amis, merci pour tous les moments de décompression, de soutien et de folie ! Merci plus particulièrement à cette bande de potes avec qui je passe des moments mémorables depuis des années et qui m'a soutenue/supportée dans les moments où la santé n'était pas au beau fixe ! Vous vous reconnaitrez !

Ma famille Extraordinaire ;) oncles, tantes, cousins, cousines et tous les petit cousins/cousines ;) ! Vous êtes au top ! Mémé, j'espère que tu es fière de ta petite fille. Tonton « pique », tu nous as quitté subitement mais tu restes gravé dans mon cœur <3.

Ma grande sœur Julie, simplement parce que tu es MA « p'tite » grande sœur. Et aussi un peu parce que tu as raconté à tous tes amis que ta petite sœur était trop forte et qu'elle allait vaincre *Pseudomonas* d'ici à la fin de sa thèse ! Sans oublié mon beaufrère, Tom P., qui me supporte à longueur de semaine, et ma Citronette/Princesse Tous Terrains/Déménageuse Bretonne/Bouille d'amour et tous les autres surnoms que j'ai pu t'allouer depuis ta naissance (« La *Victoire* est fruit de l'amour. » Antoine de St Exupéry).

Mes supers parents, pour être mes super-héros à moi, même si pour vous, prononcer « *Pseudomonas aeruginosa* » relève de l'impossible ! Mon bonheur c'est en grande partie à vous que je le dois.

Ma belle-famille, qui m'a accueillie les bras ouverts avec toute sa gentillesse depuis maintenant 10 ans !

Mon homme, pour tout, pour toi tout simplement.

Finalement, mes non-remerciements vont à ma santé, qui m'a lâchement « abandonnée » en cours de route. Sans rancune, j'aurais au moins appris ce que veulent vraiment dire le dépassement de soi et le goût de la vie pleine d'énergie !

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	2
TABLE DES FIGURES	7
TABLE DES TABLEAUX	11
ABREVIATIONS.....	13
INTRODUCTION	15
Chapitre 1 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, un pathogène opportuniste inquiétant	17
1. Les infections induites par <i>P. aeruginosa</i>	18
a. Les infections aiguës	19
b. Les infections chroniques.....	20
2. <i>P. aeruginosa</i> , bactérie multi-résistante aux antibiotiques.....	21
a. Résistance de <i>P. aeruginosa</i> aux antibiotiques.....	22
b. Développement de molécules alternatives.....	24
3. Le génome de <i>P. aeruginosa</i> : une espèce, 3 groupes	24
a. Génome « cœur » et génome « accessoire ».....	24
b. Trois groupes au sein d'une même espèce	26
c. Les souches de type PA7, un groupe émergent de <i>P. aeruginosa</i>	28
Chapitre 2 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, un arsenal de facteurs de virulence.....	31
1. Les facteurs de virulence d'adhésion et de motilité.....	32
a. Le flagelle	32
b. Les pili de type 4.....	32
2. Les systèmes de sécrétion de <i>P. aeruginosa</i>	34
a. Les Systèmes de Sécrétion de Type 1, 2, et 6.....	35
i. SST1.....	35
ii. SST2.....	36
iii. SST6.....	36
b. Le Système de Sécrétion de Type 3.....	37
c. Les Systèmes de Sécrétion de Type 5.....	39
i. Autotransporteurs	40
ii. TPS ou SST5b.....	41
d. ExlBA, le nouveau TPS/SST5b de <i>P. aeruginosa</i>	43
i. Le transporteur ExlB	44
ii. L'exolysine ExlA.....	44
iii. Interactions d'ExlBA avec la cellule eucaryote et réponse cellulaire.....	45
3. Autres facteurs de virulence.....	46
Chapitre 3 : La régulation de la virulence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	49
1. Les principales familles de régulateurs de <i>P. aeruginosa</i>	50
a. Les facteurs sigma	50
b. Les facteurs de transcription.....	50
c. Les systèmes de régulation à deux composants	51

d.	Les petits ARN régulateurs	53
2.	Le réseau de régulation de la virulence de <i>P. aeruginosa</i>	53
a.	Le Quorum Sensing	54
b.	Le système Gac/Rsm	55
c.	Les messagers secondaires	58
i.	AMPc.....	58
ii.	di-GMPc	60
d.	Coordination du réseau de régulation de <i>P. aeruginosa</i>	64
Chapitre 4 : La régulation des systèmes TPS.....		67
1.	La régulation des TPS de <i>P. aeruginosa</i>	68
2.	La régulation des TPS d'autres espèces bactériennes	70
Objectifs de la thèse		73
RESULTATS		75
Chapitre 1 : Expression des gènes <i>exlBA</i> : région promotrice et signaux de régulation		77
1.	Contexte génétique d' <i>exlBA</i>	78
2.	Etude de l'expression des gènes <i>exlBA</i>	79
3.	Identification d'un promoteur.....	85
4.	Discussion	88
Chapitre 2 : Régulation d'ExlBA : à la recherche de nouveaux régulateurs		91
1.	Etude ciblée sur l'environnement génétique d' <i>exlBA</i>	92
a.	Les régulateurs de type LysR codés par <i>RS13145</i> et <i>RS13150</i>	92
b.	Le facteur transcriptionnel PhhR.....	93
c.	Discussion et Perspectives	94
2.	Etude ciblée sur deux systèmes de régulation globaux : QS et Gac/Rsm.....	95
a.	Analyse du rôle du Quorum Sensing	95
b.	Etude de l'implication de la voie Gac/Rsm.....	96
c.	Discussion et perspectives	97
Chapitre 3 : Régulation d'ExlBA : L'importance des messagers secondaires.....		99
1.	La voie CyaB-AMPc/Vfr active l'expression d' <i>exlBA</i>	99
a.	Vfr active la transcription d' <i>exlBA in vitro</i>	100
b.	Vfr contrôle la cytotoxicité dépendante d'ExlBA	102
c.	La régulation d' <i>exlBA</i> par Vfr est médiée par l'AMPc et CyaB	103
d.	L'absence de virulence de PA7 est liée à une mutation sur le gène <i>vfr</i>	106
e.	Discussion et Perspectives	108
2.	Le di-GMPc régule la sécrétion d'ExlA	110
a.	IHMA87, une souche produisant beaucoup de di-GMPc	111
b.	Le di-GMPc contrôle la sécrétion d'ExlA	112
c.	Le di-GMPc module la translocation d'ExlA au travers d'ExlB.....	114
d.	ExlA est soit sécrétée soit maintenue à la surface des bactéries.....	116
e.	La forme active d'ExlA est ancrée à la membrane bactérienne.....	117
f.	Discussion et perspectives	118
Chapitre 4 : Etude de l'évolution des souches clonales CLJ par une approche multi-omique		123
a.	Présentation de l'article	124
b.	Conclusion	126
DISCUSSION GENERALE		129
a.	Les premières découvertes dans la régulation d'ExlBA.....	131

b.	Le SST3 et ExlBA, points communs et différences	133
c.	AMPc et di-GMPc, deux activateurs d'ExlBA.....	134
d.	ExlBA, un système de virulence environnemental ?	135
e.	Conclusion	136
MATERIEL ET METHODES		137
Chapitre 1 : Microbiologie et Biologie Moléculaire.....		139
1.	Souches, plasmides et oligonucléotides.....	139
2.	Conditions de culture	147
a.	Conservation des souches.....	147
b.	Conditions générales.....	147
c.	Conditions de tests de l'expression d' <i>exlBA</i>	148
i.	Effet du calcium	148
ii.	Effet du fer	148
iii.	Effet du phosphate	148
3.	Réaction de polymérisation en chaîne	148
4.	Technique de SLIC (<i>Sequence and Ligation-Independent Cloning</i>).....	149
5.	Construction des plasmides.....	150
6.	Transformation par choc thermique d' <i>E. coli</i>	151
7.	Conjugaison de <i>P. aeruginosa</i>	151
8.	Transformation par électroporation de <i>P. aeruginosa</i>	153
9.	RT-qPCR	153
a.	Extraction des ARN.....	153
i.	Extraction au phénol chaud	153
ii.	Extraction avec un kit.....	154
b.	Transcription inverse.....	154
c.	PCR quantitative.....	154
10.	Motilité.....	155
11.	Analyse de la formation de biofilm à l'interface air-liquide.....	155
12.	Dosage de l'activité β -galactosidase	156
13.	Mesure de la fluorescence par cytométrie en flux	156
14.	Mesure de la fluorescence au fluoroskan	157
15.	Marquage immunofluorescent d'ExlA	157
16.	Analyses statistiques	157
Chapitre 2 : Biologie Cellulaire		159
1.	Test de cytotoxicité bactérienne	159
a.	Mesure du relargage de LDH.....	159
b.	Mesure de l'incorporation d'IP	160
Chapitre 3 : Biochimie.....		161
1.	Production et Purification de la protéine His ₆ -Vfr	161
2.	Retard sur gel.....	162
3.	Préparation des échantillons protéiques.....	162
a.	Extraits bactériens totaux	162
b.	Extraits cytosoliques.....	162
c.	Sécrétomes.....	163
4.	Fractionnement cellulaire.....	163
5.	Test d'accessibilité à la protéinase K	164
6.	Séparation des protéines par SDS-PAGE et immunodétection	164
ANNEXES.....		167

1.	Figure et Tableaux	169
	Annexe 1 : Tableau comparatif des principales informations concernant les études référençant les différents groupes de <i>P. aeruginosa</i>	167
	Annexe 2 : Les souches CLJ1 et IHMA87 ont les mêmes niveaux en ARNm ExlB et ExlA.....	167
	Annexe 3 : Liste des 7 protéines susceptibles d'être des effecteurs membranaires du di-GMPc.....	167
2.	Posters	170
	Annexe 4 : Poster présenté à la Journée Annuelle des Doctorants	168
	Annexe 5 : Poster présenté lors du congrès « <i>International Conference on Pseudomonas</i> »	169
3.	Communications Orales	172
	Annexe 6 : Présentation au « GRREMI »	170
	Annexe 7 : Présentation au Séminaire Jeune Chercheur de l'Institut	171
4.	Articles.....	174
	Annexe 8 : Article présentant la régulation d' <i>exlBA</i> par l'AMPc et Vfr, publié en Juin 2018 dans le journal « <i>Journal of Bacteriology</i> ».....	174
	Annexe 9 : Article présentant l'étude de la pathoadaptation des souches CLJ1 et CLJ3, publié en Avril 2019 dans le journal « <i>Microbial Genomics</i> ».....	196
	Annexe 10 : Article concernant l'étude du rôle de la protéine du SST3 Pscl chez <i>P. aeruginosa</i> , publié en Avril 2015 dans le journal « <i>Molecular Microbiology</i> ».....	226
	REFERENCES	251

TABLE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Schématisation des deux modes de vie de P. aeruginosa (d'après Valentini et al., 2018).</i>	19
<i>Figure 2 : Prévalence des principaux sites infectieux pour les infections nosocomiales à P. aeruginosa en France (Enquête Santé Publique France, mai-juin 2017).</i>	20
<i>Figure 3 : Prévalence de la résistance aux antibiotiques d'isolats de P. aeruginosa collectés chez des patients en unité de soins intensifs aux Etats-Unis entre 1993 et 2002 (Lister et al., 2009).</i>	21
<i>Figure 4 : Les 4 grands mécanismes de résistance aux antibiotiques mis en œuvre par les bactéries.</i>	22
<i>Figure 5 : Représentation circulaire du génome « cœur » et du génome « accessoire » de 12 souches de P. aeruginosa (d'après Ozer et al., 2014).</i>	26
<i>Figure 6 : L'espèce P. aeruginosa comprend 3 groupes différents (Freschi et al., 2015).</i>	27
<i>Figure 7 : Différentes architectures sont proposées pour représenter la population au sein de P. aeruginosa.</i>	29
<i>Figure 8 : Le flagelle et le pilus de type 4a.</i>	33
<i>Figure 9 : Les systèmes de sécrétion de P. aeruginosa (Bleves et al., 2010).</i>	34
<i>Figure 10 : Schéma de la translocation de protéines au travers de la membrane interne par la voie de sécrétion Sec (d'après Tsirigotaki et al., 2017).</i>	35
<i>Figure 11 : Organisation génétique du SST3 de P. aeruginosa (d'après Hauser, 2009).</i>	37
<i>Figure 12 : Structure du SST3 de P. aeruginosa (adapté de L. Monlezun).</i>	38
<i>Figure 13 : Les sous-groupes de système de sécrétion de type 5.</i>	39
<i>Figure 14 : Deux modèles sont proposés pour la sécrétion des TpsA.</i>	42
<i>Figure 15 : Le TPS ExlBA (d'après Reboud et al., 2017).</i>	44
<i>Figure 16 : Les effets cytotoxiques d'ExlA différent selon le type cellulaire.</i>	46
<i>Figure 17 : Organisation structurale des partenaires de TCS.</i>	52
<i>Figure 18 : Les 4 systèmes du Quorum Sensing de P. aeruginosa (d'après Lee and Zhang, 2015 ; Papenfort and Bassler, 2016 ; Turkina and Vikström, 2018).</i>	55
<i>Figure 19 : Schématisation de la voie de régulation Gac/Rsm de P. aeruginosa.</i>	56
<i>Figure 20 : Les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle de RsmA décrits chez P. aeruginosa (Vakulskas et al., 2015).</i>	57

<i>Figure 21 : Voie de régulation AMPc/Vfr chez P. aeruginosa.</i>	59
<i>Figure 22 : Homéostasie du di-GMPc chez P. aeruginosa (Ha and O'Toole, 2015).</i>	61
<i>Figure 23 : Schématisation de mécanismes et signaux de régulation de la synthèse de di-GMPc.</i>	62
<i>Figure 24 : Présentation des principales familles caractérisées d'effecteurs du di-GMPc.</i>	62
<i>Figure 25 : Le di-GMPc interagit avec FleQ pour activer la transcription de l'opéron pel (Matsuyama et al., 2016).</i>	63
<i>Figure 26 : Schéma simplifié du réseau global de régulation de la virulence de P. aeruginosa.</i>	64
<i>Figure 27 : Voies de régulation des TPS CdrAB et PdtAB de P. aeruginosa.</i>	69
<i>Figure 28 : Voies de régulation des TPS ShlBA de S. marcescens et EthBA de E. tarda.</i>	72
<i>Figure 29 : Représentation de la région chromosomique d'exlBA.</i>	79
<i>Figure 30 : L'expression d'exlBA est faible en milieu riche LB.</i>	80
<i>Figure 31 : Les promoteurs des gènes amont d'exlBA n'influent pas sur la cytotoxicité ExlBA-dépendante dans ces conditions d'infection.</i>	82
<i>Figure 32 : La fusion prom2_exlBA-gfp ne montre pas d'hétérogénéité d'expression.</i>	83
<i>Figure 33 : Activité promotrice d'exlBA en fonction des conditions de croissance.</i>	84
<i>Figure 34 : Identification du promoteur d'exlBA.</i>	87
<i>Figure 35 : Les protéines de type LysR RS13145 et RS13150 et PhhR ne sont pas impliquées dans l'activation d'ExlBA, dans les conditions d'étude.</i>	93
<i>Figure 36 : Le Quorum Sensing ne régule pas ExlBA.</i>	96
<i>Figure 37 : RsmA active la synthèse d'ExlBA et de Vfr.</i>	97
<i>Figure 38 : Un site putatif de liaison de Vfr a été identifié en amont des boîtes promotrices d'exlBA.</i>	100
<i>Figure 39 : Vfr contrôle l'expression d'exlBA.</i>	101
<i>Figure 40 : Vfr se lie directement au promoteur d'exlBA, en présence d'AMPc.</i>	102
<i>Figure 41 : Vfr contrôle la synthèse d'ExlBA et du pilus de type 4 in vivo.</i>	103
<i>Figure 42 : CyaB est l'adénylate cyclase nécessaire à l'activation d'exlBA par Vfr, in vitro et in vivo.</i>	105
<i>Figure 43 : Une mutation sur le gène vfr impacte la virulence de PA7.</i>	106
<i>Figure 44 : Analyse de la synthèse de Vfr chez différentes souches de type PA7.</i>	107
<i>Figure 45 : Schéma de la régulation de l'expression d'exlBA par la voie AMPc/Vfr.</i>	108
<i>Figure 46 : IHMA87 produit plus de di-GMPc que PAO1.</i>	112

<i>Figure 47 : Le di-GMPc affecte la sécrétion d'ExlA.</i>	<i>113</i>
<i>Figure 48 : Le di-GMPc bloquerait ExlA au niveau de la membrane externe.....</i>	<i>115</i>
<i>Figure 49 : Visualisation d'ExlA par immunofluorescence au microscope.....</i>	<i>117</i>
<i>Figure 50 : A faible MOI, la modulation du niveau intracellulaire en di-GMPc impacte la cytotoxicité d'IHMA87.</i>	<i>118</i>
<i>Figure 51 : Modèle possible de régulation de la sécrétion d'ExlA par le di-GMPc.</i>	<i>119</i>
<i>Figure 52 : Chronologie de l'hospitalisation du patient « CLJ » et du prélèvement des souches CLJ1 et CLJ3.....</i>	<i>124</i>
<i>Figure 53 : Evolution chez l'hôte des souches clonales CLJ1 et CLJ3 (Sentausa et al., en révision).</i>	<i>126</i>
<i>Figure 54 : Représentation des signaux et voies de régulation d'ExlBA identifiés chez IHMA87 au cours de ce travail.....</i>	<i>132</i>
<i>Figure 55 : Antagonisme entre l'AMPc et le di-GMPc chez PAO1 et IHMA87.....</i>	<i>135</i>
<i>Figure 56 : Présentation des deux techniques utilisées pour la construction de plasmides.</i>	<i>149</i>
<i>Figure 57 : Principe de la conjugaison bactérienne.....</i>	<i>151</i>
<i>Figure 58 : Détermination de l'aire sous la courbe.</i>	<i>160</i>

TABLE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Comparaison des principales caractéristiques des souches de référence des 3 groupes de P. aeruginosa.....</i>	<i>28</i>
<i>Tableau 2 : Six TPS ont été identifiés chez P. aeruginosa.....</i>	<i>43</i>
<i>Tableau 3 : Liste des souches bactériennes utilisées dans cette étude.</i>	<i>139</i>
<i>Tableau 4 : Liste des plasmides construits et utilisés dans cette étude.....</i>	<i>142</i>
<i>Tableau 5 : Liste des oligonucléotides utilisés dans cette étude.....</i>	<i>145</i>
<i>Tableau 6 : Composition des SDS-PAGE 8 et 15% utilisés au cours de cette étude.</i>	<i>165</i>
<i>Tableau 7 : Liste des anticorps utilisés dans cette étude.....</i>	<i>165</i>

ABRÉVIATIONS

Ac	Anticorps
ADN(c)	Acide DéoxyriboNucléique (complémentaire)
AI	Autoinducteurs
ARNm/r/t	Acide RiboNucléique messenger/ribosomal/de transfert
Ca ²⁺	Ion calcique
CDI	<i>Contact Dependent growth Inhibition</i>
Cq	Cycle de quantification
CRP	<i>cAMP Receptor Protein</i>
CSS	<i>Cell Surface Signaling</i>
DO	Densité Optique
DOC	Déoxycholate de sodium
dNTP	Déoxyribonucléotide-triphosphate
Fe ³⁺	Ion ferrique
FT	Facteur de transcription
FRT	<i>Flp Recombinase Target</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HK	Histidine Kinase
IS	<i>Insertion Sequence</i>
K ⁺	Ion potassique
LDH	Lactate Déshydrogénase
MDR	<i>MultiDrug-Resistant</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pb	Paire de base
Pi	Phosphate inorganique
POTRA	<i>Periplamic POlypeptide TRansport-Associated</i>
(p)ppGpp	Guanosine penta ou tétraphosphate
RACE-PCR	<i>Rapid Amplification of cDNA-Ends by PCR</i>
RBS	<i>Ribosome Binding Site</i>
RGP	<i>Region of Genome Plasticity</i>
RR	Régulateur de Réponse
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription - quantitative PCR</i>
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SRP	<i>Signal Recognition Particule</i>
SST	Système de Sécrétion de Type
T4P	<i>Type 4 pili</i>
TCA	Acide trichloroacétique
TCS	<i>Two component system</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TPS	<i>Two partner system</i>
TSS	<i>Transcription Start Site</i>
UA	Unités Arbitraires
UM	Unités de Miller
UTR	<i>Untranslated Transcribed Region</i>
VBM	<i>Vfr Binding Mutated</i>
WT	<i>Wild-Type</i>
XDR	<i>eXtensively Drug-Resistant</i>

INTRODUCTION

Chapitre 1

Pseudomonas aeruginosa, un pathogène opportuniste inquiétant

Isolée pour la première fois en 1882 par le pharmacien Carles Gessard à partir d'une blessure infectée, *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie à gram négatif appartenant à la famille des *Pseudomonadaceae*. Elle a longtemps été dénommée « bacille pyocyanique » du fait de sa capacité à produire un pigment coloré, la pyocyanine, qui donne aux blessures infectées une couleur bleu-vert très caractéristique (Lyczak *et al.*, 2000). *P. aeruginosa* est une bactérie ubiquitaire, retrouvée principalement dans des environnements humides tels que les sols ou les étendues d'eau. Ses capacités d'adaptation lui permettent également d'envahir différents hôtes, tels que des végétaux, animaux, insectes, humains, etc. Chez l'Homme, *P. aeruginosa* peut notamment être présente dans la flore intestinale de porteurs sains (Stoodle and Thom, 1970; Valenza *et al.*, 2015).

1. Les infections induites par *P. aeruginosa*

Le siècle précédent a vu l'émergence de *P. aeruginosa* comme un pathogène opportuniste majeur de l'homme. Ainsi, alors qu'un hôte dont les défenses fonctionnent normalement sera tout à fait capable de prévenir une infection à *P. aeruginosa*, cette bactérie peut se transformer en agent pathogène mortel pour les personnes ayant une défaillance défensive. Les personnes immunodéprimées ou qui présentent une rupture de la barrière cutanée (grands brûlés, présence d'une plaie chirurgicale ou d'un dispositif médical invasif tels un cathéter, une sonde, etc.) sont ainsi les cibles majoritaires de ce pathogène.

Il existe deux types d'infections à *P. aeruginosa*, les infections aiguës et les infections chroniques, associées de façon schématisée à deux modes de vie de la bactérie, vie planctonique et vie sessile (Valentini *et al.*, 2018 ; Fig. 1). Ces deux modes de vie sont coordonnés grâce à un réseau complexe de régulation qui permet l'adaptation des bactéries à leur environnement (Coggan and Wolfgang, 2012 ; Introduction/Chapitre 3.2).

Les infections aiguës sont généralement provoquées par des bactéries planctoniques. Dans cet état, elles se déplacent dans leur environnement de façon isolée grâce à deux appendices extracellulaires : le flagelle et les pili de type 4 (Fig. 1 ; Introduction/Chapitre 2.1). Au cours de ce mode de vie mobile, *P. aeruginosa* met en place des systèmes de défense contre son hôte ou d'autres prédateurs environnementaux, tels que les systèmes de sécrétion de type 2 et de type 3 (SST2 et SST3) qui permettent respectivement de sécréter des enzymes dégradatives et d'injecter des toxines dans une cellule cible dans le but de la détruire (Introduction/Chapitre 2.2). Pour adopter un mode de vie sessile, les bactéries vont adhérer à une surface, notamment grâce aux pili de type 4, progressivement perdre leur mobilité pour former des agrégats cellulaires (aussi appelés microcolonies) et sécréter des substances polymériques extracellulaires (Fig. 1 ; Moradali *et al.*, 2017). La structure ainsi formée est appelée « biofilm » et permet aux bactéries de se protéger contre les attaques et autres stress du milieu environnant (antimicrobiens, systèmes immunitaires de l'hôte, etc. ; Mulcahy *et al.*, 2014). Les biofilms sont constitués à plus de 90% d'une matrice composée de polysaccharides, de protéines, d'ADN extracellulaire et de lipides (Flemming and Wingender, 2010). Sous sa forme sessile, *P. aeruginosa* adopte un phénotype beaucoup moins agressif en cessant de produire les facteurs associés à sa toxicité aiguë et provoque alors généralement des infections chroniques.

D'un point de vue physiologique, les deux modes de vie de *P. aeruginosa* ne sont pas exclusifs au cours de l'infection : des bactéries planctoniques qui ont colonisé un hôte peuvent, pour échapper à divers stress ou à la détection par le système immunitaire de l'hôte, se développer sous forme de biofilm. En effet, les bactéries sessiles expriment moins de facteurs immunogènes que les bactéries planctoniques et sont donc moins vulnérables aux défenses de l'hôte. Ces mêmes

bactéries pourront plus tard à nouveau se déplacer sous forme planctonique pour envahir un nouvel environnement.

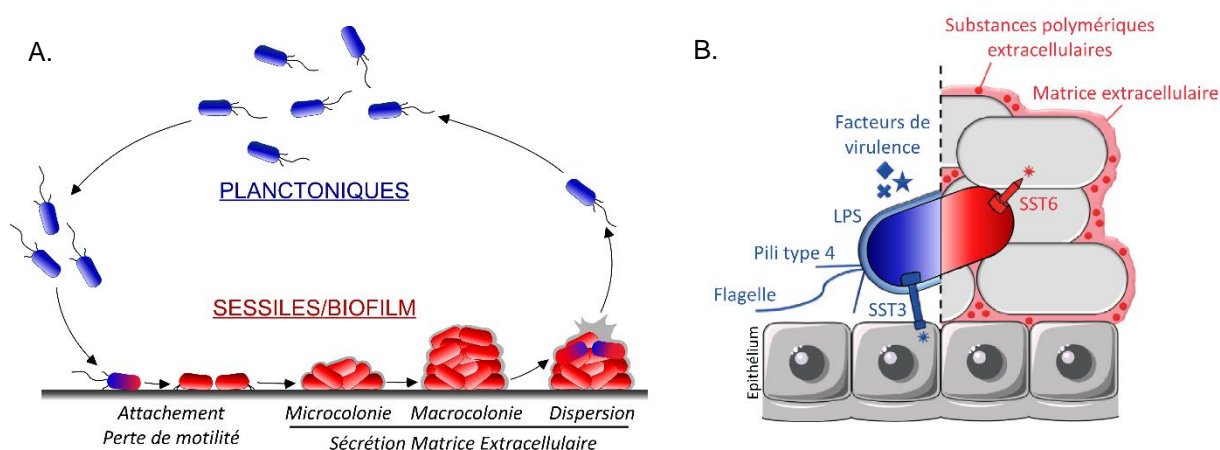


Figure 1 : Schématisation des deux modes de vie de *P. aeruginosa* (d'après Valentini *et al.*, 2018).

- A) Illustration de la vie planctonique et de la vie sessile avec formation de biofilm.
 B) Représentation des principales caractéristiques bactériennes en fonction du mode de vie bactérien. Le phénotype virulent des bactéries planctoniques (bleu) sera associé aux infections aiguës et le caractère persistant des bactéries sessiles en biofilm (rouge) sera lié aux infections chroniques.

a. Les infections aiguës

Les infections aiguës sont caractérisées par une apparition brève, une évolution rapide, des symptômes généralement sévères et une mortalité importante. Au cours d'une infection aiguë, les facteurs de virulence et appendices de surface produits par *P. aeruginosa* induisent une réponse inflammatoire de l'hôte intense et une destruction tissulaire importante. Son tropisme pour les milieux humides fait que ce micro-organisme peut être associé à des infections oculaires (kératites, généralement en lien avec le port de lentilles de contact ; Lakhundi *et al.*, 2017) et auriculaires (otites externes, notamment chez les nageurs ; Schaefer and Baugh, 2012). Cependant, les principales infections aiguës associées à *P. aeruginosa* sont des infections d'origine nosocomiale : *P. aeruginosa* est le 4^e pathogène responsable du développement de maladies nosocomiales après *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*. Ses principaux sites infectieux dans ce contexte sont les poumons et le tractus urinaire (Fig. 2 ; Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, Santé Publique France, 2017; Mittal *et al.*, 2009; Rodrigo-Troyano and Sibila, 2017). 18 à 25% des pneumonies associées à la ventilation, qui présentent un taux de mortalité particulièrement élevé de 25-32%, sont dues à *P. aeruginosa* (Karakuzu *et al.*, 2018; Llitjos *et al.*, 2018; Venkataraman *et al.*, 2018).

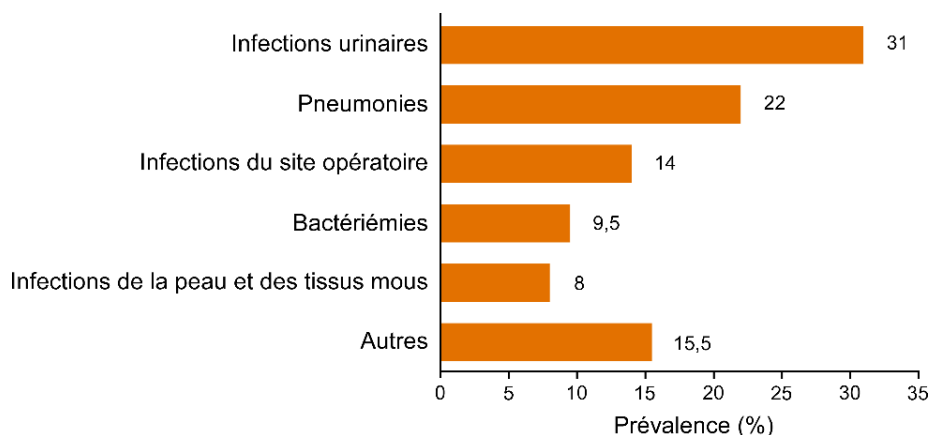


Figure 2 : Prévalence des principaux sites infectieux pour les infections nosocomiales à *P. aeruginosa* en France (Enquête Santé Publique France, mai-juin 2017).

Etude menée sur une cohorte de 80 988 patients, dans 403 établissements de santé français.

b. Les infections chroniques

Lorsqu'elles ne sont pas éradiquées pendant la phase de colonisation, les bactéries peuvent s'adapter à l'environnement et induire une infection chronique. Cette présence induit une inflammation persistante chez l'hôte et peut être à l'origine d'une destruction progressive des tissus. Les infections chroniques à *P. aeruginosa* sont fréquentes chez les personnes ayant des problèmes respiratoires chroniques, comme les bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO) et les bronchectasies, mais surtout chez les patients atteints de mucoviscidose (Gellatly and Hancock, 2013; Mulcahy *et al.*, 2014).

La mucoviscidose, ou fibrose kystique, est une maladie récessive autosomale qui est due à différentes mutations du gène *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), codant pour un canal chlorure. Le dysfonctionnement des canaux CFTR se traduit par une augmentation de la viscosité du mucus, une déficience en clairance muco-ciliaire ainsi qu'une altération de l'immunité innée (Elborn, 2016). L'obstruction des voies aériennes inférieures et les défenses immunitaires affaiblies qui en résultent prédisposent les patients à la colonisation par différents pathogènes, entraînant des infections respiratoires à répétition. *P. aeruginosa* représente le principal pathogène contribuant à la morbidité et la mortalité associées à cette maladie. En effet, 60 à 70% des patients adultes atteints de mucoviscidose sont infectés par *P. aeruginosa* au niveau du tractus respiratoire (Folkesson *et al.*, 2012; Salsgiver *et al.*, 2016). Au cours de cette occupation chronique, *P. aeruginosa* subit une évolution génétique et phénotypique lui permettant de s'adapter à ce nouvel environnement, en régulant l'expression de certains gènes et en accumulant des mutations chromosomiques (Folkesson *et al.*, 2012; Cullen and McClean, 2015; Rossi *et al.*, 2018). Cette pathoadaptation au cours de l'infection permet notamment l'accoutumance des bactéries aux stress subis dans les voies respiratoires des patients et à la restriction en micronutriments (Rossi *et al.*, 2018). Des mutations dans le gène codant pour le régulateur transcriptionnel LasR sont fréquemment retrouvées et permettent entre autres de

diminuer la virulence des bactéries (Folkesson *et al.*, 2012; Winstanley *et al.*, 2016 ; [Introduction/Chapitre 3.2](#)). Les mutations qui inactivent le facteur anti-sigma MucA sont également communes et induisent une surproduction des alginate responsable du phénotype « mucoïde » de ces souches et considérée comme un marqueur de l'établissement d'une infection chronique (Folkesson *et al.*, 2012; Winstanley *et al.*, 2016). Finalement, de nombreuses mutations sont identifiées au niveau des gènes intervenant dans la résistance aux antibiotiques, conduisant par exemple à la perte de fonction de MexZ (répresseur de la pompe à efflux MexXY-OprM ; (Marvig *et al.*, 2015). En conséquence de cette pathoadaptation, *P. aeruginosa* persiste dans les poumons des patients en dépit de la réponse inflammatoire ou des thérapies antimicrobiennes mises en place. Ceci provoque une dégradation de la fonction respiratoire, qui peut mener au décès des patients en absence de transplantation pulmonaire.

2. *P. aeruginosa*, bactérie multi-résistante aux antibiotiques

Durant les dernières décennies, l'utilisation intempestive et mal ciblée des antibiotiques ou désinfectants pour lutter contre les bactéries a entraîné l'émergence de micro-organismes multi-résistants (MDR, *multidrug-resistant*) ou extrêmement résistants (XDR, *extensively drug-resistant*), possédant de nombreux mécanismes leur permettant de résister à ces antimicrobiens. Cela a notamment été observé pour la bactérie *P. aeruginosa* (Fig. 3).

Selon les centres de prévention et de contrôle des maladies européens et américains, au sein de cette espèce bactérienne, les bactéries dites MDR sont résistantes à au moins un agent antimicrobien d'au moins trois des huit catégories suivantes : aminoglycosides, carbapénèmes, céphalosporines, fluoroquinolones, pénicillines, monobactames, acides phosphoniques et polymyxines. Le terme « extrêmement résistante » définit quant à lui les bactéries résistantes à au moins un agent antimicrobien des six ou sept catégories citées précédemment (Magiorakos *et al.*, 2012).

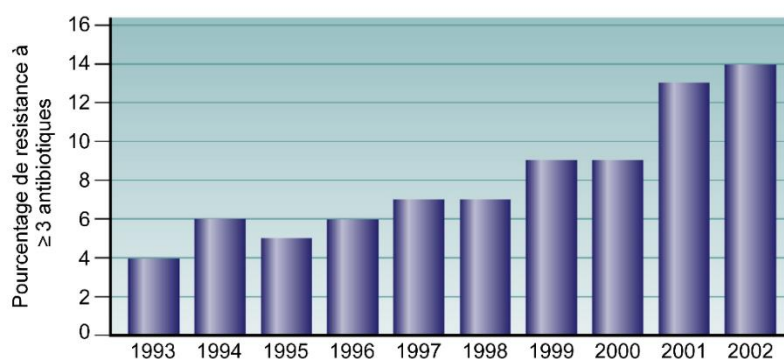


Figure 3 : Prévalence de la résistance aux antibiotiques d'isolats de *P. aeruginosa* collectés chez des patients en unité de soins intensifs aux Etats-Unis entre 1993 et 2002 (Lister *et al.*, 2009).

En 2017, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a classé *P. aeruginosa* comme étant l'une des menaces les plus critiques pour la santé humaine, parmi une liste de 12 familles bactériennes, du fait de sa multi-résistance aux antibiotiques (*Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria*, Organisation Mondiale de la Santé, 2017). Effectivement, près de 14% des isolats de *P. aeruginosa* étaient classés MDR en 2015 (*Antimicrobial resistance surveillance in Europe*, European Centre for Disease Prevention and Control, 2015).

a. Résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques

Différents mécanismes sont mis en place par les bactéries afin de subsister aux traitements antibiotiques, dont les principaux sont : les pompes à efflux, la faible perméabilité membranaire, la modification de la cible des antibiotiques et les enzymes inactivant ces molécules (Fig. 4). La production de biofilm par *P. aeruginosa* participe également de manière non négligeable à la résistance aux antimicrobiens, en réduisant notamment leur diffusion jusqu'aux bactéries (Azam and Khan, 2019). De plus, les bactéries au cœur d'un biofilm sont métaboliquement moins actives et se développent plus lentement qu'en périphérie. Elles sont donc moins sensibles à l'action des antibiotiques qui ciblent les bactéries en croissance (β -lactames et aminoglycosides).

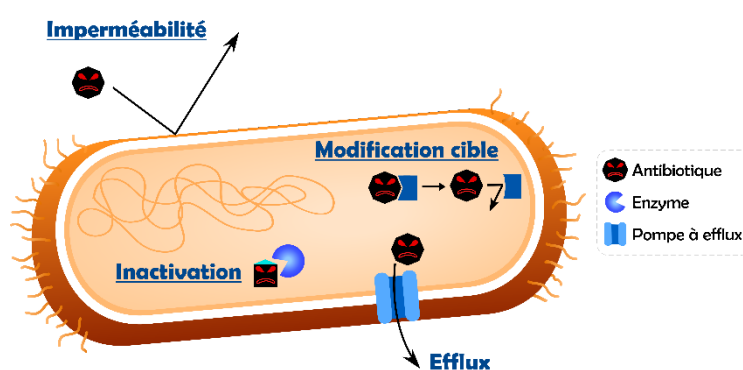


Figure 4 : Les 4 grands mécanismes de résistance aux antibiotiques mis en œuvre par les bactéries.

Les mécanismes de multi-résistances aux antibiotiques développés par *P. aeruginosa* sont différenciés en deux groupes et peuvent être intrinsèques ou acquis (Azam and Khan, 2019).

Les résistances intrinsèques correspondent aux aptitudes inhérentes d'un micro-organisme à résister à un ou plusieurs antibiotiques. La première résistance intrinsèque de *P. aeruginosa* est sa faible perméabilité membranaire qui limite la pénétration des antimicrobiens dans les bactéries. Ses principales porines présentes dans la membrane externe (OprF et OprD) ont en effet un diamètre étroit (Chevalier *et al.*, 2017). Les pompes à efflux MexAB-OprM et MexXY-OprM sont constitutivement produites et permettent d'exporter un spectre large d'antibiotiques (Lister *et al.*, 2009; Azam and Khan, 2019). Enfin, *P. aeruginosa* produit de façon

intrinsèque des enzymes qui inactivent les antibiotiques par altération chimique ou destruction complète, telles les β -lactamases AmpC et PoxB qui hydrolysent les β -lactamines (Lister *et al.*, 2009; Azam and Khan, 2019).

Suite à une certaine pression antibiotique, notamment en milieu hospitalier, *P. aeruginosa* peut acquérir de nouveaux mécanismes qui renforcent ses résistances intrinsèques. Il s'agit des résistances acquises, qui peuvent résulter d'un transfert de gène horizontal ou de l'apparition de mutations chromosomiques au cours de la pathoadaptation bactérienne. L'une des résistances acquises de *P. aeruginosa* est la surexpression des gènes codant pour les pompes à efflux (Breidenstein *et al.*, 2011). Par exemple, la souche de référence PA7 reflue les aminoglycosides et les fluoroquinolones grâce à la surproduction de la pompe à efflux MexEF-OprN, résultant de la mutation d'un acide aminé du régulateur MexS (Morita *et al.*, 2015). Les résistances acquises de *P. aeruginosa* concernent également l'altération enzymatique des antibiotiques (Breidenstein *et al.*, 2011; López-Causapé *et al.*, 2018). La β -lactamase AmpC peut, par exemple, être surproduite suite à une mutation du régulateur transcriptionnel AmpR. Certains plasmides acquis par transfert horizontal permettent aussi la synthèse de nouvelles β -lactamases. Ensuite, la perméabilité de la membrane externe peut être modulée pour réduire l'absorption de certains antibiotiques. De nombreuses mutations du gène *oprD* ont par exemple été décrites et permettent d'inhiber la synthèse de la porine connue pour être le canal d'entrée favori des carbapénèmes (Lister *et al.*, 2009; Ruiz-Martínez *et al.*, 2011; Cabot *et al.*, 2016). L'intégration d'une séquence d'insertion dans *oprD* peut également être à l'origine de résistance aux antibiotiques, comme cela a été démontré lors de l'étude de la souche CLJ3 (Résultats/Chapitre 4). Finalement, l'altération des cibles des antibiotiques est aussi un mécanisme de résistance acquise décrit chez *P. aeruginosa* (Breidenstein *et al.*, 2011; López-Causapé *et al.*, 2018; Azam and Khan, 2019). La mutation chromosomique des gènes codant pour les gyrases GyrA et GyrB ou les topoisomérases IV ParC et ParE est fréquente chez cette espèce bactérienne et induit la résistance aux fluoroquinolones (Azam and Khan, 2019; Jalal and Wretlind, 1998).

Les bactéries persistantes (*persistor cells*) jouent également un rôle important dans les phénomènes de résistance aux antibiotiques et de persistance des infections chroniques. Il s'agit d'une sous-population de bactéries transitoirement quiescentes qui ne sont pas affectées par les antibiotiques et qui sont capables d'engendrer une nouvelle population dès lors que le stress antimicrobien est levé (Fisher *et al.*, 2017). Des bactéries persistantes *P. aeruginosa* sont par exemple responsables des infections pulmonaires chroniques à répétition chez les patients atteints de mucoviscidose (Mulcahy *et al.*, 2010).

b. Développement de molécules alternatives

De nos jours, les cliniciens font face à une restriction sévère des options pour le traitement des infections dues à *P. aeruginosa*. La recherche de nouvelles molécules pour lutter contre cette bactérie est donc d'une importance cruciale, comme l'indiquait l'OMS en 2017 (*Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria*, Organisation Mondiale de la Santé, 2017). Les stratégies alternatives qui se développent dorénavant consistent à interférer avec les éléments qui permettent la persistance ou la toxicité de *P. aeruginosa* et ciblent donc généralement les facteurs de virulence de la bactérie ou les régulateurs qui contrôlent leur synthèse (Smith *et al.*, 2017). Contrairement aux antibiotiques actuels, ces molécules ne ciblent pas directement la viabilité bactérienne et le risque de pression de sélection entraînant l'acquisition de résistance devrait donc être fortement amoindri.

3. Le génome de *P. aeruginosa* : une espèce, 3 groupes

Le premier génome de *P. aeruginosa* à avoir été séquencé est celui de la souche PAO1 en 2000 (Stover *et al.*, 2000). A l'origine isolée à partir d'une plaie, PAO1 est l'une des souches de *P. aeruginosa* les plus étudiées en laboratoire. Son génome est constitué de 6,26 Mpb et contient 5700 gènes prédits (source : *Pseudomonas* Genome Database en février 2019 ; www.pseudomonas.com ; Winsor *et al.*, 2016). Depuis, de nombreux génomes de souches de *P. aeruginosa* ont été séquencés et sont référencés sur la base de données dédiée "*Pseudomonas* Genome Database" (2226 génomes référencés en février 2019). La taille de ces génomes varie de 5,5 à 7 Mpb et ils sont caractérisés par un pourcentage élevé en bases GC (environ 66,5% contre 50,8% pour *E. coli* – NCBI/Genome). *P. aeruginosa* possède ainsi l'un des plus grands génomes au sein des bactéries à gram négatif.

a. Génome « cœur » et génome « accessoire »

Les analyses génomiques comparatives ont révélé que le génome de *P. aeruginosa* est une mosaïque constituée de séquences génomiques conservées intercalées de matériel génétique accessoire (Fig. 5). Des études récentes, basées sur l'analyse d'une vingtaine de souches, ont proposé que le pangénome de *P. aeruginosa* comprenne environ 10800 gènes, qui correspondent à la totalité des gènes identifiés au sein de l'espèce (y compris les gènes présents seulement chez une seule souche ; Hilker *et al.*, 2015; Valot *et al.*, 2015; Subedi *et al.*, 2018). Environ 4800 d'entre eux seraient conservés sur le génome de plus de 99% des souches de cette espèce et formeraient ainsi le génome « cœur » de *P. aeruginosa*. A l'inverse, le génome dit « accessoire » comprendrait

tous les autres gènes, qui ne sont donc pas présents dans toutes les souches de *P. aeruginosa*. Le génome de chaque souche de *P. aeruginosa* contiendrait en moyenne 12 à 26% de gènes « accessoires » (Valot *et al.*, 2015; Subedi *et al.*, 2018).

Cependant, avec le développement des technologies de séquençage, un nombre croissant de génomes de *P. aeruginosa* devient accessible. Et de façon très intéressante, plus les études des génomes de *P. aeruginosa* incorporent des cohortes importantes de souches, plus la taille du pangénome augmente et, à l'inverse, plus celle du génome « cœur » diminue. Ainsi, une étude publiée en janvier 2019 et basée sur une cohorte de 1311 génomes révèle que le pangénome de *P. aeruginosa* comprend 54272 gènes, dont un tiers codent pour des protéines à fonction inconnue et seulement 665 sont présents sur le génome « cœur » (Freschi *et al.*, 2019). Cela met en évidence une proportion d'éléments accessoires sur le génome des souches beaucoup plus importante que ce qu'indiquaient les études précédentes. Freschi *et al.* ont également montré que 18% des gènes du pangénome sont d'origines plasmidiques.

Le génome « cœur » code pour des fonctions qui sont communes à toutes les souches de *P. aeruginosa* quelle que soit leur origine, telles que le métabolisme et la pathogénicité (Valot *et al.*, 2015; Freschi *et al.*, 2019). Les gènes participant aux fonctions de transcription et de synthèse protéique y sont également enrichis.

Le génome « accessoire » est constitué des plasmides ainsi que des régions génomiques réparties en différentes localisations dans le génome « cœur » et qui constituent des régions de plasticité génomique (*region of genomic plasticity*, RGP ; répertoriés et numérotés en fonction de l'ordre d'identification) aussi appelées îlots génomiques (Klockgether *et al.*, 2011). Il comprend beaucoup de gènes codant pour des protéines dont la fonction est non identifiée mais est également enrichi en gènes impliqués dans le métabolisme ou codant pour des enzymes en lien avec la mobilité de l'ADN (Valot *et al.*, 2015; Subedi *et al.*, 2018; Freschi *et al.*, 2019). La majorité du génome « accessoire » provient d'éléments ADN mobiles, qui ont souvent été acquis par transfert horizontal, intégrés à proximité de loci génomiques spécifiques (généralement des gènes codant pour les ARNt) puis conservés par la bactérie (Kung *et al.*, 2010). Ainsi, les principaux éléments formant le génome « accessoire » sont :

- Des éléments intégratifs et conjugatifs (*integrative and conjugative elements*, ICE).
- Des « îlots de remplacement » (*replacement islands*), qui existent au nombre de 4 chez *P. aeruginosa* : RGP9 (comprenant les gènes impliqués dans la glycosylation du flagelle), RGP31 (biosynthèse de l'antigène O du lipopolysaccharide (LPS)), RGP60 (constitué du locus *pilA*) et RGP73 (biosynthèse de la pyoverdine) ([Introduction/Chapitre 2](#)). Ces éléments forment des loci présents chez toutes les souches mais possédant une forte variabilité de séquence.
- Des prophages : il s'agit d'ADN de phages intégrés sur le chromosome bactérien par recombinaison au niveau d'un site spécifique. Tous ne sont pas complets et fonctionnels.

- Des éléments transposables de type transposons, séquences d'insertion (*insertion sequences*, IS) ou intégrons. Les IS sont des éléments courts qui, généralement, codent uniquement pour les éléments nécessaires à leur translocation. Les transposons sont plus grands et permettent en plus l'expression d'éléments fonctionnels pour la bactérie. Les intégrons sont des loci génétiques exogènes qui n'ont pas de capacité mobile et sont donc généralement transportés par le biais de plasmides conjugatifs ou de transposons. Ils apportent souvent des résistances aux antibiotiques.

Le grand nombre de gènes présents sur le génome de *P. aeruginosa* et l'aptitude de cette bactérie à personnaliser son génome grâce aux mécanismes de réarrangements génétiques lui confèrent une capacité d'adaptation importante et une certaine versatilité pour survivre dans divers environnements.

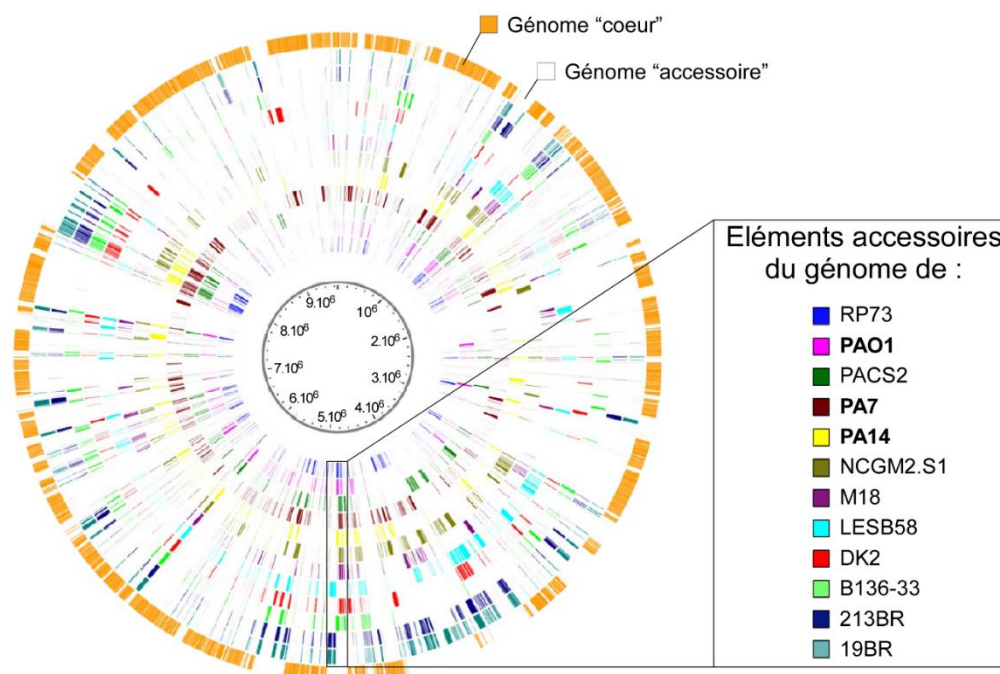


Figure 5 : Représentation circulaire du génome « cœur » et du génome « accessoire » de 12 souches de *P. aeruginosa* (d'après Ozer *et al.*, 2014).

L'anneau orange externe représente la distribution des éléments du génome « cœur ». Les autres anneaux colorés indiquent les éléments génomiques accessoires de chacune des souches indiquées dans l'encadré (cercle intérieur vers cercle extérieur).

b. Trois groupes au sein d'une même espèce

Le séquençage du génome de plusieurs centaines d'isolats de *P. aeruginosa* a démontré une grande diversité génomique de la population. Des analyses phylogénétiques basées sur les polymorphismes mononucléotidiques (*single nucleotide polymorphisms*, SNP) des génomes « cœurs » de *P. aeruginosa* ont en effet permis de diviser la structure de cette population en trois

principaux groupes (Fig. 6 ; Tableau 1 ; Stewart *et al.*, 2014; Freschi *et al.*, 2015; Vincent *et al.*, 2017 ; Annexe 1).

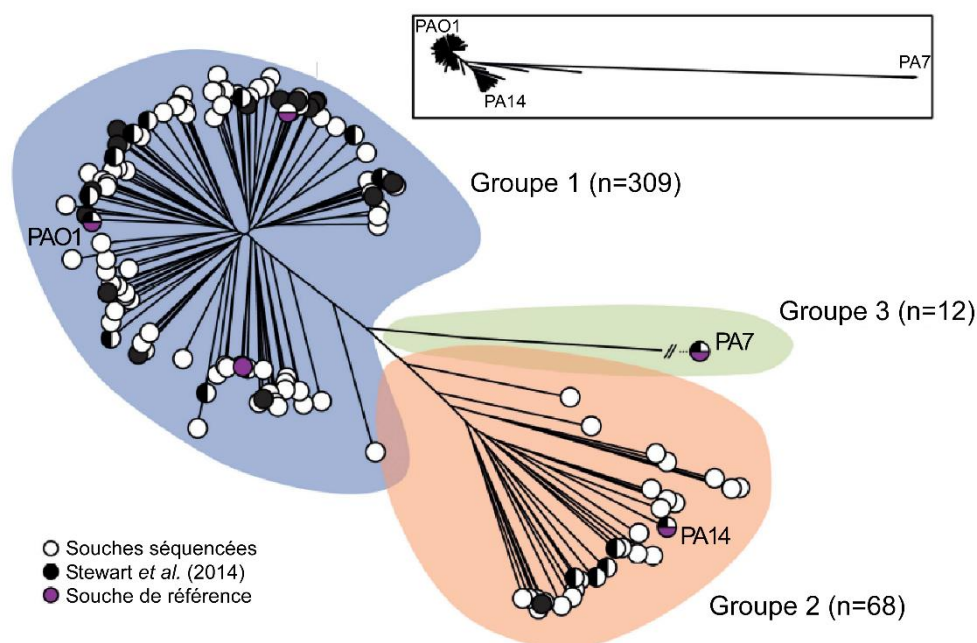


Figure 6 : L'espèce *P. aeruginosa* comprend 3 groupes différents (Freschi *et al.*, 2015).

Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des SNP des génomes « cœurs » de 389 souches de *P. aeruginosa*. L'encadré montre l'apparence réelle de l'arbre.

Le premier groupe contient le plus grand nombre de souches et est représenté par PAO1. Le groupe 2 rassemble les souches pour lesquelles la référence est PA14, la deuxième souche de *P. aeruginosa* dont le génome a été séquencé (Lee *et al.*, 2006). Il possède 6,54 Mpb et est remarquablement similaire à celui de PAO1. En effet, 95,8% du génome de PAO1 est présent chez PA14. Cependant, alors que PAO1 et les souches appartenant au groupe 1 produisent ExoS comme toxine la plus agressive, les souches du groupe 2, PA14 comprise, sécrètent la toxine ExoU (Introduction/Chapitre 2.2.b). Enfin, des éléments génétiques « accessoires » seraient également spécifiques à chacun des deux groupes (Freschi *et al.*, 2018). Finalement, le 3^e groupe, le plus divergent, est peuplé de clones dont la référence est la souche PA7 (Roy *et al.*, 2010). Il s'agit d'un isolat humain non respiratoire et multi-résistant aux antibiotiques, caractérisé par une grande divergence phylogénétique avec les souches des autres groupes de *P. aeruginosa* (Fig. 6). En effet, alors que l'identité de séquence du génome « cœur » entre les souches des groupes 1 et 2 est supérieure à 99,5% (Spencer *et al.*, 2003), PA7 ne partage que 93,5% d'identité avec les souches références PAO1 et PA14 (Roy *et al.*, 2010). L'étude du génome de PA7 a également révélé d'autres différences avec les génomes de ces souches, dont l'absence caractéristique des gènes codant pour la machinerie et les exotoxines du SST3 (Introduction/Chapitre 2.2.b). Ce système étant le principal facteur de virulence associé aux infections sévères à *P. aeruginosa*, son absence est particulièrement marquante. Le gène codant pour la toxine ToxA est également absent du génome

de PA7 (Introduction/Chapitre 2.2.a). Inversement, cette souche dispose de nouveaux facteurs de virulence, comme le SST2 Txc (*Third Xcp homolog*) codé par l'îlot RGP69 du génome « accessoire » et le système ExlBA (Cadoret *et al.*, 2014; Elsen *et al.*, 2014 ; Introduction/Chapitre 2.2). Enfin, la protéine OprA, canal de la pompe à efflux MexXY-OprA, est spécifique des souches de type PA7 et favorise une résistance aux aminoglycosides (Morita *et al.*, 2012). Malgré cette grande divergence génétique, la séquence des gènes codant pour les ARNr et ceux impliqués dans la synthèse protéique de PA7 permettent de confirmer que cette souche appartient à l'espèce *aeruginosa* (Roy *et al.*, 2010). Une analyse du score de similarité génomique de souches appartenant au genre *Pseudomonas* a également démontré l'appartenance de PA7 à cette espèce (Grosso-Becerra *et al.*, 2014).

	PA01	PA14	PA7
Taille du génome	6 264 404 pb	6 537 648 pb	6 588 339 pb
Nombre de gènes annotés	5700	5977	6369
GC%	66,6%	66,3%	66,4%
Toxine du SST3	ExoS, ExoT, ExoY	ExoU, ExoT, ExoY	Absence SST3
Virulence (cellules épithéliales)	++	+	-

Tableau 1 : Comparaison des principales caractéristiques des souches de référence des 3 groupes de *P. aeruginosa*.

Pseudomonas Genome Database ; Stover *et al.*, 2000 ; Lee *et al.*, 2006 ; Roy *et al.*, 2010.

c. Les souches de type PA7, un groupe émergent de *P. aeruginosa*

L'équipe PBRC a décidé de caractériser les souches de type PA7, très peu étudiées à l'époque, suite à l'identification du facteur de virulence ExlBA chez la souche hypervirulente CLJ1 qui appartenait au groupe 3 (Elsen *et al.*, 2014). Un ensemble de souches de type PA7 d'origines très variées a alors été collecté pour être analysé phylogénétiquement et phénotypiquement par l'étudiante en thèse Emeline Reboud (Reboud *et al.*, 2016; Huber *et al.*, 2016). Cette étude, basée sur la comparaison des SNP des génomes « cœurs » de 97 souches (74 classiques et 23 de type PA7), a démontré la division des souches de type PA7 (*SST3*-/*exlBA*+) en deux sous-groupes (A et B ; Fig. 7.A). L'une des particularités majeures qui différencie ces deux sous-populations est le profil de délétion du locus codant pour la machinerie du SST3. Pour le groupe A, la délétion est totale tandis que, pour le groupe B, l'excision du locus a laissé au niveau du site de recombinaison une cicatrice composée de petits fragments de gènes (Fig. 7.B). De plus, les souches du sous-groupe A sont toxiques envers différents modèles d'infection (cellules eucaryotes, modèle murin de pneumonie aiguë, plante) tandis que la sous-population B présente majoritairement une

virulence atténuée. Ce profil de toxicité apparaît comme étant lié à la capacité de sécrétion de la toxine du système ExlBA par les différentes souches, qui possèdent toutes les gènes codant pour ce facteur de virulence. Enfin, de façon surprenante le sous-groupe B est plus proche phylogénétiquement des groupes 1 et 2 que du sous-groupe A, laissant supposer une divergence ancienne au sein du groupe 3.

Comme le montre la **figure 7.A**, les souches PA7 et CLJ1 appartiennent au sous-groupe A, tout comme la souche clinique IHMA87, un isolat urinaire étudié par l'équipe PBRC (AZPAE15042 ; Kos *et al.*, 2015).

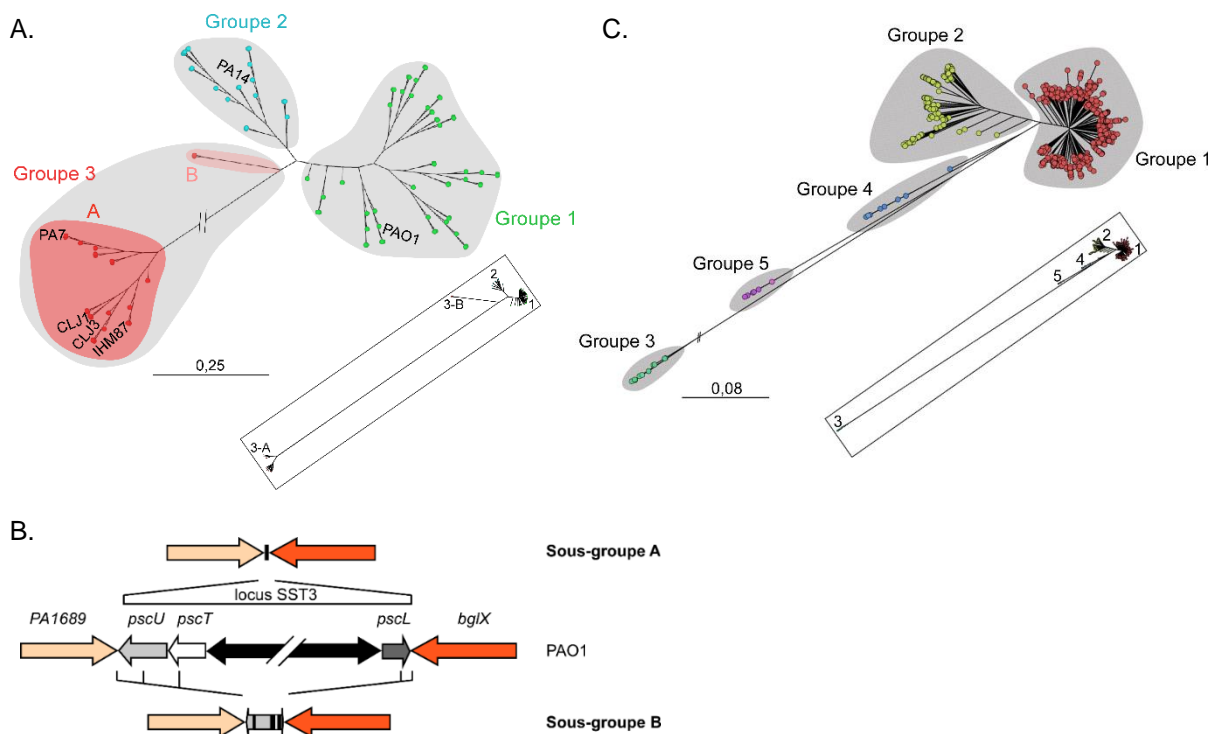


Figure 7 : Différentes architectures sont proposées pour représenter la population au sein de *P. aeruginosa*.

A et B) Certaines études divisent la population de *P. aeruginosa* en 3 groupes, dont le troisième est lui-même scindé en deux sous-groupes (Reboud *et al.*, 2016). A) Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des SNP des génomes « cœurs » de 97 souches. La longueur des branches représente la distance génétique entre les souches. Le sous-groupe A des souches de type PA7 est indiqué par un cercle rouge vif et le sous-groupe B par une ellipse rouge pâle. L'encadré montre l'apparence réelle de l'arbre (d'après les données non publiées de P. Basso).

B) Schéma représentant les deux types de délétion génomique du locus du SST3 identifiées chez les souches de type PA7.

C) Une étude plus récente divise la population de *P. aeruginosa* en 5 groupes (Freschi *et al.*, 2019). Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des SNP des génomes « cœurs » de 1311 souches. L'encadré montre l'apparence réelle de l'arbre.

Très récemment, Freschi et ses collègues ont proposé une nouvelle structure de la population de cette espèce et présentent un découpage de l'espèce en 5 groupes différents (**Fig. 7.C** ; Freschi *et al.*, 2019). Leurs groupes 1-2-3 correspondent aux groupes précédemment décrits.

Le groupe 5, formé par des souches ne possédant pas le SST3 mais plus proches phylogénétiquement de PA01/PA14 que de PA7, semble correspondre au sous-groupe B du groupe 3 identifié par l'équipe PBRC (voir encadrés Fig. 7.A et C). Enfin, le groupe 4 regroupe des souches qui possèdent le SST3 mais qui sont éloignées de PA01 ou PA14 : elles présentent notamment une divergence dans la séquence du gène *exoS* (toxine du SST3 ; Introduction/Chapitre 2.2.b). Ces souches étaient probablement incluses dans les groupes 1 et 2 des études précédentes. Le nombre de génomes incorporés dans cette étude est similaire à celui de Vincent *et al.* mais les critères utilisés pour définir le génome « cœur » sont plus drastiques, ce qui explique les différences entre les deux arbres phylogénétiques obtenus (Annexe 1).

Au-delà de cette structuration en groupes, les souches de *P. aeruginosa* sont plus simplement différenciées entre celles dites « classiques » (ou de type PA01 et PA14), qui possèdent le SST3, et celles présentées comme « marginales » (ou de type PA7), qui sont dépourvues de ce facteur de virulence mais ont le système ExlBA.

La proportion de souches de type PA7, parmi les 2226 souches de l'espèce *P. aeruginosa* dont le génome est disponible sur la base de données « *Pseudomonas* Genome Database », est actuellement estimée à 1%. Cependant, différents biais mènent à la sous-évaluation de cette population. En effet, durant de longues années, les souches ne possédant pas les toxines du SST3 étaient peu étudiées et donc leur génome rarement séquencé. De plus, les principales cohortes analysées ces dernières années englobaient principalement des isolats cliniques, qui sont majoritairement des souches classiques de *P. aeruginosa*. Depuis l'identification du groupe 3 et la mise en évidence de la capacité de virulence des souches de type PA7, de plus en plus d'entre elles sont incluses dans les études et leur génome est séquencé (Pirnay *et al.*, 2009; Boukerb *et al.*, 2015; Kos *et al.*, 2015; Mai-Prochnow *et al.*, 2015; Thrane *et al.*, 2015; van Belkum *et al.*, 2015). Le 2^e génome complet d'une souche de type PA7, CR1, vient d'ailleurs d'être publié (Sood *et al.*, 2019). Il est donc probable de voir augmenter leur pourcentage au sein de *P. aeruginosa* dans les prochaines années et éventuellement d'observer une nouvelle évolution de la structure de la population.

Chapitre 2

Pseudomonas aeruginosa, un arsenal de facteurs de virulence

Le génome de *P. aeruginosa* code pour un nombre important de facteurs de virulence, sur lesquels repose sa pathogénicité.

Ces facteurs de virulence participent à la mobilité et l'adhésion bactérienne, inhibent les défenses immunitaires de l'hôte ou encore induisent la mort de cellules eucaryotes et/ou procaryotes. Ils permettent ainsi aux bactéries de persister dans un environnement hostile, coloniser un hôte et se défendre contre les attaques de l'hôte ou d'autres micro-organismes.

1. Les facteurs de virulence d'adhésion et de motilité

P. aeruginosa possède deux appendices de surface impliqués à la fois dans la motilité et l'adhésion bactérienne : le flagelle et les pili de type 4. Ces deux facteurs participent à l'établissement d'une infection et sont nécessaires pour les étapes primaires de la formation de biofilm (Conrad *et al.*, 2011; Gellatly and Hancock, 2013).

a. Le flagelle

P. aeruginosa possède un seul flagelle, localisé à l'un des pôles. Cette structure rotative actionnée par un moteur est composée d'un corps basal ancré dans la membrane bactérienne et d'un filament, polymère de flagelline FliC, agissant comme une hélice (Fig. 8.A; Chaban *et al.*, 2015). Le flagelle permet à la bactérie de se déplacer selon deux types de motilité : le *swimming*, déplacement en milieu liquide, et le *swarming*, déplacement sur une surface semi-solide (Conrad *et al.*, 2011). La motilité de type *swarming* est également dépendante des pili de type 4 et de la synthèse des rhamnolipides (Köhler *et al.*, 2000).

Le flagelle représente un atout primordial pour l'établissement de la virulence de la bactérie lors d'une infection (Turner *et al.*, 2014). En effet, en absence de flagelle, *P. aeruginosa* n'est pas capable de disséminer dans un modèle murin de pneumonie aiguë (Feldman *et al.*, 1998). Il joue un rôle essentiel dans l'initiation de l'adhésion des bactéries à une surface et participe à l'activation de la réponse inflammatoire au travers des TLR2 et TLR5 (Bucior *et al.*, 2012; Bruzaud *et al.*, 2015; Adamo *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2018). De plus, comme cela sera décrit dans le [chapitre 3 de l'introduction](#), le flagelle a un rôle important pour l'établissement de l'attachement primaire à une surface, tel un tissu cellulaire.

Cependant, le flagelle étant très immunogène, il a été montré que *P. aeruginosa* était capable de s'adapter en inhibant sa synthèse pour échapper à la réponse de l'hôte lors d'infections chroniques, notamment au niveau des poumons de patients atteints de mucoviscidose (Wolfgang *et al.*, 2004).

b. Les pili de type 4

Les pili de type 4 (T4P, *Type 4 pili*) sont des filaments plus petits que le flagelle, présents à un ou aux deux pôles de la bactérie (Burrows, 2013). Chez *P. aeruginosa*, il existe deux grands types de T4P : a et b (Burrows, 2012). Les T4_bP incluent les Tad, ou pili Flp, qui sont des pili impliqués dans l'adhésion bactérienne. Un rôle spécifique des T4_bP dans la virulence et la motilité de *P. aeruginosa* n'ayant pas été mis en évidence, ils ne seront pas décrits dans ce manuscrit.

Le T4_aP, composé d'une fibre extracellulaire et d'un complexe membranaire, est un facteur d'adhésion qui joue un rôle prépondérant chez *P. aeruginosa* en favorisant la mobilité bactérienne et l'attachement initial à divers types de surfaces (Fig. 8.B; Chang *et al.*, 2016). Les pili sont impliqués dans deux types de motilité impliquant la polymérisation/dépolymérisation de la piline majeure PilA, ce qui permet ainsi des cycles d'extension et de rétraction de la fibre extracellulaire. Comme cité précédemment, les T4_aP coopèrent avec le flagelle pour permettre un déplacement de type *swarming*. Cependant, la principale motilité associée à ces appendices est le déplacement des bactéries sur une surface solide appelé *twitching* (Burrows, 2012). De plus, les T4_aP peuvent également influencer le *swimming* des bactéries à proximité d'une surface comme les cellules eucaryotes (Golovkine *et al.*, 2016b).

Le T4_aP est un facteur important pour la pathogénicité puisque, en plus de permettre le contact primaire avec un hôte, il est également impliqué dans la dissémination et la virulence au sein de cet hôte (Comolli *et al.*, 1999; Zolfaghar *et al.*, 2003). En effet, le T4_aP favorise notamment un contact rapproché entre les bactéries et les cellules eucaryotes permettant l'injection de toxines par le SST3 dans ces cellules (Sundin *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2015 ; Introduction/Chapitre 2.2.b). De plus, le T4_aP participe à la régulation des gènes en jouant le rôle de mécanosenseur pour le système chimiosensoriel Chp, ce qui permet de réguler la synthèse des facteurs de virulence, comme le SST3, suite au contact avec une surface solide (Introduction/Chapitre 3.2.c.i ; D'Argenio *et al.*, 2001; Whitchurch *et al.*, 2004, 2005; Fulcher *et al.*, 2010; Inclan *et al.*, 2011; Persat *et al.*, 2015; Inclan *et al.*, 2016; Silversmith *et al.*, 2016).

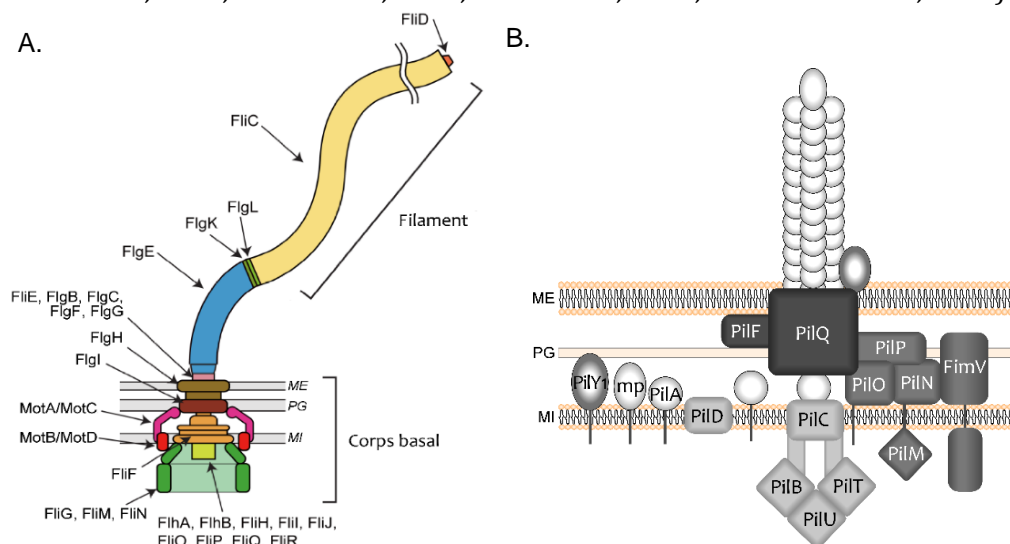


Figure 8 : Le flagelle et le pilus de type 4a.

A) Représentation schématique du flagelle, composé d'un corps basal et d'un filament (d'après Morimoto and Minamino, 2014). Le moteur flagellaire est composé d'un stator MotAB ou MotCD. B) Schéma du T4_aP composé d'un filament de piline majeure (PilA), d'une sécrétine (PilQ), d'une pilotine (PilF), de 3 ATPases (polymérisation : PilB, dépolymérisation : PilT/PilU) et d'un complexe d'alignement (PilMNOP et FimV) (d'après Burrows, 2012). PilC sert de plateforme aux ATPases et PilD est une protéase impliquée dans la biogenèse du T4_aP. PilY1 est une adhésine participant à la structure et à l'activité du pilus. Les constituants du système chimiosensoriel Pil/chp sont représentés en violet. ME : membrane externe, PG : peptidoglycane, MI : membrane interne, mp : pilines mineures (FimU, PilV, PilW, PilX et PilE).

2. Les systèmes de sécrétion de *P. aeruginosa*

De nombreux facteurs de virulence sécrétés par les bactéries jouent un rôle important dans la pathogénicité de *P. aeruginosa*. Ce processus d'export protéique est médié par des complexes macromoléculaires appelés « systèmes de sécrétion ». Les facteurs de virulence sont ainsi transportés à travers ces systèmes pour ensuite soit rester ancrés à la membrane bactérienne, soit être relargués dans le milieu extracellulaire ou encore être injectés directement dans le cytoplasme d'une cellule cible.

Même s'il existe six systèmes de sécrétion chez les bactéries à gram négatif, seuls cinq d'entre eux ont été mis en évidence chez *P. aeruginosa* : SST1, SST2, SST3, SST5 et SST6 (Fig. 9 ; Filloux, 2011).

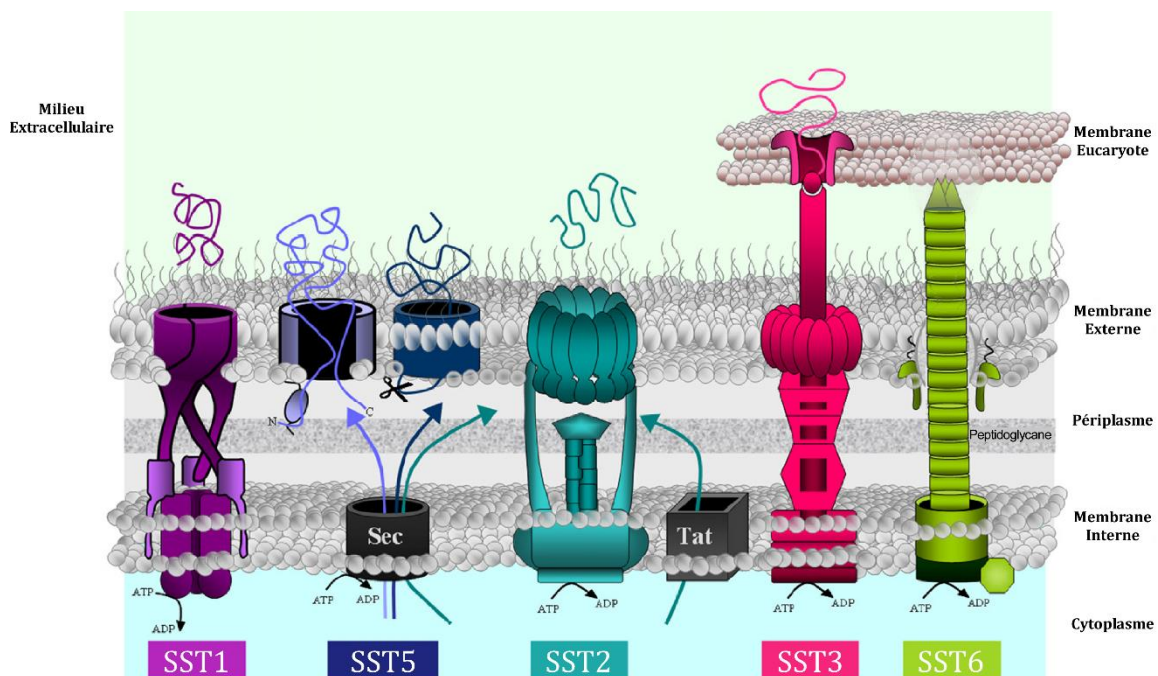


Figure 9 : Les systèmes de sécrétion de *P. aeruginosa* (Blevés *et al.*, 2010).

La sécrétion d'effecteurs par des systèmes de sécrétion de type 2 et 5 nécessite la translocation préalable de ces protéines dans le périplasm grâce aux voies d'export de la membrane interne Sec ou Tat, selon si elles sont dépliées ou repliées respectivement. La voie de sécrétion générale Sec joue un rôle majeur et est principalement constituée du translocon transmembranaire SecYEG. Les protéines sont adressées vers ce canal pendant leur traduction par la particule de reconnaissance du signal (SRP), ou après la traduction grâce à l'ATPase SecA (Tsirigotaki *et al.*, 2017 ; Fig. 10). A l'inverse, les SST1, 3 et 6 permettent le franchissement des deux membranes bactériennes en une seule étape.

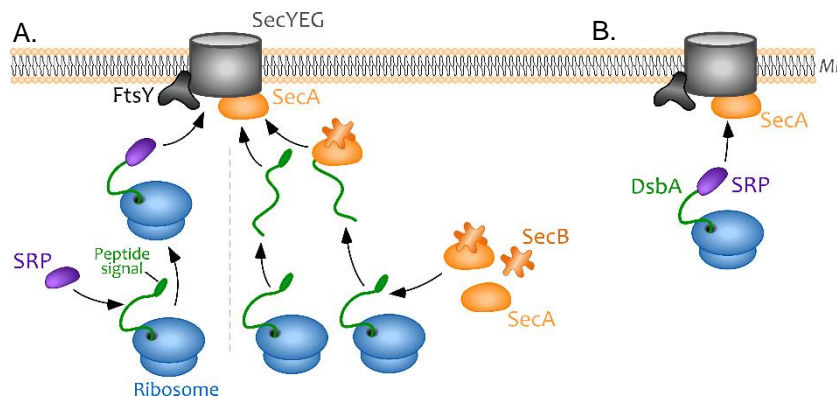


Figure 10 : Schéma de la translocation de protéines au travers de la membrane interne par la voie de sécrétion Sec (d'après Tsirigotaki *et al.*, 2017).

A) De manière générale, les protéines (schématisées en vert) sont adressées au canal SecYEG grâce à un peptide signal N-terminal spécifique. Les protéines en cours de traduction sont transloquées au travers du canal SecYEG grâce à SRP et son récepteur FtsY. L'énergie nécessaire à ce processus est fournie par le ribosome. Les protéines transloquées après leur traduction sont exportées par le canal SecYEG grâce à l'activité ATPase de SecA et à la force proton-motrice. Des chaperonnes (SecA cytoplasmique, SecB, ou un « trigger factor ») peuvent aider l'export post-traductionnel. B) SecA peut parfois être nécessaire à l'export des protéines dépendantes de SRP, comme c'est le cas pour la protéine périsplasmique DsbA. MI : membrane interne.

a. Les Systèmes de Sécrétion de Type 1, 2, et 6

i. SST1

Le SST1 est l'un des systèmes de sécrétion bactériens le plus simple qui permet le transport de protéines non repliées. Il s'agit d'un complexe triparti composé d'un transporteur ABC, d'une protéine de la membrane externe et d'une protéine adaptatrice ancrée dans la membrane interne qui relie les deux premiers éléments (Green and Mecsas, 2016).

Chez *P. aeruginosa*, deux SST1 ont été caractérisés. Le système Apr est le plus connu, il comprend le transporteur AprD, la protéine adaptatrice AprE et la protéine de la membrane externe AprF. Ce SST1 permet la sécrétion de la protéase alcaline AprA et de la protéine à fonction inconnue AprX (Guzzo *et al.*, 1991; Duong *et al.*, 2001). AprA est une métalloprotéase zinc-dépendante importante pour la virulence de *P. aeruginosa*, connue pour affaiblir les défenses immunitaires de l'hôte. En effet, AprA dégrade la laminine de la lame basale, inactive diverses cytokines et inhibe certaines fonctions des neutrophiles ainsi que l'activation du complément (Hoge *et al.*, 2010; Laarman *et al.*, 2012). Le deuxième SST1 de *P. aeruginosa* est composé des protéines HasD, HasE et HasF. Le substrat unique de ce système est l'hémophore HasAp impliqué dans l'absorption du fer (Filloux, 2011). HasAp participe ainsi à la survie bactérienne durant une infection, où la concentration extracellulaire faible en fer est critique pour les bactéries.

D'autres SST1 ont été décrits chez *P. aeruginosa* mais aucune étude fonctionnelle n'a permis l'identification de leur(s) substrat(s).

ii. SST2

Certaines protéines repliées présentes dans le périplasme vont être sécrétées par le SST2. Il s'agit d'un système composé de 4 parties : une plateforme protéique formant la base dans la membrane interne, un canal multimérique intégré dans la membrane externe, une ATPase cytoplasmique et une structure hélicoïdale de type pseudopilus (Cianciotto and White, 2017). Ces sous-complexes sont généralement codés par 11 gènes regroupés sur le chromosome bactérien.

Chez *P. aeruginosa*, 3 SST2 ont été identifiés à ce jour. Le système Xcp (*extracellular protein*) a de nombreux effecteurs, parmi eux l'élastase LasB qui représente un facteur de virulence important au cours d'une infection. Cette protéase inhibe notamment la réponse immunitaire de l'hôte (Bastaert *et al.*, 2018). Il a également été démontré au laboratoire que LasB est impliquée dans la dégradation de la VE-cadhérine localisée au niveau des jonctions cellulaires endothéliales ce qui favorise la dissémination bactérienne et la toxicité dépendante du SST3 (Golovkine *et al.*, 2014). Les deux autres SST2 participent à l'export d'un nombre d'effecteurs plus restreint. Le système inductible Hxc (pour homologue de Xcp) est synthétisé uniquement en réponse à une limitation en phosphate et 3 substrats lui sont assignés : la phosphatase LapA ainsi que les protéines liant le phosphate LapC et PstS (Cianciotto and White, 2017). Enfin, le dernier SST2 est le système Txc, spécifique des souches de type PA7, ayant comme seul substrat la protéine liant la chitine CbpE (Cadoret *et al.*, 2014).

iii. SST6

Le système de sécrétion de type 6 a la particularité de transloquer les effecteurs directement dans le cytoplasme d'autres bactéries ou de cellules eucaryotes (Sana *et al.*, 2016). Il est composé d'un complexe membranaire et d'une structure tubulaire formant un assemblage de type « bactériophage inversé ».

Trois groupes de gènes codent pour les composants de 3 SST6 chez *P. aeruginosa* (Filloux, 2011). Le SST6-1 est une véritable arme antibactérienne, qui permet à *P. aeruginosa* d'entrer en compétition avec d'autres espèces bactériennes pour coloniser une niche environnementale ou éliminer les bactéries commensales d'un hôte (Sana *et al.*, 2016). Il a initialement été décrit pour favoriser l'occupation chronique des poumons par *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose (Mougous *et al.*, 2006). Sept protéines effectrices ont été identifiées comme sécrétées par ce système, notamment les protéines Tse1 et 3 qui sont injectées dans le périplasme d'une bactérie cible pour attaquer le peptidoglycane contenu dans sa paroi (Sana *et al.*, 2016). Afin de se protéger des effets de ses effecteurs, *P. aeruginosa* synthétise des protéines dites « de l'immunité », ou antitoxines, qui vont canaliser les effets des toxines (comme par exemple, Tsi1 et Tsi3 pour les toxines Tse1 et Tse3). Les SST6-2 et SST6-3 ont en plus la capacité de cibler les cellules eucaryotes, favorisant ainsi l'invasion bactérienne au cours d'infections aiguës (Sana *et al.*, 2012; Hachani *et al.*, 2016). Ces deux systèmes sécrètent les phospholipases D PldA et PldB,

respectivement, qui jouent le rôle de toxines antibactériennes ou ciblent la voie PI3K/Akt des cellules eucaryotes non phagocytaires afin de favoriser l'internalisation des bactéries (Bleves *et al.*, 2014; Sana *et al.*, 2016).

b. Le Système de Sécrétion de Type 3

Le SST3 est considéré comme étant le facteur de virulence principal des souches classiques de *P. aeruginosa*. En effet, il est exprimé lors d'infections aiguës et est associé à une morbidité accrue et une augmentation de la mortalité chez les patients infectés par *P. aeruginosa* (Hauser *et al.*, 2002; Le Berre *et al.*, 2011; El-Solh *et al.*, 2012).

Le SST3 résulte de l'assemblage de plus d'une vingtaine de protéines et permet l'injection de toxines directement dans le cytoplasme des cellules eucaryotes, à travers une structure de type aiguille. Chez *P. aeruginosa*, 36 gènes regroupés en 5 opérons codent pour les protéines de structure et de régulation de ce système. A différents endroits sur le chromosome sont également situés les gènes codant pour les protéines effectrices et leurs chaperonnes (Hauser, 2009 ; Fig. 11).

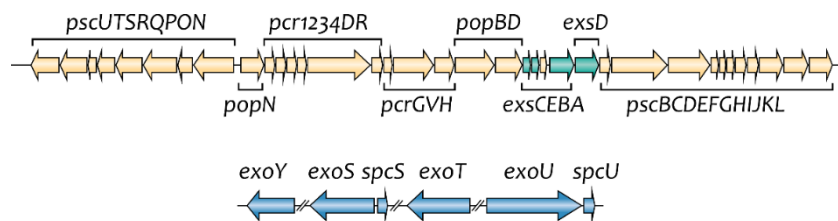


Figure 11 : Organisation génétique du SST3 de *P. aeruginosa* (d'après Hauser, 2009).

Les gènes codant pour les protéines du SST3 impliquées dans la sécrétion (jaune), la translocation (jaune) et la régulation (vert) sont regroupés en 5 opérons alors que ceux codant pour les toxines et leurs chaperonnes (bleu) sont dispersés sur le génome.

Ce système se compose de 3 grandes entités : le corps basal, l'aiguille et le translocon (Fig. 12 ; Hauser, 2009; Filloux, 2011). Le corps basal est intégré dans les membranes de la bactérie et correspond à la machinerie d'export du système. Cette partie comprend entre autres la protéine PscN, qui a une activité ATPase fournissant une partie de l'énergie nécessaire au processus de translocation. Une structure protéique de type aiguille est établie en continuité de ce corps basal et résulte de la polymérisation de la protéine PscF. L'aiguille du SST3 de *P. aeruginosa* mesure entre 60 et 120nm de long pour un diamètre externe de 6 à 10nm. Une étude à laquelle j'ai participé durant mon stage de Master 1 a mis en évidence que l'ancrage et la stabilisation de l'aiguille sur le corps basal sont assurés par la protéine PscI, qui formerait une tige interne entre les deux membranes bactériennes (Monlezun *et al.*, 2015 ; Annexe 10). Enfin, le translocon se situe à l'extrémité de l'aiguille et est composé des protéines PopB et PopD, qui établissent le pore de translocation dans la membrane eucaryote, ainsi que de PcrV qui leur sert de plateforme.

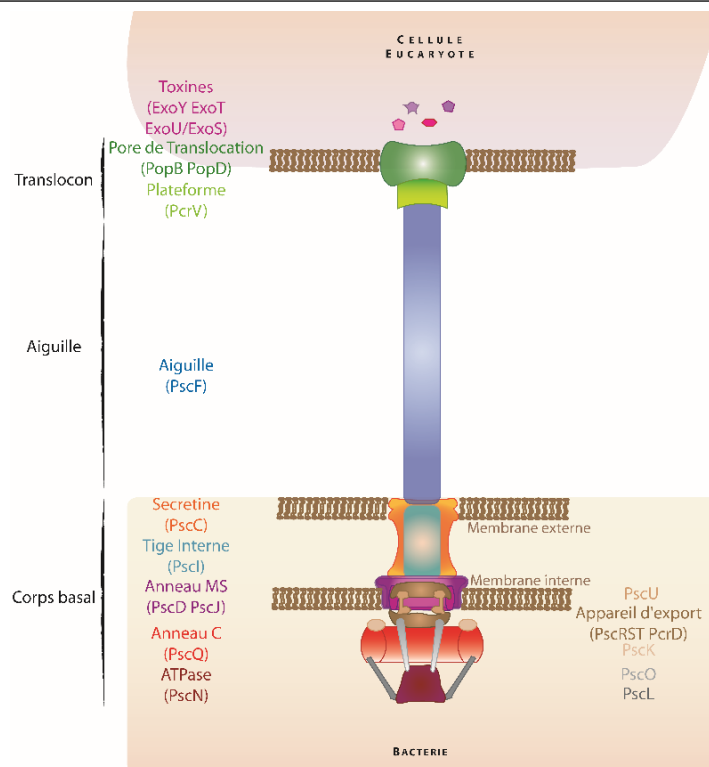


Figure 12 : Structure du SST3 de *P. aeruginosa* (adapté de L. Monlezun).

Anneau MS = membrane et supra-membrane ; Anneau C = cytosolique.

Seuls 4 effecteurs ont été identifiés pour le SST3 de *P. aeruginosa*. Il s'agit des exotoxines ExoU, ExoS, ExoY et ExoT. Les souches ne possèdent que 3 des gènes codant pour ces protéines, les toxines ExoU et ExoS étant généralement exclusives (Feltman *et al.*, 2001). Environ 60 à 70% des souches cliniques possèdent le gène *exoS* contre 25 à 30% le gène *exoU* (Sawa *et al.*, 2014).

Les toxines ExoS et ExoT sont bifonctionnelles : elles possèdent un domaine N-terminal GAP (*GTPase activating protein*) et un domaine C-terminal ADPRT (*ADP-ribosyltransferase*). Le domaine GAP des deux toxines cible les petites GTPases Rho, Rac et CDC42 (*cell division cycle 42*), qui ont pour rôle le maintien du cytosquelette d'actine. Les cibles du domaine ADPRT d'ExoT sont limitées aux protéines de la famille des CRK (*CT10 regulator of kinase*) et certaines phosphoglycérate kinases, conduisant notamment à la disparition des contacts focaux (Wood *et al.*, 2015a). Le domaine ADPRT d'ExoS cible, pour sa part, de nombreux facteurs cellulaires et induit des effets variés sur la cellule hôte, comme l'inhibition de la phagocytose, du trafic intracellulaire ou de la synthèse d'ADN (Hauser, 2009; Rangel *et al.*, 2014; Simon and Barbieri, 2014). Ces deux effecteurs inhibent l'internalisation des bactéries en déstabilisant le cytosquelette d'actine et induisent la mort cellulaire par apoptose (Hauser, 2009; Wood *et al.*, 2015b; Kaminski *et al.*, 2018).

ExoU appartient à la famille des phospholipases de type A2 et induit la mort des cellules eucaryotes par nécrose. Elle provoque une rupture rapide de la membrane plasmique en lysant les lipides des cellules eucaryotes (Hauser, 2009). Il s'agit de l'effecteur le plus toxique du SST3, associé aux cas sévères d'infections par *P. aeruginosa* (Shaver and Hauser, 2004; Peña *et al.*, 2015).

ExoY est une nucléotidyl cyclase qui active la dégradation des microtubules et augmente la perméabilité endothéliale (Sayner *et al.*, 2004; Balczon *et al.*, 2013; Beckert *et al.*, 2014).

c. Les Systèmes de Sécrétion de Type 5

Les SST5 sont des systèmes de sécrétion simples permettant la sécrétion de grandes protéines associées à l'adhésion et la virulence chez les bactéries à gram négatif. Ces systèmes sont différenciés en 5 sous-groupes selon leur organisation structurale et leur mécanisme de transport (Fig. 13 ; Fan *et al.*, 2016). Les SST5a-c-d-e ne sont composés que d'une seule protéine et sont donc appelés « autotransporteurs ». Le sous-groupe « b » rassemble les SST5 composés de deux protéines et désignés comme des systèmes de sécrétion à deux partenaires (*Two Partner Secretion* – TPS). De façon générale, les protéines des SST5 sont transportées jusqu'au périplasme par le système Sec grâce à un peptide signal localisé à l'extrémité N-terminale des protéines et clivé une fois que la protéine est dans le périplasme (Bernstein, 2010).

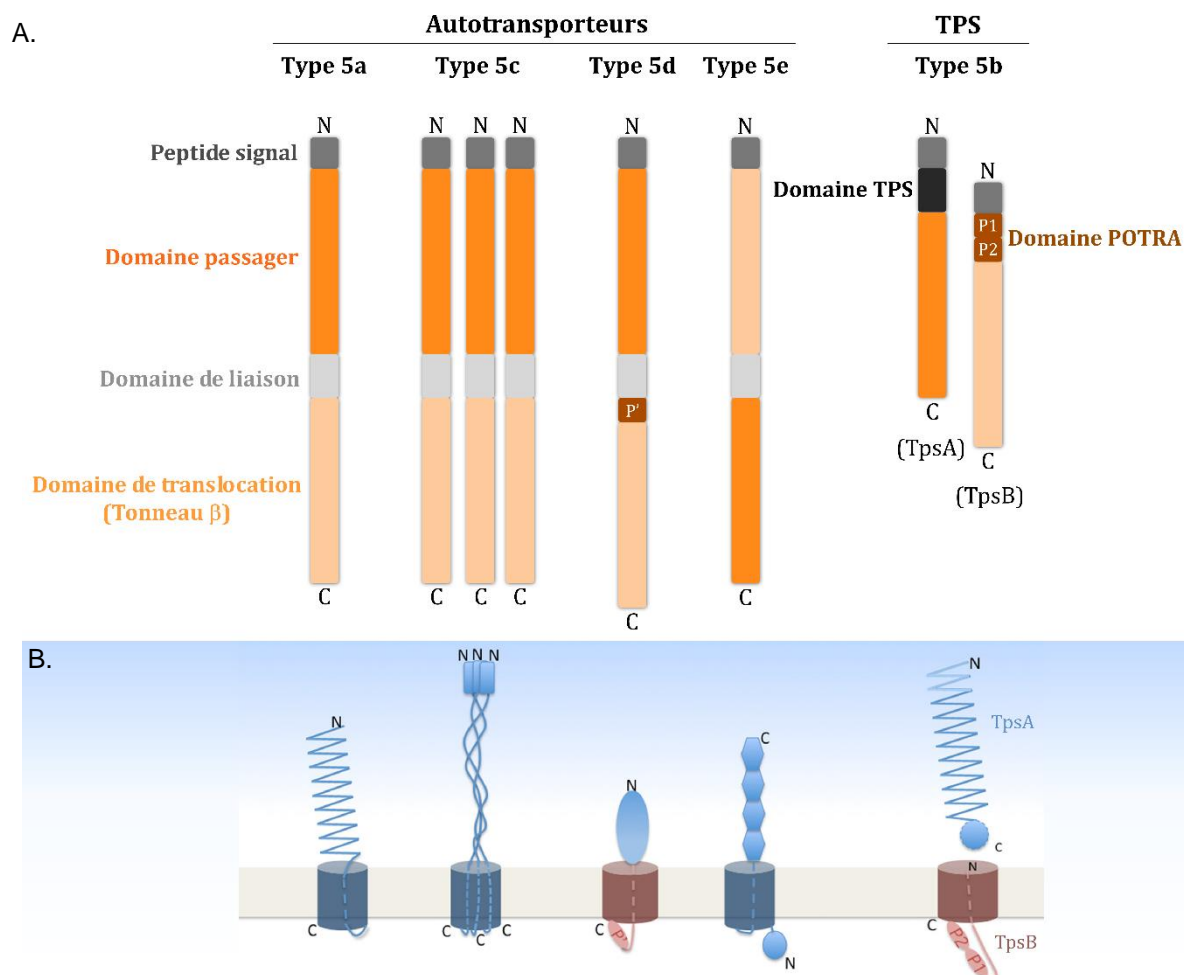


Figure 13 : Les sous-groupes de système de sécrétion de type 5.

- A) Organisation des domaines protéiques des différents SST5 (d'après Fan *et al.*, 2016).
 B) Représentation schématique de ces systèmes à la membrane externe (Guérin *et al.*, 2017).
 N et C : extrémités N- et C-terminales. P'/P1/P2 : domaines POTRA.

i. Autotransporteurs

Les autotransporteurs sont constitués d'un seul polypeptide, comprenant un domaine de translocation et un domaine fonctionnel dit « passager » (Grijpstra *et al.*, 2013). Ces systèmes permettent une sécrétion autonome des protéines : le domaine de translocation, composé de feuillettes β , forme un pore dans la membrane externe pour exporter le domaine passager vers l'extérieur de la bactérie. Il est inséré dans la membrane externe par le complexe Bam (*β -barrel assembly machine*).

Plusieurs chaperonnes périplasmiques ont été décrites pour jouer un rôle de protection des AT contre leur dégradation ou leur autoaggrégation dans le périplasma (SurA, Skp, FkpA, DegP, TpgA ; Purdy *et al.*, 2007; Ieva and Bernstein, 2009; Ruiz-Perez *et al.*, 2009, 2010; Ieva *et al.*, 2011; Ishikawa *et al.*, 2016).

Les SST5a sont les autotransporteurs dits « classiques » (Fan *et al.*, 2016; van Ulsen *et al.*, 2018 ; Fig. 13). Le domaine de translocation transmembranaire est situé à l'extrémité C-terminale de la protéine et est composé de 12 feuillettes β . Le domaine passager est présent sur la protéine en N-terminal et possède généralement une activité adhésine, protéase ou estérase. Après translocation vers le milieu extracellulaire, cette extrémité N-terminale est soit clivée par protéolyse soit reste ancrée dans la membrane. Trois autotransporteurs classiques ont été décrits chez *P. aeruginosa* : EstA, AaaA et EprS. L'estérase EstA est impliquée dans la motilité bactérienne, la formation de biofilm et la synthèse des rhamnolipides (Wilhelm *et al.*, 2007; Dobler *et al.*, 2017). Elle a été identifiée comme nécessaire à la virulence de *P. aeruginosa* dans un modèle d'infection respiratoire chronique chez le rat (Potvin *et al.*, 2003). Le second autotransporteur, AaaA (*arginine-specific autotransporter of P. aeruginosa*), est également décrit pour avoir un rôle dans la survie bactérienne chez un modèle murin d'infection chronique de plaie (Luckett *et al.*, 2012). AaaA possède une activité aminopeptidase spécifique des résidus arginines. Enfin, la sérine protéase EprS est impliquée dans divers phénotypes de pathogénicité de *P. aeruginosa*, telles la motilité et l'invasion bactérienne (Kida *et al.*, 2013, 2016).

Le SST5d est très similaire au SST5a (Grijpstra *et al.*, 2013). Ces deux systèmes diffèrent principalement par la présence d'un domaine périplasmique supplémentaire sur le SST5d, appelé POTRA (*Periplasmic Polypeptide Transport-Associated* ; Fig. 13). La fonction de ce domaine pour le SST5d n'est pas encore bien déterminée. Le seul SST5d caractérisé chez *P. aeruginosa* est la protéine de type patatine PlpD, qui possède une activité phospholipase envers les phosphatidylinositols et pourrait avoir un rôle dans les interactions avec la membrane eucaryote (Salacha *et al.*, 2010; da Mata Madeira *et al.*, 2016).

Aucun SST5c (homo-trimère) et SST5e (autotransporteurs inversé) n'ayant été identifié chez *P. aeruginosa*, ces systèmes ne seront pas détaillés dans ce manuscrit (Guérin *et al.*, 2017).

ii. *TPS ou SST5b*

Au sein du sous-groupe b, les domaines passager et de translocation sont portés par 2 protéines différentes. Les TPS comprennent ainsi un transporteur de la membrane externe, communément nommé TpsB, et une protéine fonctionnelle, appelée TpsA (Fig. 13). Dans la plupart des cas, les 2 protéines sont codées par deux gènes organisés en opéron ou présents sur le même locus génétique (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2013 ; Tableau 2). Après translocation, la protéine TpsA peut être soit maintenue ancrée à la membrane dans le transporteur TpsB, soit relarguée dans le milieu extracellulaire.

Les protéines TpsB appartiennent à la famille des Omp85 (*outer membrane protein*). Ces protéines forment un tonneau de 16 feuilletts β insérés dans la membrane externe et possèdent deux domaines POTRA localisés dans le périplasme (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2009). Ces domaines jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance et le transport du TpsA (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2009).

L'effecteur TpsA est une grande protéine comprenant un domaine TPS en N-terminal, qui interagit spécifiquement avec les domaines POTRA de la protéine TpsB, et une extrémité C-terminale associée à la fonction de la protéine (Guérin *et al.*, 2017). Les protéines TpsA sont classées en différents groupes selon leur fonction : les cytolysines/hémolysines, les adhésines, les systèmes CDI (*contact dependent growth inhibition* ; impliqués dans la compétition bactérienne), les protéases, les protéines fixant le fer et enfin celles de fonction inconnue (Guérin *et al.*, 2017).

Les mécanismes de translocation de l'effecteur TpsA au travers du transporteur TpsB ne sont pas encore complètement définis et rares sont les TPS dont le processus de sécrétion a été entièrement décrit. Deux modèles ont cependant été proposés (Fig. 14 ; Hodak and Jacob-Dubuisson, 2007; Guérin *et al.*, 2017). Selon le modèle dit « en épingle », l'interaction entre le domaine TPS et les domaines POTRA serait maintenue jusqu'à la fin de la translocation. La protéine formerait une structure « en épingle », le domaine TPS étant la dernière partie du TpsA à atteindre le milieu extracellulaire (Fig. 14.A). Le second modèle, dit « linéaire », propose que le domaine TPS soit exporté le premier après interaction avec les domaines POTRA (Fig. 14.B). La partie C-terminale de la protéine serait ainsi la dernière à être transloquée.

Différentes études menées pour comprendre le mécanisme de sécrétion du TPS FhaBC, impliqué dans l'adhérence de *B. pertussis* aux cellules eucaryotes, tendent à démontrer que ce processus repose sur le modèle « linéaire » (Mazar and Cotter, 2006; Delattre *et al.*, 2011; Baud *et al.*, 2014; Guérin *et al.*, 2017). La pré-protéine de 367 kDa FhaB serait transloquée à travers FhaC de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, puis serait maturée en FHA par clivage d'un prodomaine C-terminal de 120 kDa. Le processus de sécrétion décrit pour l'adhésine du TPS HMW1/HMW1B d'*Haemophilus influenzae* est également linéaire (Grass and St Geme, 2000; Grass *et al.*, 2015). A l'inverse, le mécanisme de translocation du TPS CdiBA d'*E. coli*, impliqué dans

l'inhibition de la croissance bactérienne, a récemment été mis en évidence et repose sur le modèle « en épingle » même si le domaine TPS de CdiA interagirait avec CdiB à la surface bactérienne et non avec les domaines périplasmiques POTRA (Ruhe *et al.*, 2018).

En l'absence de source d'énergie hydrolysable comme l'ATP dans le périplasma ou d'un gradient électrochimique, il est proposé que ce soit le repliement progressif au cours de la translocation de l'effecteur TpsA qui joue le rôle de force motrice pour poursuivre le processus d'export (Schiebel *et al.*, 1989; Hodak *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2012).

Enfin, une question se pose quant à l'implication de chaperonnes périplasmiques pour protéger les protéines TpsA non repliés dans le périplasma, comme pour les AT. Seule la protéine TpsA FHA a été décrite pour interagir avec des chaperonnes, DegP et Par27, qui préviennent sa dégradation (Hodak *et al.*, 2008; Baud *et al.*, 2009).

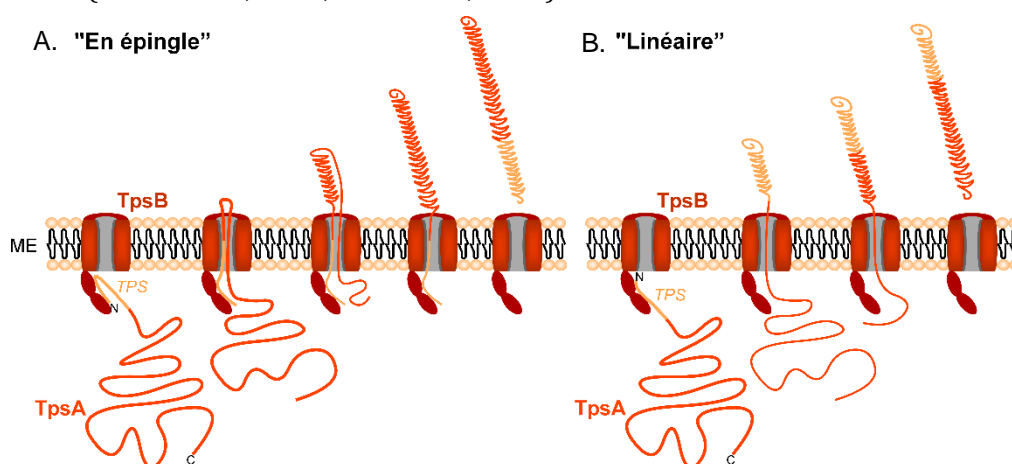


Figure 14 : Deux modèles sont proposés pour la sécrétion des TpsA.

A) Représentation schématique du modèle de sécrétion des TpsA « en épingle ». De gauche à droite, le domaine TPS (représenté en orange clair) du TpsA interagit avec les domaines POTRA du TpsB. Cette interaction est maintenue jusqu'à la fin du processus de translocation. La partie N-terminale du TpsA, en aval du domaine TPS, forme une structure « en épingle » pour passer au travers du TpsB. Le repliement du TpsA est alors initié et la protéine est progressivement transloquée et repliée l'extrémité C-terminale. La partie N-terminale du TpsA est finalement exportée et repliée dans le milieu externe. B) Représentation schématique du modèle « linéaire » de sécrétion des TpsA. De gauche à droite, le domaine TPS (représenté en orange clair) du TpsA interagit avec les domaines POTRA du TpsB. Le domaine TPS passe ensuite au travers du TpsB pour être transloqué. Le repliement du TpsA est initié à cette extrémité N-terminale et le reste de la protéine est progressivement transloquée et repliée. ME : membrane externe

Six TPS ont été identifiés dans la souche de *P. aeruginosa* PAO1 (Tableau 2 ; Filloux, 2011). En 2008, Kida *et al.* décrivent le TPS LepBA codé par les gènes *PA4640* et *PA4641* (Kida *et al.*, 2008). LepA (*large extracellular protease*) est une protéase extracellulaire qui active la réponse NFκB de l'hôte (Kida *et al.*, 2008). Ce TPS contribue également à la croissance et la virulence bactériennes (Kida *et al.*, 2011). L'opéron *PA4624/4625* codent pour le TPS CdrAB (*cyclic diguanylate-regulated TPS partner A/B* ; Borlee *et al.*, 2010). CdrA est une adhésine impliquée dans le maintien de l'intégrité structurale de la matrice des biofilms et l'auto-agrégation des bactéries.

Le 3^e TPS ayant été caractérisé fonctionnellement est PdtAB (*PA0690* et *PA0692* ; *phosphate depletion regulated TPS partner A/B*). La fonction moléculaire de PdtA n'est pas encore connue mais ce système joue un rôle dans la pathogénicité de *P. aeruginosa* envers le nématode *Caenorhabditis elegans* (Faure *et al.*, 2014). Deux autres TPS identifiés chez *P. aeruginosa* sont des systèmes CDI (*contact dependent growth inhibition*). Ces deux TPS, codés par les gènes *PA2462/2463* et *PA0040/0041*, sont nécessaires à la compétition bactérienne et à la formation de biofilm (Mercy *et al.*, 2016). Une protéine immunitaire est associée au système pour protéger la bactérie des effets de la toxine apparentée et est codée par un gène présent sur le locus des systèmes CDI. Plus récemment, un 6^e TPS, ExlBA, a été découvert chez les souches de type PA7 (*exolysine A/B*). La fonction d'ExlBA est étudiée au sein de l'équipe PBRC et étant le sujet principal de ce manuscrit, il va être plus amplement décrit dans le paragraphe suivant ([Introduction/Chapitre 2.2.d](#)).



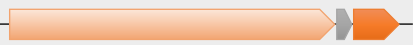

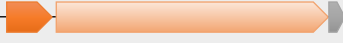

TPS	Organisation génétique (<i>tpsB/tpsA</i>)	Activité de l'effecteur TpsA
LepBA		Protéase
CdrAB		Adhésine
PdtA/PdtB		Non identifiée
CDI-1		Inhibition de la croissance bactérienne
CDI-2		Inhibition de la croissance bactérienne
ExlBA		Cytolysine/hémolysine

Tableau 2 : Six TPS ont été identifiés chez *P. aeruginosa*.

d. ExlBA, le nouveau TPS/SST5b de *P. aeruginosa*

ExlBA est un système codé par deux gènes consécutifs (*PSPA7_4641* et *PSPA7_4642*) présents uniquement chez les souches de type PA7 (Elsen *et al.*, 2014; Reboud *et al.*, 2017a). A ce jour, aucune souche de *P. aeruginosa* possédant à la fois le SST3 et ExlBA n'a été identifiée. Comme pour tous les constituants de SST5, les protéines ExlB et ExlA possèdent un peptide signal en N-terminal et sont probablement transportées dans le périplasme de la bactérie par le système d'export Sec ([Fig. 15](#)).

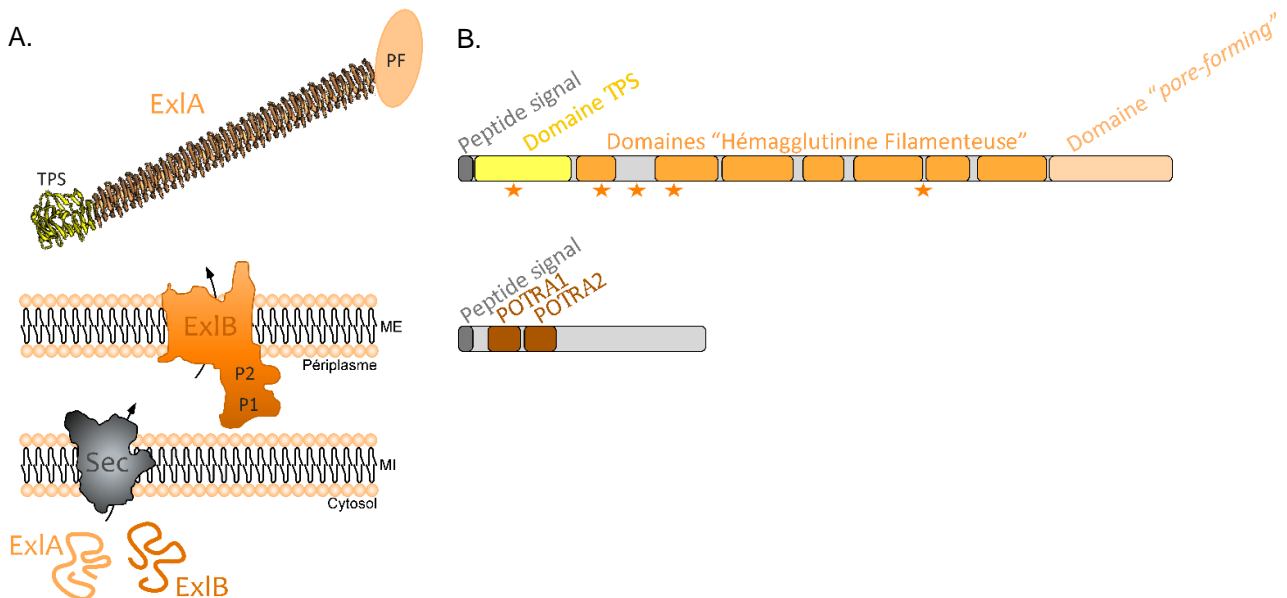


Figure 15 : Le TPS ExlBA (d'après Reboud *et al.*, 2017).

A) Représentation schématique des deux partenaires du système TPS ExlBA. Les deux protéines ExlA et ExlB sont transloquées jusqu'au périplasma par le système Sec grâce à leur peptide signal N-terminal. ExlB forme un pore de translocation dans la membrane externe. ExlA est représentée structurée en hélices β , avec le domaine N-terminal TPS en jaune et le domaine « pore-forming » (PF) en saumon. ME : membrane externe, MI : membrane interne, P1 et P2 : POTRA 1 et 2. B) Représentation linéaire des protéines ExlA et ExlB, montrant le domaine TPS en jaune, les domaines « hémagglutinine filamenteuse » en orange, le domaine « pore-forming » en saumon et les domaines POTRA en marron. Les séquences signal sont indiquées en gris foncé. Les 5 motifs RGD d'ExlA sont représentés par des étoiles oranges.

i. Le transporteur ExlB

ExlB est une protéine de 60kDa qui s'insère dans la membrane externe pour permettre le transport d'ExlA vers le milieu extracellulaire. Il a été démontré que ses deux domaines périplasmiques POTRA étaient nécessaires à cet export (Basso *et al.*, 2017a).

ii. L'exolysine ExlA

L'exolysine, ou ExlA, est une protéine de 172kDa, appartenant à la famille des toxines polymorphiques (Fig. 15.B ; Basso *et al.*, 2017a). Ces toxines possèdent plusieurs domaines qui ont chacun une fonction définie et présentent une grande diversité fonctionnelle au niveau du domaine C-terminal (Zhang *et al.*, 2012). L'extrémité N-terminale d'ExlA comprend un domaine TPS, probablement impliqué dans la sécrétion de la protéine. ExlA possède plusieurs domaines « hémagglutinine filamenteuse » identifiés chez l'adhésine FHA de *B. pertussis* (Relman *et al.*, 1989). 5 motifs RGD (arginine-glycine-acide aspartique), connus pour jouer un rôle dans l'interaction intercellulaire par leur capacité de liaison aux intégrines (Ruoslahti, 1996), sont également présents mais leur mutation en RGA (arginine-glycine-alanine) n'a pas eu d'impact sur la toxicité d'ExlA (Basso *et al.*, 2017a). Finalement, l'extrémité C-terminale confère à cette protéine une activité cytolytique (Basso *et al.*, 2017a).

Une comparaison de séquences a permis d'identifier plusieurs homologues d'ExlA. L'exolysine partage ainsi 35% d'identité avec ShlA de *Serratia marcescens*, 34% d'identité avec ChlA de *Chromobacterium violaceum* et enfin de 28% à 33% d'identité avec les toxines Hpma de *Proteus mirabilis*, EthA de *Edwardsiella tarda* et PhlA de *Photobacterium luminescens* (Elsen *et al.*, 2014). Tous ces homologues sont des hémolysines sécrétées par un système TPS (Brumbach *et al.*, 2007; Guérin *et al.*, 2017). Des orthologues d'ExlA ont également été identifiés dans différentes espèces de *Pseudomonas*, notamment chez *fluorescens*, *protegens* et *entomophila* (Basso *et al.*, 2017b). Ces toxines provoquent les mêmes effets qu'ExlA sur les macrophages (voir paragraphe suivant).

iii. Interactions d'ExlBA avec la cellule eucaryote et réponse cellulaire

ExlA est une toxine "pore-forming" qui induit la perméabilisation de la membrane plasmique des cellules eucaryotes (Elsen *et al.*, 2014; Basso *et al.*, 2017a). Le pore formé par l'exolysine dans la membrane eucaryote mesure environ 1,6 nm de diamètre (Basso *et al.*, 2017a).

Il a été observé au laboratoire que la protéine ExlA seule, provenant d'un surnageant de culture ou recombinante, est incapable d'induire la lyse des cellules épithéliales. De même, la présence d'une membrane qui sépare les cellules et les bactéries lors d'une infection en système Transwell empêche la perméabilisation des membranes eucaryotes médiée par ExlA. L'effet cytotoxique de cette toxine semble donc nécessiter une certaine proximité entre les bactéries et les cellules eucaryotes. Effectivement, il a été démontré que les T4_aP étaient nécessaires pour l'action d'ExlA sur les cellules eucaryotes (Basso *et al.*, 2017a). Ces appendices extracellulaires permettraient ainsi de rapprocher les bactéries des cellules eucaryotes cibles et d'induire une proximité entre ExlA et la membrane eucaryote.

Différents travaux menés au sein de l'équipe ont démontré que les effets d'ExlA sur la cellule eucaryote cible varient selon le type cellulaire (Fig. 16). La formation d'un pore dans la membrane plasmique des macrophages par ExlA entraîne un efflux potassique qui active la voie NLRP3 de l'inflammasome. Cela active la caspase-1, qui permet alors la maturation de l'IL-1 β à partir de pro-IL-1 β et déclenche la mort des macrophages par pyroptose (Basso *et al.*, 2017b). Le pore formé par ExlA au niveau de la membrane des cellules épithéliales et endothéliales induit, quant à lui, un influx massif d'ions calciques vers le cytosol. Cela provoque la dissociation du complexe calmoduline/ADAM10, la calmoduline ayant une forte affinité pour le calcium, et permet la maturation de la protéase ADAM10. Celle-ci est alors exportée à la membrane plasmique pour exercer son activité protéolytique envers la E-cadhérine et VE-cadhérine, deux protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité tissulaire de l'épithélium et l'endothélium respectivement. Cette protéolyse induit ainsi la rupture des jonctions adhérentes intercellulaires (Reboud *et al.*, 2017b).

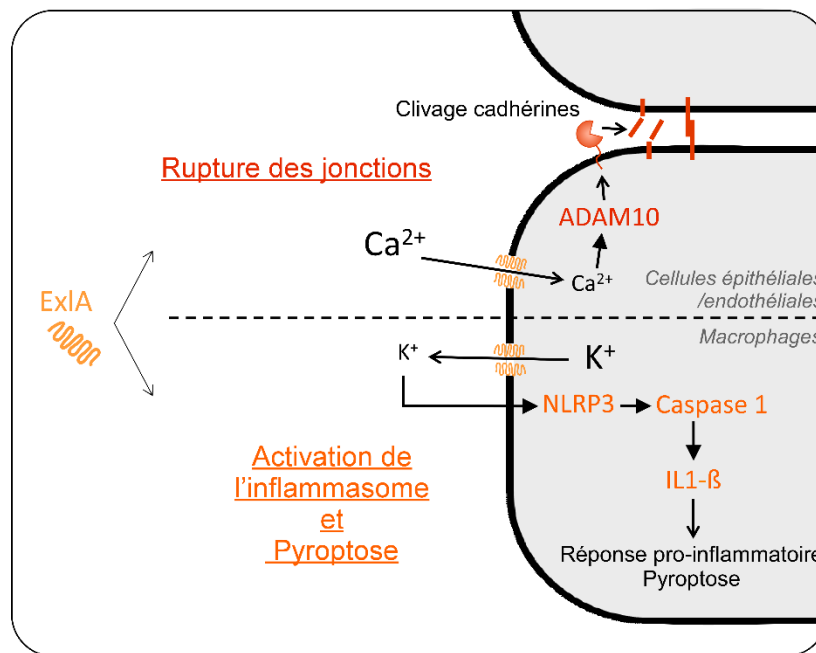


Figure 16 : Les effets cytotoxiques d'ExlA diffèrent selon le type cellulaire.

ExlA induit une rupture des jonctions intercellulaires des cellules épithéliales et endothéliales, et induit la mort des macrophages avec activation de l'inflammasome. Ca²⁺ : ions calciques, K⁺ : ions potassiques.

Enfin, l'étude des effets d'ExlA chez un modèle murin de pneumonie aiguë a mis en évidence le caractère nécrotique de la toxine, qui induit des dommages importants au niveau du tissu pulmonaire. De plus, l'exolysine participe à la dissémination bactérienne chez la souris (Bouillot *et al.*, 2017).

L'étude *in vivo* de l'action d'ExlA est encore en cours, tout comme l'identification du ou des récepteur(s) eucaryote(s) de cette toxine. En effet, les toxines "pore-forming" ont besoin d'interagir avec un récepteur eucaryote spécifique pour pouvoir s'insérer dans la membrane des cellules eucaryotes. Il est généralement de nature lipidique ou protéique et souvent associé aux radeaux lipidiques membranaires (Dal Peraro and van der Goot, 2016).

3. Autres facteurs de virulence

D'autres facteurs de virulence sont synthétisés par *P. aeruginosa* et contribuent à sa pathogénicité. Certains d'entre eux sont cités dans ce manuscrit et vont donc être brièvement présentés.

L'un des deux modes de vie de *P. aeruginosa* est associé aux biofilm, dont la formation et le maintien de l'intégrité architecturale sont assurés, entre autres, par les exopolysaccharides. Les principaux exopolysaccharides de *P. aeruginosa* sont Psl, Pel et les alginate. Ils ont également un rôle d'adhésine, participant à la colonisation de *P. aeruginosa* (Ben Haj Khalifa *et al.*, 2011; Gellatly and Hancock, 2013).

P. aeruginosa produit et sécrète deux pigments, la pyocyanine et la pyoverdine, qui peuvent avoir un rôle dans la virulence bactérienne. La pyocyanine possède plusieurs effets néfastes, dont l'inhibition de la réponse immunitaire de l'hôte, l'induction de l'apoptose des neutrophiles et un rôle oxydoréducteur (Kipnis *et al.*, 2006; Gellatly and Hancock, 2013). La pyoverdine est un sidérophore majeur de *P. aeruginosa* qui présente un rôle important pour l'établissement d'une infection de par sa capacité de chélation du fer, nutriment essentiel à la croissance bactérienne. C'est aussi une molécule signal qui permet l'expression d'autres facteurs de virulence (Gellatly and Hancock, 2013; Minandri *et al.*, 2016).

Enfin, le feuillet externe de la membrane externe des bactéries à gram négatif est notamment recouvert de lipopolysaccharides (LPS). Il s'agit de glycolipides complexes, composés du lipide A, qui ancre le LPS à la membrane, d'un oligosaccharide puis d'un polysaccharide O. Ce dernier est soit homopolymère et appelé antigène polysaccharide commun (CPA, *common polysaccharide antigen*) soit hétéropolymère et dit antigène spécifique O (OSA, *O-specific antigen*) (Lam *et al.*, 2011). Contrairement au CPA, l'antigène spécifique O diffère selon les souches et permet le sérotypage bactérien (20 sérotypes identifiés chez *P. aeruginosa*). Les LPS jouent un rôle dans l'adhésion des bactéries et sont impliqués dans l'interaction avec les cellules hôtes. Le LPS contenant l'OSA stimule également la réponse inflammatoire de l'hôte et protège les bactéries contre les effets toxiques du complément présent dans le sérum (Priebe *et al.*, 2004; Pier, 2007; Lam *et al.*, 2011; Gellatly and Hancock, 2013).

Chapitre 3

La régulation de la virulence de *Pseudomonas aeruginosa*

Malgré la présence des gènes codant pour la plupart des facteurs de virulence sur le génome des souches de *P. aeruginosa*, un gradient de pathogénicité existe entre elles (Hilker *et al.*, 2015). En effet, de nombreux systèmes de régulation permettent aux bactéries de contrôler la synthèse de ces facteurs de virulence, qui peut aussi être affectée et modulée par des mutations génétiques ou des régulateurs codés par des gènes présents sur le génome « accessoire ».

Le réseau de régulation de *P. aeruginosa* est particulièrement complexe puisqu'il est composé d'un nombre important de régulateurs, qui sont majoritairement des facteurs sigma, des facteurs de transcription, des systèmes de régulation à deux composants et des petits ARN régulateurs. Ce réseau complexe repose sur des interconnexions entre les différents régulateurs, ce qui permet d'intégrer de nombreux signaux afin d'augmenter la précision de régulation du métabolisme et de la virulence de *P. aeruginosa*.

1. Les principales familles de régulateurs de *P. aeruginosa*

a. Les facteurs sigma

Les facteurs sigma (σ) sont des sous-unités de l'ARN polymérase permettant la reconnaissance spécifique des promoteurs et participant à l'initiation de la transcription.

Le génome de *P. aeruginosa* possède un grand nombre de gènes codants pour des facteurs sigma, 24 identifiés chez PAO1 et 26 chez PA14, dont RpoD (σ^{70}) qui est responsable de l'initiation de la transcription de la plupart des gènes « de ménage » essentiels à la survie de la bactérie (Potvin *et al.*, 2008; Chevalier *et al.*, 2018). *P. aeruginosa* dispose également de facteurs sigma alternatifs dont les σ ECF (*extracytoplasmic factor*) activés par des signaux environnementaux et modulant, entre autres, la virulence bactérienne (Potvin *et al.*, 2008). σ^{vrel} (*virulence regulator involving ECF sigma factor*), par exemple, est un facteur sigma ECF appartenant au système de Signalisation de Surface Cellulaire (CSS, *cell surface signaling*) PUMA3 et qui induit la toxicité de *P. aeruginosa* en régulant l'expression de gènes codant pour des facteurs de virulence en réponse à la déplétion en phosphate (Llamas *et al.*, 2009; Quesada *et al.*, 2016 ; [Introduction/Chapitre 4.1](#)). Les systèmes CSS jouent un rôle important dans la régulation transcriptionnelle et sont généralement composés de 3 partenaires (un récepteur de la membrane externe, un facteur anti-sigma et un facteur sigma), qui détectent un signal extracellulaire pour le transmettre au niveau cytoplasmique (Llamas *et al.*, 2014). Plus récemment décrit, le σ ECF SigX répond au stress de l'enveloppe cellulaire et est impliqué dans la modulation de la virulence bactérienne, en régulant par exemple la synthèse l'exotoxine A et de la pyocyanine (Gicquel *et al.*, 2013; Chevalier *et al.*, 2018). D'autres facteurs sigma alternatifs impliqués dans le contrôle de la virulence existent chez *P. aeruginosa*, comme RpoN (σ^{54}) qui régule notamment la formation du flagelle et des T₄P, ou RpoS (σ^{38}) qui est actif en phase stationnaire de croissance et le régulateur majeur de la réponse au stress (Potvin *et al.*, 2008). Ce dernier contrôle entre autres la synthèse des régulateurs transcriptionnels du Quorum Sensing (QS) LasR et RhIR.

b. Les facteurs de transcription

Les facteurs de transcription (FT) sont des protéines capables de se lier à des séquences d'ADN spécifiques pour activer et/ou inhiber la transcription de gènes (Browning and Busby, 2016). Généralement, les FT activateurs facilitent le recrutement de l'ARN polymérase en se liant en amont des boîtes promotrices ou près de la boîte -35. À l'inverse, une grande majorité des FT répresseurs empêchent l'accès de l'ARN polymérase au promoteur en créant un encombrement

stérique par leur fixation sur les boîtes promotrices ou en formant une boucle d'ADN lorsque deux facteurs se fixent à deux sites distants.

Le génome de *P. aeruginosa* PAO1 code pour 419 FT (www.p2tf.org ; Ortet *et al.*, 2012), classés en différentes familles sur la base des identités de domaines protéiques. Les deux familles les plus représentées sont LysR et AraC/XylS, regroupant 50% des FT de PAO1. La famille de FT LysR est extrêmement conservée et très répandue chez les bactéries (Maddocks and Oyston, 2008). Ses membres possèdent un domaine N-terminal conservé de liaison à l'ADN, avec un motif « Hélice-Tour-Hélice » (HTH) d'environ 60 résidus, et un domaine C-terminal d'interaction avec un co-inducteur, qui est souvent un produit ou un intermédiaire de voies métaboliques. Les facteurs de type LysR sont des « régulateurs doubles » pouvant être à la fois activateurs et répresseurs de la transcription de gènes impliqués dans des fonctions très variées, comme le métabolisme, la motilité, la détoxification ou la virulence. *P. aeruginosa* possède plus de 100 FT de type LysR, dont PqsR et AmpR (Reen *et al.*, 2013). La famille AraC/XylS est composée d'un grand nombre de FT, principalement impliqués dans l'activation du métabolisme et de la virulence (Gallegos *et al.*, 1997; Ibarra *et al.*, 2008). Ces FT sont présents chez divers genres bactériens et ont une structure comprenant un domaine de liaison à l'ADN C-terminale conservé possédant deux motifs HTH et généralement un ou plusieurs domaines N-terminaux non conservés. Un exemple de FT de la famille AraC/XylS chez *P. aeruginosa* est le régulateur ExsA, qui est le principal activateur contrôlant la transcription des gènes codant pour le SST3 (Hovey and Frank, 1995; Yahr and Frank, 1994). Finalement, les FT de type LuxR sont moins nombreux chez *P. aeruginosa* mais également importants pour la virulence bactérienne puisqu'ils font partie du QS (Chen and Xie, 2011 ; [Introduction/Chapitre 3.2.b](#)). Ces régulateurs ont besoin d'interagir avec un co-inducteur de type acyl-homosérine lactones pour réguler la transcription de leurs cibles. Ils possèdent deux domaines conservés : un domaine de liaison à l'ADN en C-terminal et un domaine d'interaction avec le co-inducteur en N-terminal. Chez *P. aeruginosa* PAO1, 13 gènes codent pour des facteurs de type LuxR, dont quatre sont caractérisés : LasR, RhlR, QscR et VqsR (www.p2tf.org ; Lee and Zhang, 2015).

c. Les systèmes de régulation à deux composants

Les systèmes de régulation à deux composants (TCS, *two component systems*) permettent de détecter et transmettre un signal généralement environnemental afin d'induire une réponse adaptée (Jung *et al.*, 2012; Balasubramanian *et al.*, 2013). Un TCS simple est composé d'une histidine kinase (HK) « senseur », généralement localisée dans la membrane interne et agissant en dimère, et d'un régulateur de réponse (RR) cytoplasmique. La transduction du signal entre les deux partenaires se fait par un mécanisme de transfert de phosphate (Fig. 17). La détection d'un stimulus par le domaine « *input* » de l'HK induit l'autophosphorylation d'un résidu histidine (H)

conservé sur le domaine « transmetteur ». Ce groupe phosphoryle est ensuite transféré sur un résidu aspartate (D) conservé du domaine « receveur » (REC) du RR, ce qui induit un changement conformationnel activant le domaine fonctionnel « *output* » de cette protéine qui est généralement un domaine de liaison à l'ADN (Jung *et al.*, 2012; Balasubramanian *et al.*, 2013). Pour certains systèmes, la transduction du signal entre les deux partenaires nécessite un phosphorelay complexe. En effet, les HK hybrides et non orthodoxes contiennent, en plus d'un domaine « transmetteur », un domaine REC C-terminal (Fig. 17). Un domaine Histidine-phosphotransfert (Hpt) intermédiaire est donc nécessaire pour phosphoryler le domaine REC du RR : il est soit intégré sur les HK non orthodoxes soit présent sur une protéine indépendante (Fig. 17 ; Balasubramanian *et al.*, 2013 ; Jung *et al.*, 2012). Un autre niveau de complexité est apporté aux TCS lorsque plusieurs HK ou plusieurs RR collaborent au sein d'un même système. Ces complexifications des TCS permettent à la bactérie de détecter et d'intégrer de multiples signaux au sein d'un même système de régulation afin d'avoir un meilleur contrôle de son comportement en réponse à l'environnement.

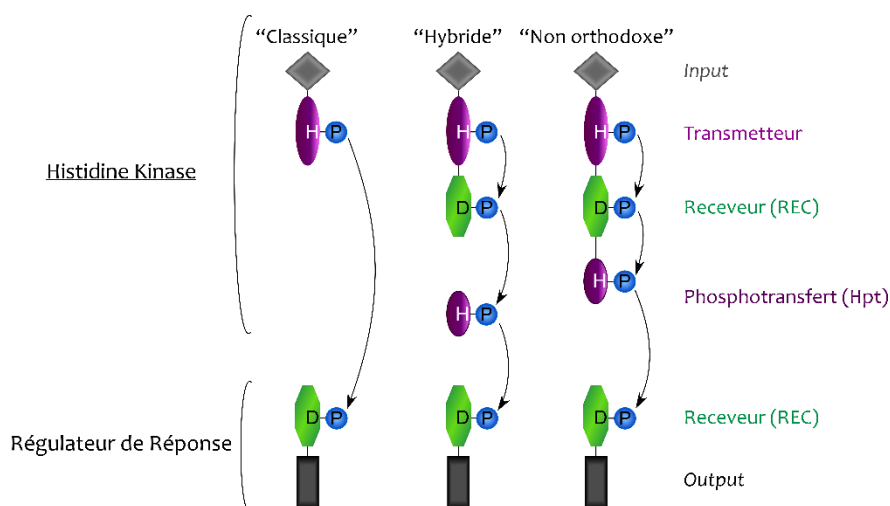


Figure 17 : Organisation structurale des partenaires de TCS.

Représentation schématique des domaines des HK et des RR. L'activation du RR par transfert de groupe phosphoryle peut se faire en une ou plusieurs étapes, selon le type d'HK.

H : histidine conservée des domaines « transmetteurs », D : aspartate conservé des domaines « receveurs ».

Avec environ 127 protéines impliquées dans un TCS, ces systèmes sont particulièrement représentés chez *P. aeruginosa*, en comparaison notamment des 60 protéines codées par le génome d'*E. coli*, et plus de 50% d'entre eux sont en lien avec la régulation de la virulence (Balasubramanian *et al.*, 2013; Francis *et al.*, 2017). Le système GacS/GacA est l'un des TCS les plus importants impliqués dans la transition aiguë/chronique chez *P. aeruginosa* ; il sera décrit dans la 2^e partie de ce chapitre (Introduction/Chapitre 3.2.a). Le TCS FimS/AlgR (aussi connu sous le nom AlgZ/AlgR) joue également un rôle notable en modulant, entre autres, la motilité bactérienne : le RR AlgR activé par l'HK FimS se lie à la région promotrice de l'opéron

fimUpilVWXY₁Y₂E afin d'induire la transcription des gènes et permettre l'assemblage du T4_aP (Lizewski *et al.*, 2002; Belete *et al.*, 2008; Okkotsu *et al.*, 2013, 2014; Kong *et al.*, 2015). Deux TCS jouent un rôle majeur dans l'activation de la synthèse des deux messagers secondaires AMPc et di-GMPc, régulateurs globaux de la virulence de *P. aeruginosa*. L'HK ChpA et le RR PilG forment un TCS important pour la transduction du signal par le système Pil/Chp et permettent ainsi l'activation de la synthèse d'AMPc par CyaB (Persat *et al.*, 2015; Inclan *et al.*, 2016 ; [Introduction/Chapitre 3.2.c.i](#)). En parallèle, le système de type chimiosensoriel Wsp permet de contrôler la production de di-GMPc grâce au TCS WspE/WspR/WspF. Le transfert du phosphate de l'HK WspE à la DGC WspR induit la synthèse de di-GMPc alors que le RR WspF phosphorylé permet un rétrocontrôle négatif du système (Hickman *et al.*, 2005; Güvener and Harwood, 2007; O'Connor *et al.*, 2012 ; [Introduction/Chapitre 3.2.c.ii](#)).

d. Les petits ARN régulateurs

Les petits ARN régulateurs bactériens (50 à 400 nucléotides, ARN) sont des ARN non-codants qui jouent le rôle de régulateurs post-transcriptionnels (Dutta and Srivastava, 2018). Généralement, ils agissent en s'hybridant sur leur(s) ARNm cible(s) afin de moduler négativement leur stabilité ou leur traduction (Sonnleitner *et al.*, 2012; Dutta and Srivastava, 2018). Ils peuvent également avoir un rôle positif, comme le petit ARN PhrS qui régule la synthèse de PQS et de pyocyanine en empêchant la formation d'une structure qui inhibe la traduction de l'ARNm codant pour le régulateur transcriptionnel PqsR (Sonnleitner *et al.*, 2011 ; [Introduction/Chapitre 3.2.c](#)). Dans certains cas, les petits ARN régulateurs interagissent avec des régulateurs protéiques post-transcriptionnels afin de les séquestrer : cela est le cas chez *P. aeruginosa* des ARN RsmY, RsmZ, RsmW et RsmV (Sonnleitner *et al.*, 2012 ; [Introduction/Chapitre 3.2.a](#)). La protéine chaperonne Hfq, qui contrôle la stabilité et la traduction de certains ARNm, peut également intervenir pour moduler la stabilité des petits ARN régulateurs et faciliter leur interaction avec une cible (Vogel and Luisi, 2011; Pita *et al.*, 2018).

Alors que 233 et 573 petits ARN régulateurs ont été identifiés chez PA14 et PA01 respectivement (dont au moins 126 communs aux deux souches), seuls 14 d'entre eux ont été caractérisés (Pita *et al.*, 2018).

2. Le réseau de régulation de la virulence de *P. aeruginosa*

Quatre grandes voies se distinguent comme des éléments clés qui optimisent la régulation de la pathogénicité de *P. aeruginosa* et assurent la transition aiguë/chronique : QS, Gac/Rsm,

AMPC/Vfr, di-GMPc. Elles forment un réseau de régulation particulier qui permet probablement à la bactérie d'intégrer de nombreux signaux extracellulaires, qui ne sont pas encore tous identifiés. Généralement, les facteurs de virulence sont régulés à la fois par des facteurs spécifiques et par ce réseau de régulation global.

a. Le Quorum Sensing

Le QS est un système de communication inter-bactérie permettant de coordonner les comportements en fonction de la densité de la population bactérienne. Il repose sur la détection de molécules, dites auto-inducteurs (AI), synthétisées par les bactéries puis relarguées dans le milieu externe. En milieu confiné, ces molécules s'accumulent et leurs concentrations intra et extracellulaires s'équilibrent. Au-delà d'une concentration seuil, les AI se lient à des récepteurs bactériens spécifiques qui sont des FT et permettent de réguler l'expression d'un grand nombre de gènes (Papenfort and Bassler, 2016; Moradali *et al.*, 2017).

Chez *P. aeruginosa*, le QS forme un réseau englobant 4 systèmes inter-connectés qui utilisent 3 familles d'AI différentes : les acyl-homosérine lactones, les quinolones et les carbaldéhydes (Fig. 18.A ; Lee and Zhang, 2015; Papenfort and Bassler, 2016; Turkina and Vikström, 2018). Les deux principales voies du QS de *P. aeruginosa* sont *las* et *rhl* (Fig. 18.A). LasI et RhlI sont des synthétases qui activent la production des AI N-3-oxo-dodecanoyl-homosérine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL) et N-butyryl-homosérine lactone (C₄-HSL), respectivement. Ces molécules se lient à leurs récepteurs cytoplasmiques de type LuxR, LasR et RhlR, et stimulent leur fonction d'activateurs transcriptionnels. Les systèmes *las* et *rhl* régulent à eux deux près de 10% du génome de *P. aeruginosa* (Schuster and Greenberg, 2006). La voie *pqs* (*Pseudomonas quinolone signal*) utilise l'AI 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (PQS) : le précurseur 2-heptyl-4-quinolone (HHQ) est synthétisé par l'opéron *pqsABCD* puis converti en PQS par l'enzyme PqsH (Fig. 18.A). PQS interagit avec son récepteur spécifique PqsR, un régulateur transcriptionnel de type LysR aussi capable d'interagir avec HHQ (Xiao *et al.*, 2006). Finalement, le système *iqs* (*integrated quorum sensing*), activé en réponse à une déplétion en phosphate, dépend de l'AI 2-(2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldéhyde (IQS ; Fig. 18.A). Il semble que la production de cet auto-inducteur, dont le récepteur est encore inconnu, dépende de la voie de synthèse de la pyochéline. D'autres régulateurs dits « orphelins » peuvent intervenir dans le QS, tels QscR et VqsR qui régulent notamment les voies *las* et *rhl* (Lee and Zhang, 2015).

Les 4 systèmes du QS de *P. aeruginosa* sont interconnectés et se régulent entre eux de manière hiérarchisée (Fig. 18.B). Alors que le système *las* active les 3 autres, les systèmes *rhl* et *pqs* se régulent entre eux (*rhl* inhibe *pqs* alors que *pqs* active *rhl*) et la voie *iqs* active ces deux derniers systèmes (Lee and Zhang, 2015; Papenfort and Bassler, 2016; Turkina and Vikström, 2018). Grâce à cette hiérarchie, le QS contrôle l'expression des gènes selon une dimension

temporelle, en fonction de la croissance (Pesci *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 2003; Schuster *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2011; Davenport *et al.*, 2015). Par exemple, le système *las* est actif en phase exponentielle plus tôt que *rhl*, qui agira principalement en phase stationnaire de croissance.

Le QS régule la transcription de gènes en lien avec la motilité, la formation de biofilm, la virulence ou encore la résistance aux antibiotiques. La synthèse de la protéase alcaline AprA et de la toxine ToxA est par exemple activée par les systèmes *las* et *rhl*. Avec le système *pqs*, ces deux voies activent également la production de pyocyanine et des rhamnolipides nécessaires au *swarming* et à la formation de biofilm. De plus, la voie *pqs* active la transcription de *lasB* et le système *rhl* inhibe l'expression des gènes codant pour le SST3 (sauf *exsCEBA*), seul exemple connu de répression par RhlR (McKnight *et al.*, 2000; Bleves *et al.*, 2005). Le régulon du système *iqs* reste, quant à lui, encore méconnu (Lee and Zhang, 2015; Turkina and Vikström, 2018).

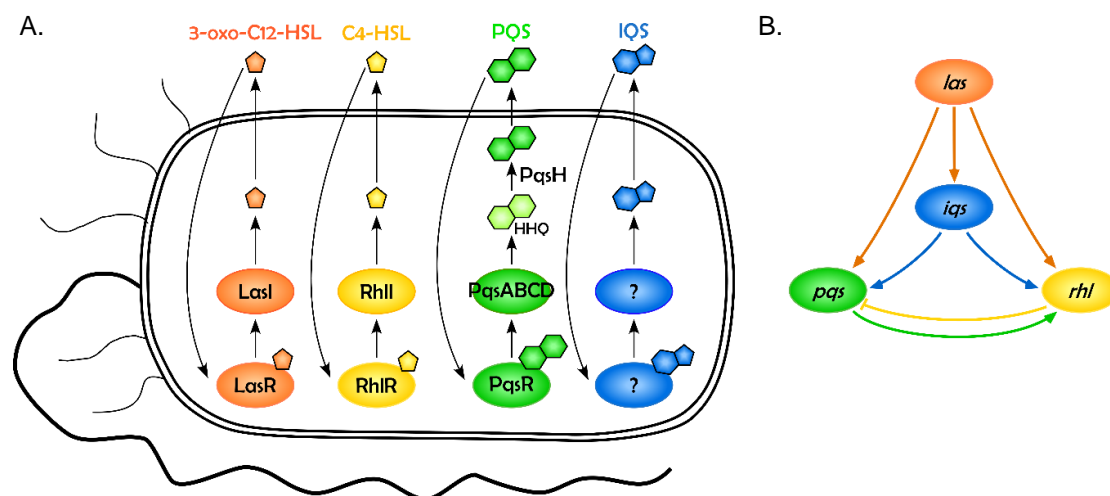


Figure 18 : Les 4 systèmes du Quorum Sensing de *P. aeruginosa* (d'après Lee and Zhang, 2015 ; Pappenfort and Bassler, 2016 ; Turkina and Vikström, 2018).

- A) Schéma représentant les 4 voies du QS : *las* (orange), *rhl* (jaune), *pqs* (vert) et *iqs* (bleu).
 B) Les interactions de contrôle entre les systèmes du QS sont représentées en respectant le même code couleur.

Un cinquième système appartenant au QS de *P. aeruginosa* vient d'être découvert : le système *ods* (*oxylipins-dependent QS system*), utilisant les oxylipines comme AI (Martínez *et al.*, 2019).

b. Le système Gac/Rsm

Le système Gac/Rsm est composé du TCS complexe GacS/GacA, des petits ARN régulateurs RsmY et RsmZ et du régulateur post-transcriptionnel RsmA (Fig. 19). Il joue un rôle prépondérant dans le contrôle de la transition aiguë/chronique.

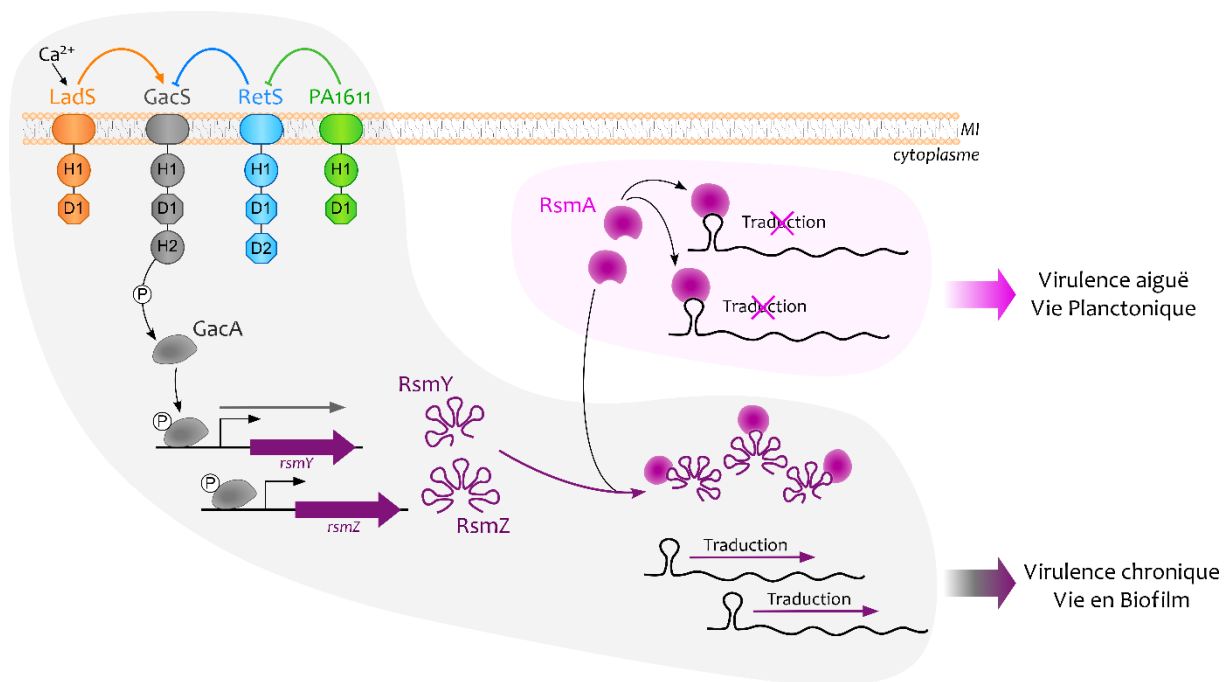


Figure 19 : Schématisation de la voie de régulation Gac/Rsm de *P. aeruginosa*.

Le schéma représente la signalisation du TCS GacS/GacA et la régulation exercée par RsmA et les petits ARN RsmY et RsmZ. L'HK GacS est régulée par LadS, RetS et PA1611 (les mécanismes de régulation sont indiqués avec le même code couleur que celui utilisé pour schématiser les protéines). Une fois phosphorylé, le RR GacA active la transcription de *rsmY* et *rsmZ*, en agissant probablement en homodimère. Les petits ARN régulateurs RsmY et RsmZ vont alors séquestrer RsmA pour l'empêcher d'inhiber post-transcriptionnellement ses ARNm cibles. RsmY et RsmZ présentent des structures « en épingle » qui favorisent une forte affinité pour la liaison de RsmA. L'activation de la traduction d'ARNm par RsmA n'est pas représentée car il s'agit d'un mécanisme minoritaire. Les domaines « transmetteurs » sont notés « H » et les domaines « receveurs » sont notés « D ». MI : membrane interne.

GacS est une HK non orthodoxe qui possède un domaine périplasmique PDC/PAS atypique, nécessaire pour la transduction du signal vers GacA (Ali-Ahmad *et al.*, 2017). Lorsque GacS est activée, par un signal non identifié, et s'autophosphoryle, le phosphate est transféré au RR GacA qui va alors activer l'expression de ses deux cibles, les petits ARN non codants RsmY et RsmZ. Ceux-ci ont pour rôle de séquestrer RsmA, une protéine liant les ARN, afin de l'empêcher d'agir sur ses ARN cibles (Fig. 19 ; Brennic *et al.*, 2009). RsmA est une protéine de la famille CsrA qui se lie aux ARNm afin d'affecter leur stabilité ou réprimer leur traduction. Cependant, ce régulateur peut également avoir un rôle positif direct sur certains ARNm. Le mécanisme de régulation par RsmA a été caractérisé chez *P. aeruginosa* pour 2 cibles. Ce régulateur inhibe la synthèse des exopolysaccharides Psl en se liant sur l'extrémité 5'-UTR des ARNm Psl, ce qui induit la formation d'une structure en épingle et empêche le recrutement des ribosomes sur le site RBS pour la traduction des ARNm (Fig. 20 ; Irie *et al.*, 2010). A l'inverse, RsmA active directement la synthèse des protéines codées par l'opéron *phz2*, impliquées dans la production d'acide phénazine-1-carboxylique, en prévenant la formation d'une structure secondaire qui masque le RBS et empêche la traduction des ARNm (Fig. 20 ; Ren *et al.*, 2014). Selon une étude

transcriptomique, RsmA contrôle environ 9% du génome de PAO1 (Burrowes *et al.*, 2006). Mulcahy *et al.* ont mis en évidence que l'absence de RsmA affecte négativement la colonisation et la dissémination de *P. aeruginosa* chez un modèle murin d'infection aiguë et à l'inverse favorise la persistance des bactéries dans le cas d'une infection chronique (Mulcahy *et al.*, 2008). En effet, ce régulateur post-transcriptionnel active la synthèse des facteurs de virulence aiguë et de motilité, en stimulant par exemple la synthèse de l'activateur transcriptionnel du SST3 ExsA ou celle du FT Vfr. Inversement, RsmA inhibe l'expression des gènes codant pour les facteurs de virulence chronique, tels que les 3 SST6, ou la formation de biofilm (Burrowes *et al.*, 2006; Brencic and Lory, 2009; Intile *et al.*, 2014; Vakulskas *et al.*, 2015; Allsopp *et al.*, 2017).

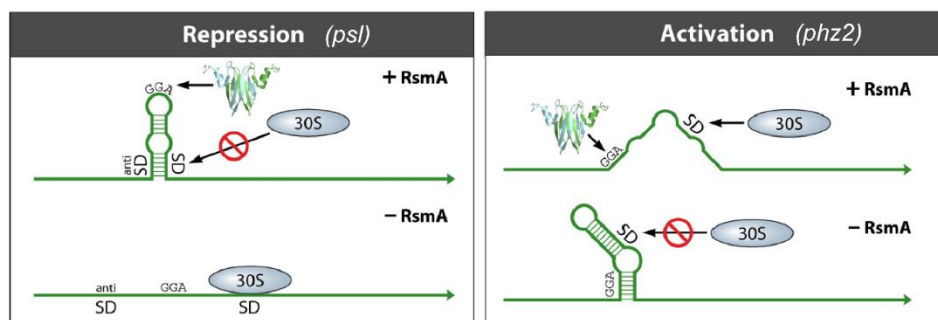


Figure 20 : Les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle de RsmA décrits chez *P. aeruginosa* (Vakulskas *et al.*, 2015).

Différents partenaires interagissent avec le système Gac/Rsm et lui permettent, entre autres, d'intégrer un nombre important de signaux (Lin *et al.*, 2006; Sorger-Domenigg *et al.*, 2007; Brencic and Lory, 2009; Bordi *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014).

GacS est par exemple contrôlée par 3 kinases membranaires : LadS, RetS et PA1611 (Fig. 19). L'HK hybride LadS active GacS en transférant un groupement phosphate de l'aspartate de son domaine REC D1 vers l'histidine du domaine « transmetteur » H2 de GacS (Fig. 19 ; Chambonnier *et al.*, 2016). L'HK non orthodoxe RetS interagit avec GacS pour empêcher sa phosphorylation : elle peut soit réprimer l'autophosphorylation de l'histidine du domaine H1 de GacS, soit transférer le groupe phosphorylé de ce domaine vers son propre domaine REC D2 ou encore activer la déphosphorylation du domaine D1 de GacS grâce à son activité phosphatase (Fig. 19 ; Goodman *et al.*, 2009; Francis *et al.*, 2018). Enfin, l'HK hybride PA1611 favorise l'activation de GacS en se liant et réprimant la kinase RetS (Kong *et al.*, 2013; Bhagirath *et al.*, 2017). Les signaux activant ces différentes HK sont encore amplement méconnus. Il a néanmoins été démontré que la phosphorylation de LadS était stimulée par le calcium et il est proposé que la formation d'hétérodimères entre RetS et GacS dépende de la liaison d'un ligand glucidique au niveau du domaine périplasmique DISMED2 de RetS (Vincent *et al.*, 2010; Broder *et al.*, 2016).

En plus de RsmY et RsmZ, RsmA peut être séquestrée par deux autres ARN régulateurs, RsmW et RsmV, dont la transcription n'est pas activée par GacA (Miller *et al.*, 2016; Janssen *et al.*,

2018a). Les quatre petits ARN régulateurs de *P. aeruginosa* sont exprimés de façon différentielle au cours de la croissance, ce qui permet un meilleur contrôle de RsmA (Janssen *et al.*, 2018a).

Finalement, un autre niveau de complexité est apporté à ce système de régulation par un homologue de RsmA qui interagit avec les quatre ARN régulateurs : RsmF, aussi nommé RsmN (Marden *et al.*, 2013; Morris *et al.*, 2013; Janssen *et al.*, 2018a). Alors que RsmA et RsmF partagent le même site de liaison consensus (GGA), les conditions de liaison de RsmF sont plus restrictives que celles de RsmA et nécessitent la présence de deux sites consensus sur les ARNm (Marden *et al.*, 2013; Schulmeyer *et al.*, 2016; Janssen *et al.*, 2018b). L'affinité de RsmF pour les petits ARN RsmY/RsmZ est ainsi beaucoup plus faible que celle de RsmA.

c. Les messagers secondaires

Les messagers secondaires sont des régulateurs allostériques qui ont la capacité de transmettre un signal en interagissant avec un effecteur. Les deux principaux second messagers de *P. aeruginosa* sont l'AMP-cyclique (AMPc, 3',5'-adénosine monophosphate cyclique) et le di-GMP-cyclique (di-GMPc, 3'-5' di-guanosine mono phosphate cyclique) (Pesavento and Hengge, 2009).

i. AMPc

L'AMPc est une molécule synthétisée par des adénylate cyclases qui sont au nombre de trois chez *P. aeruginosa* (Lory *et al.*, 2004). La principale source de synthèse de l'AMPc de cette bactérie est l'adénylate cyclase membranaire CyaB (Wolfgang *et al.*, 2003). La seconde enzyme, CyaA, est cytosolique et présente un rôle mineur. Enfin, la troisième adénylate cyclase est la toxine ExoY, qui n'est active que dans les cellules eucaryotes. Pour maintenir l'homéostasie du messager secondaire, la phosphodiesterase CpdA dégrade l'AMPc en AMP (Fig. 21 ; Fuchs *et al.*, 2010b).

La synthèse d'AMPc intracellulaire dans *P. aeruginosa* est modulée par la concentration en calcium extracellulaire, l'activité des adénylate cyclases étant activée par une déplétion en calcium (Wolfgang *et al.*, 2003; Inclan *et al.*, 2011). Cette condition stimule également la synthèse de CyaB chez la souche PAK (*P. aeruginosa* groupe 1). L'activité de CyaB est aussi modulée par le système mécanosenseur Pil/Chp en réponse au contact avec une surface solide. La tension exercée sur les T4aP induit une rétractation de la fibre qui modifie les interactions entre les sous-unités de piline majeure PilA et la protéine membranaire chimiotactique PilJ ; cela induit l'autophosphorylation de l'HK ChpA qui transfère son groupe phosphoryle au RR PilG afin de stimuler l'adénylate cyclase CyaB (Fig. 21 ; Fulcher *et al.*, 2010; Persat *et al.*, 2015; Inclan *et al.*, 2011; Silversmith *et al.*, 2016). Bien que cela n'ait pas été démontré, ce système induirait aussi la synthèse des facteurs de virulence AMPc-dépendants après contact avec des cellules eucaryotes. Récemment, il a été montré que l'activité de l'adénylate cyclase CyaB était réprimée par interaction directe avec la

protéine NadD2, dont la synthèse est inhibée par le répresseur transcriptionnel NrtR (Okon *et al.*, 2017; Jin *et al.*, 2019). Finalement, l'homéostasie de l'AMPC est contrôlée par le messager secondaire lui-même et dépend du fer, la synthèse de la phosphodiesterase CpdA étant activée par Vfr en présence d'une forte concentration en AMPC et son activité étant dépendante de ce métal (Fuchs *et al.*, 2010b).

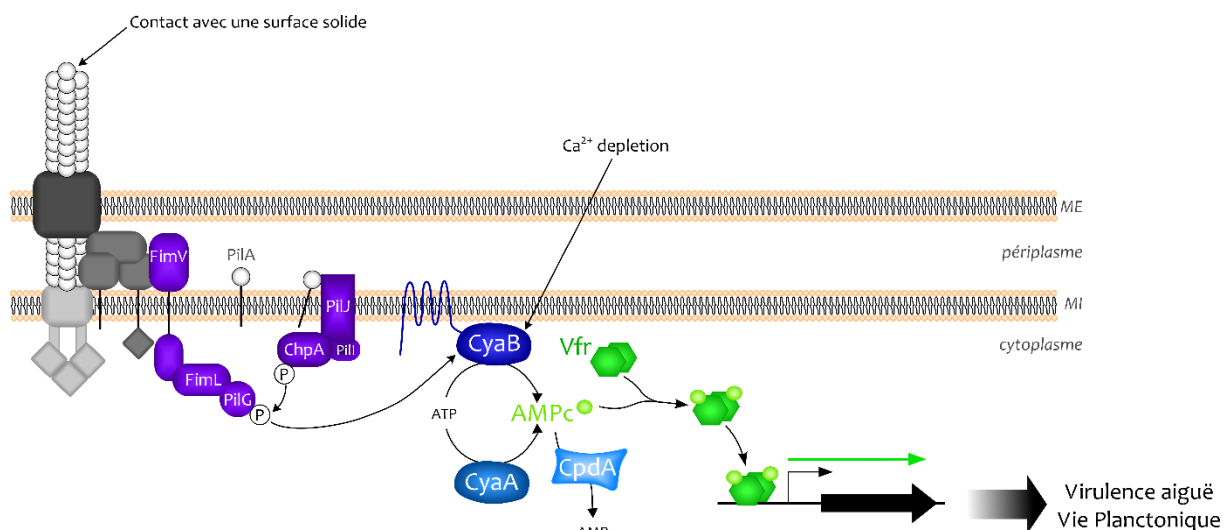


Figure 21 : Voie de régulation AMPc/Vfr chez *P. aeruginosa*.

L'AMPc est synthétisé par les adénylate cyclases CyaA et CyaB et est dégradé par la phosphodiesterase CpdA. L'activité de CyaB peut être stimulée par le système Pil/Chp. Vfr se lie spécifiquement sur l'ADN pour contrôler la transcription de son régulon majoritairement en présence d'AMPc. ME : membrane externe, MI : membrane interne.

L'effet de l'AMPc est lié à son rôle d'activateur allostérique du FT Vfr (*Virulence factor regulator*; Fig. 21; West *et al.*, 1994). Ce facteur appartient à la famille des protéines récepteurs de l'AMPc et partage 91% de similitude avec le représentant de cette famille, le régulateur global d'*E. coli* CRP (*cAMP Receptor Protein*; West *et al.*, 1994). Vfr est composé de deux domaines distincts, impliqués dans la liaison du ligand en N-terminal et dans la liaison à l'ADN en C-terminal. Comme CRP, la forme active de ce FT est un homodimère. La liaison de l'AMPc sur Vfr induit un changement conformationnel du régulateur qui favorise sa liaison à l'ADN (Serate *et al.*, 2011). Le FT Vfr a principalement été décrit pour activer les facteurs de motilité ou de virulence liés aux infections aiguës et possède un régulon très vaste (près de 200 gènes; Wolfgang *et al.*, 2003). Par exemple, en présence d'AMPc Vfr stimule la synthèse des T4_aP en favorisant la transcription du locus *fimS-*algR**, connu pour réguler l'expression de l'opéron *fimU-pilVWXYZ₁Y₂E* (Beatson *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2015). La transcription de l'activateur du SST3 est induite par l'interaction de Vfr avec le promoteur d'*exxA* (Wolfgang *et al.*, 2003; Marsden *et al.*, 2016). Le FT intervient également dans la régulation du QS, en modulant la transcription de *rhlR* grâce à quatre sites de liaison différents : trois sites activateurs et un site inhibiteur (Croda-García *et al.*, 2011). Finalement, Vfr exerce une autorégulation positive. De façon beaucoup plus rare, Vfr est aussi capable de moduler

l'expression de certains gènes en absence d'AMPc, comme cela a été démontré pour sa fixation sur le promoteur du gène *lasR* (Fuchs *et al.*, 2010a).

La protéine CbpA est également capable de lier l'AMPc, mais aucun rôle n'a été associé à cette interaction (Endoh and Engel, 2009).

ii. *di-GMPc*

Le di-GMPc est un messager secondaire connu pour être l'un des acteurs principaux de la transition du mode de vie mobile des bactéries au mode de vie en biofilm. En effet, un taux intracellulaire élevé en di-GMPc est associé à une perte de mobilité et à la formation de biofilm alors qu'un niveau faible permet un mode de vie planctonique (Ha and O'Toole, 2015). Afin de contrôler la concentration intracellulaire en di-GMPc, deux familles d'enzymes s'opposent : les diguanylate cyclases (DGC), possédant un domaine GGDEF (Glycine-Glycine-Aspartate-Glutamate-Phénylalanine), et les phosphodiésterases (PDE), disposant d'un domaine EAL (Glutamate-Alanine-Leucine) ou HD-GYP (Histidine-Aspartate-Glycine-Tyrosine-Proline). Les DGC permettent la synthèse du di-GMPc tandis que les PDE le dégradent (Fig. 22). Dans certains cas, une même protéine peut contenir à la fois un domaine GGDEF et un domaine EAL et exercer les deux activités enzymatiques. Cependant, l'un des deux sites est souvent dégénéré et enzymatiquement inactif. La plupart des DGC et PDE possèdent également des domaines accessoires de transduction du signal (domaine REC, PAS, GAF, HAMP, etc.), permettant de réguler l'activité de ces enzymes en réponse à des signaux internes et environnementaux (Hengge, 2009). Il existe plus de 40 protéines impliquées dans l'homéostasie du di-GMPc chez *P. aeruginosa* (Valentini and Filloux, 2016). Cette abondance explique la complexité de la signalisation liée à ce messager secondaire, qui implique un large nombre de fonctions cellulaires régulées et une grande diversité des signaux coordonnant cette régulation. De plus, selon la localisation de ces enzymes dans la bactérie, des variations locales de la concentration en di-GMPc peuvent avoir lieu, permettant un contrôle spatial au sein de la bactérie en réponse à des signaux particuliers et assurant ainsi la spécificité de régulation par ce messager secondaire.

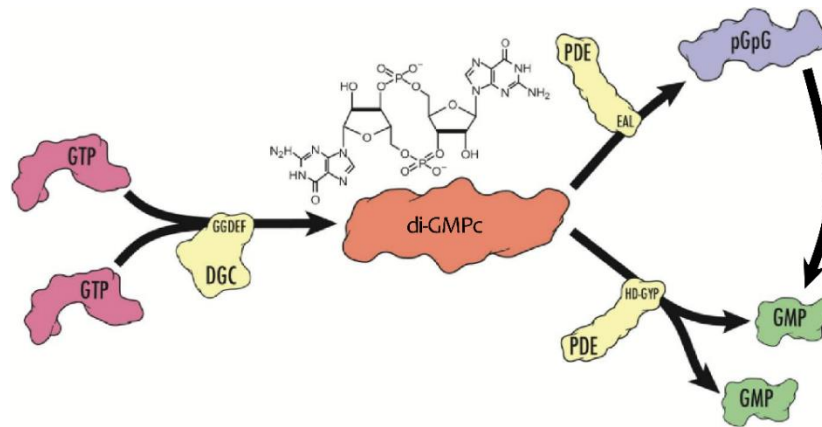


Figure 22 : Homéostasie du di-GMPc chez *P. aeruginosa* (Ha and O'Toole, 2015).

Les DGC possèdent un domaine GGDEF et permettent la synthèse de di-GMPc à partir de deux molécules de GTP. Les PDE avec un domaine EAL dégradent le di-GMPc en pGpG et les PDE à domaine HD-GYP le métabolisent en 2 molécules de GMP.

La synthèse de ce messager secondaire est modulée par différents signaux, mécaniques ou chimiques. Par exemple, un deuxième système mécanosenseur de *P. aeruginosa*, Wsp, est composé d'un senseur membranaire, WspA, qui détecte un signal mécanique comme le contact d'une surface et induit la phosphorylation de l'HK WspE, activant ainsi les RR WspR et WspF. Grâce à son domaine GGDEF, WspR phosphorylée synthétise du di-GMPc tandis que le RR WspF a un rôle de rétrocontrôle en inhibant le mécanosenseur WspA (Fig. 23 (1) ; Hickman *et al.*, 2005; Güvener and Harwood, 2007; O'Connor *et al.*, 2012). Lors de l'étape d'attachement primaire à une surface, un signal transmis par le moteur MotAB du flagelle induit aussi la synthèse de di-GMPc par différentes DGC au pôle bactérien où se situe le flagelle, pour activer de manière localisée l'effecteur FimW qui favorise l'assemblage polaire des T4_aP et facilite ainsi l'attachement bactérien (Fig. 23 (2) ; Laventie *et al.*, 2019). Suite à cet attachement primaire à une surface, un autre mécanosenseur, PilY1, peut favoriser la synthèse de di-GMPc grâce à la DGC SadC (Fig. 23 (3) ; Siryaporn *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2015; Rodesney *et al.*, 2017). Les acides aminés, notamment l'arginine, peuvent également moduler la synthèse du di-GMPc en activant les DGC SadC et RoeA (Bernier *et al.*, 2011). Enfin, le niveau intracellulaire en di-GMPc est modulé par le système de régulation global Gac/Rsm. En réprimant l'activité de GacS, RetS permet à RsmA d'être libre pour pouvoir inhiber la synthèse de la DGC SadC (Fig. 23 (4) ; Moscoso *et al.*, 2014) et donc la synthèse du messager secondaire. Un mutant $\Delta retS$ possède ainsi un niveau élevé en di-GMPc.

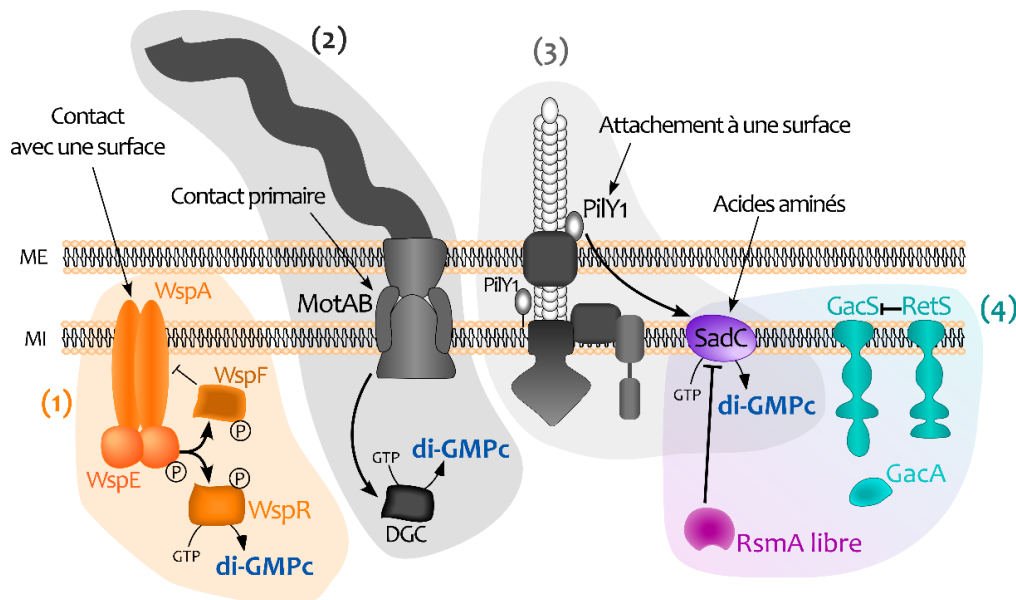


Figure 23 : Schématisation de mécanismes et signaux de régulation de la synthèse de di-GMPc.

(1) Synthèse de di-GMPc par la DGC WspR suite à l'activation du système Wsp par le contact avec une surface. (2) Le contact primaire avec une surface est un signal mécanique transmis par le moteur flagellaire MotAB à différentes DGC qui produisent alors du di-GMPc. (3) En réponse à l'attachement à une surface, le mécanosenseur PilY1 du T₄p active la DGC membranaire SadC. (4) Lorsque RetS inhibe la phosphorylation de GacS, la synthèse des petits ARN régulateurs RsmY et RsmZ n'est pas activée et RsmA est libre. Ce régulateur post-transcriptionnel inhibe alors la synthèse de la DGC SadC et donc de di-GMPc. ME : membrane externe, MI : membrane interne

La régulation par le di-GMPc repose sur son interaction avec de nombreux effecteurs qui sont généralement protéiques (Fig. 24 ; Römling *et al.*, 2013; Jenal *et al.*, 2017). Le di-GMPc peut aussi moduler la stabilité d'ARN, au travers de riboswitch, même si aucun n'a été identifié chez *P. aeruginosa* (Fig. 24).

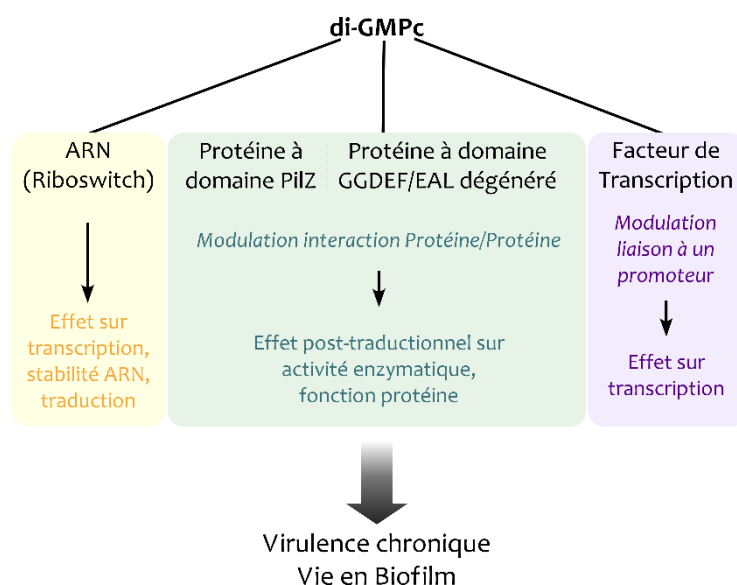


Figure 24 : Présentation des principales familles caractérisées d'effecteurs du di-GMPc.

En interagissant avec des protéines à domaine PilZ ou à domaine GGDEF/EAL dégénéré, le messager secondaire contrôle généralement des interactions protéine/protéine (Fig. 24). FlgZ est une protéine à domaine PilZ de *P. aeruginosa* qui interagit avec la protéine du moteur flagellaire MotC en présence de di-GMPc et inhibe ainsi la motilité de type *swarming* (Baker *et al.*, 2016). La protéine à domaine EAL dégénéré FimX interagit avec l'ATPase PilB après liaison du di-GMPc pour activer l'assemblage du T4_aP et la motilité de type *twitching* (Navarro *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2011; Jain *et al.*, 2017). Enfin, la protéine membranaire PelD de *P. aeruginosa*, qui présente un site GGDEF dégénéré et inactif, est capable de lier spécifiquement le di-GMPc ce qui permet d'activer la synthèse de l'exopolysaccharide Pel et ainsi la formation de biofilm (Lee *et al.*, 2007; Whitney *et al.*, 2012). Le di-GMPc peut également avoir un effet sur la transcription de gène en interagissant avec les effecteurs de type FT, FleQ et BrlR (Fig. 24 ; Chambers *et al.*, 2014). En absence de di-GMPc, le répresseur transcriptionnel FleQ interagit avec la région promotrice de l'opéron *pel* au niveau de deux sites spécifiques et bloque la transcription de ces gènes par une torsion de l'ADN. Lorsque le di-GMPc se fixe au domaine ATPase AAA+ du FT, un changement conformationnel induit la dissociation de FleQ à l'un des deux sites d'interaction, la torsion de l'ADN est alors dissipée et les gènes codant pour les exopolysaccharides sont exprimés (Fig. 25 ; Hickman and Harwood, 2008; Baraquet *et al.*, 2012; Baraquet and Harwood, 2013; Matsuyama *et al.*, 2016).

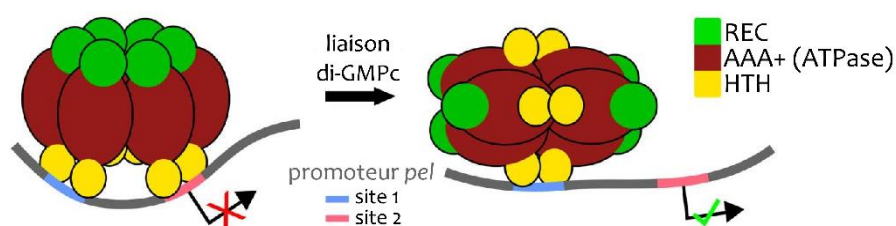


Figure 25 : Le di-GMPc interagit avec FleQ pour activer la transcription de l'opéron *pel* (Matsuyama *et al.*, 2016).

L'hexamère de FleQ se lie au promoteur *pel* sur 2 sites spécifiques. La fixation de di-GMPc sur FleQ induit un changement conformationnel du régulateur transcriptionnel et rend le promoteur de *pel* accessible pour la transcription des gènes.

Le rôle global du di-GMPc est de favoriser la transition vers un mode de vie sessile de *P. aeruginosa*, notamment en inhibant la mobilité et la virulence bactérienne ainsi qu'en stimulant la formation de biofilm. Ce messager secondaire participe ainsi à la régulation inverse des SST3 et SST6 par la voie Gac/Rsm (Moscoso *et al.*, 2011). La séquestration de RsmA par les petits ARN RsmY/RsmZ et une forte concentration en di-GMPc induite par la DGC WspR favorisent la synthèse du SST6 et inhibent celle du SST3. La modulation du di-GMPc est également décrite pour influencer la résistance aux antibiotiques des bactéries (Chua *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2014; Nicastro *et al.*, 2014; Petrova *et al.*, 2017). Enfin, le di-GMPc contrôle les voies *pqs* et *rhl* du réseau

de régulation QS : une réduction du niveau intracellulaire en di-GMPc permet d'activer ces deux systèmes par l'intermédiaire de PqsR (Lin Chua *et al.*, 2017).

d. Coordination du réseau de régulation de *P. aeruginosa*

Comme cela a été montré par quelques exemples dans ce chapitre, les 4 grandes voies de régulation de la virulence de *P. aeruginosa* forment un réseau interconnecté qui permet un contrôle précis de la virulence bactérienne et la mise en place d'une réponse progressive aux signaux reçus par la bactérie (Fig. 26).

Au sein de ce réseau, les deux messagers secondaires AMPc et di-GMPc jouent un rôle particulier en favorisant des phénotypes antagonistes. Afin d'assurer la transition entre les modes de vie planctonique et en biofilm, une coordination spécifique existe donc entre eux. Ainsi, une forte quantité d'AMPc inhibe la formation de biofilm en favorisant l'activité de phosphodiésterases et ainsi la dégradation du di-GMPc, et active grâce à Vfr la synthèse des facteurs de virulence dont le SST3. Inversement, une concentration élevée en di-GMPc réprime la synthèse d'AMPc, et donc celle de facteurs de virulence agressifs, par un mécanisme non identifié qui ne dépend pas des adénylate cyclases ou de l'activité de la phosphodiésterase CpdA (Almblad *et al.*, 2015, 2019).

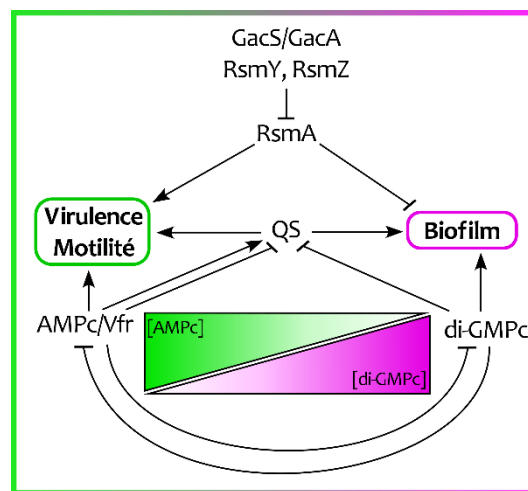


Figure 26 : Schéma simplifié du réseau global de régulation de la virulence de *P. aeruginosa*.

La virulence et la motilité bactériennes, principalement liées à la vie planctonique, sont activées par l'AMPc, le QS et le régulateur post-transcriptionnel RsmA. La vie en biofilm est favorisée par le di-GMPc, le QS ainsi que par la séquestration de RsmA par les petits ARN régulateurs RsmY et RsmZ synthétisés grâce au TCS GacS/GacA. Vfr a un effet à la fois positif et négatif sur le QS puisqu'il stimule l'expression de *lasR* et de *rhlR*, mais peut aussi réprimer celle de ce dernier. Le di-GMPc inhibe les voies *rhl* et *pqs* du QS ainsi que la synthèse d'AMPc, tandis que l'AMPc active la dégradation du di-GMPc.

Toutefois, cette schématisation est en partie réductrice puisque la relation inverse entre les deux messagers secondaires semble plus complexe *in vivo*. En effet, il a récemment été décrit que lors de l'infection de cellules eucaryotes, l'adhésion au tissu cellulaire et la virulence de *P.*

aeruginosa sont favorisées par le di-GMPc (Laventie *et al.*, 2019). Suite à la détection d'une surface telle qu'un tissu cellulaire, la synthèse de di-GMPc est augmentée très rapidement grâce à un signal transduit par le moteur flagellaire pour permettre la polarisation de l'effecteur du di-GMPc FimW. Cette protéine induit l'activation de l'assemblage polaire des T₄P ce qui favorise l'attachement primaire des bactéries à la surface (Introduction/Chapitre 3.2.c.ii). Ensuite, la division asymétrique des bactéries adhérentes conduit à l'obtention de deux bactéries dites « spécialisées » : l'une, possédant une faible concentration en di-GMPc intracellulaire, se détache et adopte un comportement planctonique pour disséminer dans l'hôte, tandis que l'autre, ayant conservé une concentration élevée en di-GMPc, reste adhérente. Dans cette dernière bactérie, les pili serviraient alors de mécanosenseurs pour activer soit la voie de PilY1, soit le système Pil/Chp. PilY1 induirait un comportement non agressif des bactéries en stimulant la synthèse de di-GMPc par SadC et la formation de biofilm, tandis que le système Pil/Chp activerait la synthèse d'AMPc par CyaB et la production de nombreux facteurs de virulence pour coloniser le tissu de cellules eucaryotes et induire des dommages cellulaires (Laventie *et al.*, 2019). Des signaux supplémentaires sont probablement pris en compte pour aider les bactéries adhérentes à déterminer le comportement à adopter.

Chapitre 4

La régulation des systèmes TPS

Les TPS sont des systèmes impliqués dans la virulence bactérienne dont la synthèse est contrôlée au sein des bactéries par différents facteurs de régulation.

Mes travaux de thèse ayant porté sur l'étude de régulateurs et signaux modulant la synthèse du TPS ExlBA, ce chapitre présente l'état des connaissances des mécanismes de régulation identifiés pour les TPS de *P. aeruginosa* et d'autres espèces bactériennes.

1. La régulation des TPS de *P. aeruginosa*

Des mécanismes de régulation de chaque TPS caractérisé chez *P. aeruginosa* ont été décrits.

Le TPS CdrAB, impliqué dans l'aggrégation bactérienne, est régulé positivement par le second messager di-GMPc à la fois au niveau transcriptionnel et au niveau post-traductionnel (Fig. 27.A). *P. aeruginosa* utilisant CdrA pour la formation de biofilm, sa régulation par le di-GMPc permet de répondre aux signaux stimulant ce phénotype (Reichhardt *et al.*, 2018). Le di-GMPc active l'expression de *cdrAB* en interagissant avec le régulateur transcriptionnel FleQ, comme cela a été décrit pour la régulation de l'expression de l'opéron *pel* (Introduction/Chapitre 3.2.c.ii Hickman and Harwood, 2008; Borlee *et al.*, 2010; Baraquet and Harwood, 2016). Pour être active, CdrA doit être ancrée au niveau de la membrane externe dans son transporteur CdrB, un pont dissulfure bloquant son extrémité C-terminale dans le périplasma. Une fois ancrée à la membrane externe, la protéine CdrA subit une protéolyse post-traductionnelle modulée par le di-GMPc (Rybtke *et al.*, 2015; Cooley *et al.*, 2016). En absence du messenger secondaire, la protéase périplasmique LapG est libre dans le périplasma et clive au niveau du site spécifique « TAAG » la partie C-terminale de CdrA, induisant ainsi son relargage dans le milieu extracellulaire. Cependant, lorsque le di-GMPc se lie à la protéine LapD, un récepteur membranaire à domaine GGDEF et EAL dégénérés, celle-ci séquestre la protéase LapG. Dans cette conformation, LapG ne peut pas cliver l'adhésine CdrA qui est donc maintenue à la surface bactérienne pour agir.

Le TPS PdtAB est encodé par 2 gènes, qui sont sous le contrôle de deux promoteurs différents et tous les deux régulés en fonction de la concentration en phosphate (Fig. 27.B ; Faure *et al.*, 2013). Lors d'une infection par des bactéries à gram négatif, les cellules eucaryotes induisent une diminution de la concentration en phosphate du milieu extracellulaire qui atteint un niveau sous-optimal pour la croissance des bactéries (Weinberg, 1974; Chekabab *et al.*, 2014). La déplétion en phosphate inorganique (Pi) représente donc un signal bactérien d'activation de la virulence. Le système de transport phosphate-spécifique Pst détecte le niveau en Pi dans l'environnement bactérien et, lorsqu'il est élevé, le composant PhoU fixe et réprime l'HK PhoR du TCS PhoR/PhoB (Lamarche *et al.*, 2008). Lorsqu'une privation en phosphate est détectée, le système Pst favorise l'autophosphorylation de PhoR en levant l'interaction avec PhoU. PhoR phosphorylée active le RR PhoB, qui peut alors se fixer sur le site spécifique Pho (« Pho box ») en amont de l'opéron *vreAIR* codant pour le CSS PUMA3. Le σ^{Vrel} va ensuite activer la transcription des gènes *pdtA* et *pdtB* en favorisant la fixation de l'ARN polymérase sur leur promoteur (Llamas *et al.*, 2009; Faure *et al.*, 2013). Le mécanisme d'activation du CSS PUMA3 n'est pas encore caractérisé (Chevalier *et al.*, 2018).

En 2015, Garnett *et al.* ont décrit l'activation de l'expression du gène *lepA* par l'HK RocS1, qui forme un TCS avec les deux RR RocA et RocR (Garnett *et al.*, 2015). Il s'agit du seul mécanisme de régulation décrit pour le TPS LepBA et le signal activateur n'est pas encore identifié.

Finalement, même si le mécanisme de régulation n'a pas été caractérisé, il a été démontré que les deux TPS CDI de *P. aeruginosa* sont inhibés post-transcriptionnellement par RsmA (Mercy *et al.*, 2016). Ces deux systèmes sont également surproduits en culture statique.

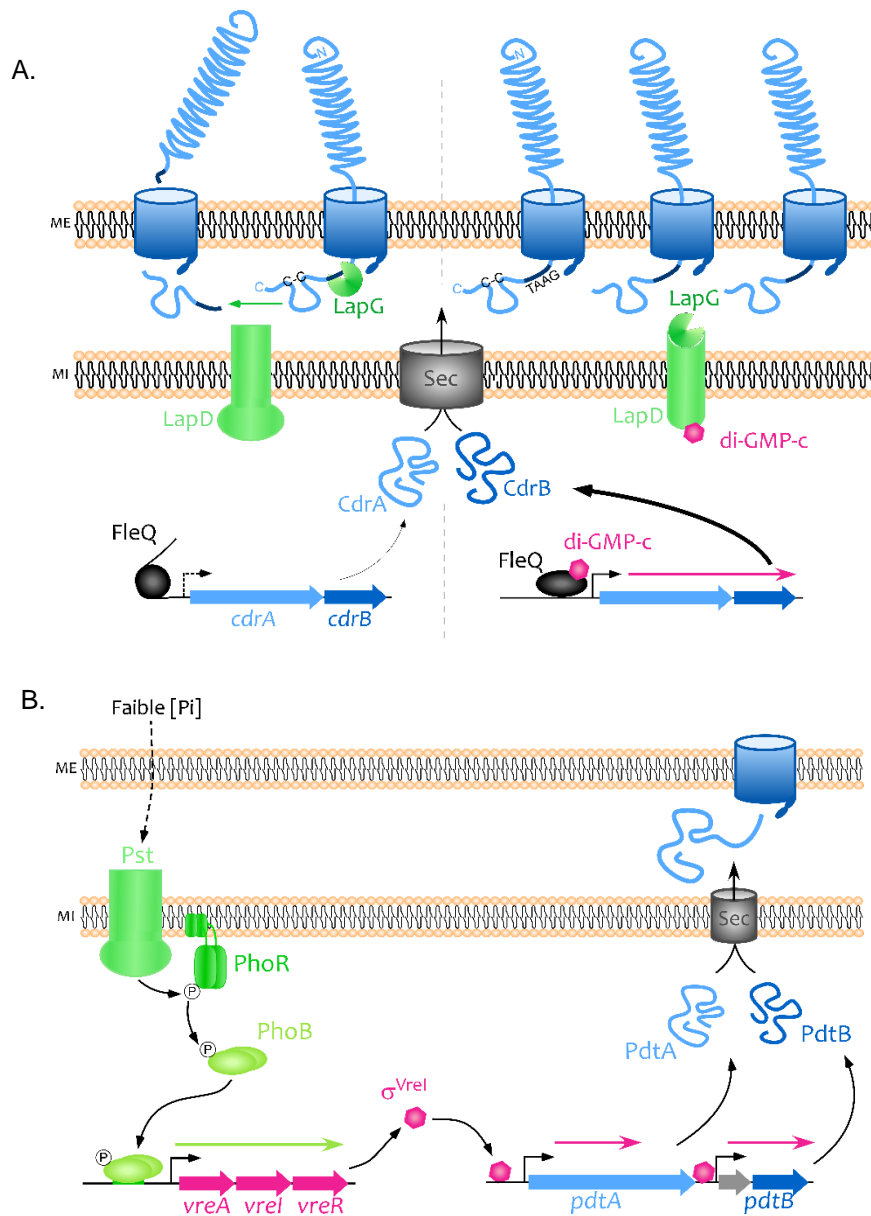


Figure 27 : Voies de régulation des TPS CdrAB et PdtAB de *P. aeruginosa*.

A) Le di-GMPc est un activateur du TPS CdrAB. Il active la transcription des gènes et induit le maintien de l'adhésine CdrA à la membrane externe. B) La synthèse du TPS PdtAB est activée par la déplétion en phosphate. En condition de restriction en phosphate, le système de transport du phosphate Pst active l'HK PhoR et permet la phosphorylation du RR PhoB. Ce FT induit l'expression de l'opéron *vre*. Le σ^{vrel} active la transcription des gènes *pdtB* et *pdtA*.

2. La régulation des TPS d'autres espèces bactériennes

L'étude de la régulation des systèmes TPS chez différentes espèces bactériennes a révélé certains traits communs en matière de mécanismes de régulation ou de stimuli. En effet, il ressort que les TPS sont fréquemment activés par une déplétion en fer ou régulés en fonction de la température. La privation en fer dans le milieu environnant et une température de 37°C sont deux caractéristiques des conditions d'infection chez l'hôte et sont utilisées comme signaux par les bactéries pour activer leur virulence (Wurtzel *et al.*, 2012; Reinhart and Oglesby-Sherrouse, 2016). Chez *P. luminescens*, la transcription des gènes codant pour le TPS PhlBA, qui permet la sécrétion de l'hémolysine PhlA, est activée par une privation en fer (Brillard *et al.*, 2002). Même si aucune étude d'interaction n'a été réalisée, un site de liaison spécifique du répresseur transcriptionnel Fur (*ferric uptake regulator*) a été identifié en amont du gène *phlB* et pourrait être responsable de cette régulation. Fur a en effet besoin de fer pour réprimer, directement ou indirectement, la transcription de ses cibles (Cornelis *et al.*, 2009). Le TPS EtpBA, comprenant l'adhésine EtpA, est impliqué dans l'attachement d'*E. coli* aux cellules épithéliales (Fleckenstein *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2009). Une étude globale menée par Haines *et al.* a mis en évidence une surexpression de l'opéron *etpBAC* suite à une chélation du fer présent de le milieu de culture (Haines *et al.*, 2015). Enfin, un site de régulation spécifique de Fur a été identifié sur le promoteur des gènes codant pour le TPS HxuBA d'*H. influenzae*, impliqué dans l'utilisation de l'hème (Cope *et al.*, 1995; Fournier *et al.*, 2011). Il est probable que la transcription des gènes de l'opéron *hxuCBA* soit ainsi régulée par la concentration en fer (Whitby *et al.*, 2009).

Les régulateurs impliqués dans le contrôle des TPS sont souvent des TCS, comme c'est le cas pour FhaBC. L'expression des gènes *fhaB* (codant pour le précurseur de l'hémagglutinine filamenteuse FHA) et *fhaC* est régulée par le système BvgS/BvgA (*Bordetella virulence gene*) en fonction des conditions environnementales : la transcription du gène *fhaB* est activée à 37°C et inhibée à 25°C, en présence de sulfate de magnésium ou d'acide nicotinique (Stibitz *et al.*, 1988; Roy *et al.*, 1989; Scarlato *et al.*, 1991; Melvin *et al.*, 2014). Chez *Haemophilus ducreyi*, le TPS LspB/LspA2 permet d'inhiber la phagocytose des bactéries par les cellules immunitaires (Vakevainen *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2004). Le RR du TCS CpxAR, qui répond aux stress de l'enveloppe bactérienne, active directement l'expression de l'opéron *lspBA2* (Labandeira-Rey *et al.*, 2009). Il a également été démontré que l'expression de *lspBA2* est activée par la protéine Fis, même si aucune interaction directe n'a pu être mise en évidence. Fis est une protéine associée au nucléoïde qui participe aux mécanismes de réplication, de transcription et de réarrangement de l'ADN (Finkel and Johnson, 1992). Le (p)ppGpp, messenger secondaire de la réponse stringente induite suite à un stress et impliqué dans la reprogrammation de nombreux processus cellulaires

(transcription, réplication, synthèse protéique, métabolisme...), stimule aussi l'expression de *lspBA2* (Labandeira-Rey *et al.*, 2013; Hauryliuk *et al.*, 2015; Holley *et al.*, 2015). Enfin, la protéine liant les ARN Hfq active post-transcriptionnellement la synthèse de LspB et LspA2 (Gangaiah *et al.*, 2014).

Les TPS sont également régulés par des FT. Par exemple, le régulateur de type LysR RscR inhibe l'expression des gènes codant pour le TPS RscBA de *Yersinia enterocolitica*, qui permet la translocation d'une potentielle adhésine (Nelson *et al.*, 2001). Chez *P. mirabilis*, le TPS HpmBA est régulé par le FT global flagellaire FlhD₂C₂ (Fraser *et al.*, 2002).

Le TPS HrpAB de *Neisseria meningitidis* a simplement été décrit comme étant activé en condition anaérobie (Neil and Apicella, 2009).

Les voies de régulation ont particulièrement été caractérisées pour deux TPS, ShlBA de *S. marcescens* et EthBA d'*E. tarda*, qui intègrent effectivement comme stimuli la température et la concentration en fer et font intervenir des TCS ou des FT.

ShlA est une hémolysine décrite pour induire des pneumonies hémorragiques chez la souris et chez l'homme (Goldstein *et al.*, 1982; González-Juarbe *et al.*, 2015). En réponse à une température de 37°C, le FT du TCS RssAB inhibe par interaction directe la transcription de l'opéron *flhDC*, dont le produit FlhD₄C₂, régulateur transcriptionnel global contrôlant notamment la biosynthèse du flagelle, active la synthèse de ShlBA probablement grâce au facteur σ^{FliA} (Fig. 28.A ; voir ci-après ; Lin *et al.*, 2010). L'ion ferrique Fe³⁺ peut également se lier à RssA pour induire son autophosphorylation, ce qui permet l'activation de RssB par phosphorelay (Fig. 28.A ; Lin *et al.*, 2016). Cela pourrait expliquer l'activation du système ShlBA en réponse à la chélation en fer (Poole and Braun, 1988). Le régulateur RcsB fait partie d'un TCS complexe, composé de deux HK et d'un RR, et a également été identifié comme inhibiteur de l'expression de *shlBA* (Fig. 28.A). Lorsque RcsB est inactif (non phosphorylé), le facteur σ flagellaire FliA, dont l'expression est activée par FlhD₄C₂, induit la transcription des gènes *shlBA*. Un site de liaison ayant été identifié par bio-informatique, il est probable que FliA interagisse de façon directe avec le promoteur de *shlBA*. Cependant, une fois phosphorylé, RcsB inhibe l'expression de *flhDC* et, en plus d'empêcher ainsi la synthèse de σ^{FliA} , se lie au promoteur de *shlBA* pour inhiber de façon directe la transcription des gènes (Di Venanzio *et al.*, 2014).

Quatre mécanismes de régulation ont été décrits pour contrôler la synthèse du TPS EthBA, qui permet la sécrétion de l'hémolysine EthA. Premièrement, la synthèse du TPS est réprimée de façon directe par le répresseur transcriptionnel Fur. L'expression des gènes *ethB* et *ethA* est donc inhibée en présence de fer ou stimulée en absence du métal (Fig. 28.B ; Hirono *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2009). Ensuite, le régulateur transcriptionnel EthR se fixe au promoteur du gène *ethB* afin d'inhiber son expression (Fig. 28.B ; Wang *et al.*, 2009). Le TCS EsrAB, connu pour réguler positivement les SST3 et SST6 d'*E. tarda*, réprime la synthèse de l'hémolysine EthA, même si

aucune interaction directe entre le RR EsrB et le promoteur d'*ethA* n'a été démontrée (Fig. 28.B ; Wang *et al.*, 2010). Enfin, l'expression d'*ethA* est également modulée par la protéine associée au nucléoïde thermorégulatrice Hha_{Et}, qui se lie directement au promoteur du gène afin d'inhiber sa transcription (Fig. 28.B ; Wang *et al.*, 2010). Cette répression est plus active à 25°C qu'à 37°C.

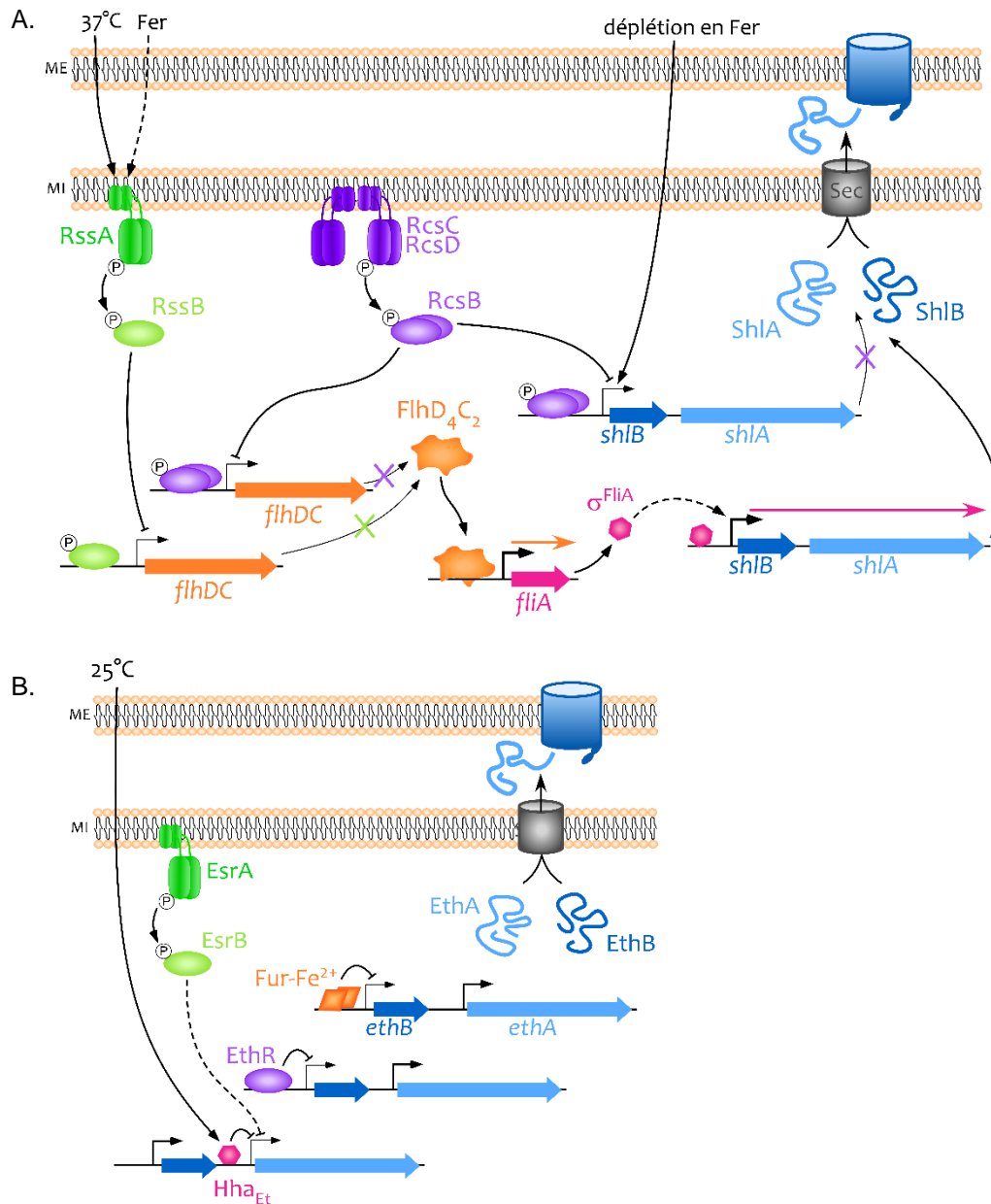


Figure 28 : Voies de régulation des TPS ShlBA de *S. marcescens* et EthBA de *E. tarda*.

A) Le régulateur global FlhDC active la transcription du facteur sigma FliA, qui active l'expression de *shlBA* probablement de façon directe en favorisant la fixation de l'ARN polymérase sur le promoteur des gènes. La transcription de *flhDC* est inhibée par le TCS RssA/RssB (lui-même activé à 37°C ou en présence de fer) ainsi que par le TCS complexe RcsC/RcsD/RcsB. Le FT RcsB phosphorylé se fixe au promoteur de *shlBA* pour inhiber la transcription des gènes. (trait plein = régulation démontrée, trait pointillés = régulation possible). B) Les FT EthR et Fur se fixent spécifiquement au niveau de la région promotrice d'*ethB* pour réprimer la transcription du gène. La protéine Hha_{Et} inhibe la transcription d'*ethA* en se liant au promoteur du gène, avec un effet plus marqué à 25°C qu'à 37°C. Même si aucune interaction directe n'a été mise en évidence, le TCS EsrA/EsrB inhibe l'expression d'*ethA*. (trait plein = régulation directe démontrée, trait pointillés = régulation potentiellement indirecte).

Objectifs de la thèse

Le TPS ExlBA est un facteur de virulence découvert en 2014 par l'équipe PBRC qui joue un rôle important dans la pathogénicité des souches de *P. aeruginosa* de type PA7, dépourvues de SST3.

A l'instar de tous les facteurs de virulence, la synthèse d'ExlB et ExlA doit être régulée au sein de la bactérie en fonction de l'environnement et/ou des conditions de croissance. La prévalence clinique des souches de type PA7 n'est pas encore déterminée, mais un nombre croissant de ces souches sont identifiées et il devient important de comprendre la régulation de leur virulence qui repose en grande partie sur ExlBA.

En 2015, lorsque j'ai débuté ma thèse, rien n'était connu concernant la régulation du TPS ExlBA. Mon projet de thèse a donc consisté à initier l'identification des mécanismes de contrôle de ce système de virulence. Ceux-ci pouvaient s'exercer à la fois sur la transcription des gènes, la stabilité des ARNm ainsi que sur la synthèse et la sécrétion des protéines, en impliquant des facteurs de régulation répondant à divers stimuli. J'ai donc, d'une part, recherché les signaux environnementaux qui pouvaient moduler l'expression des gènes *exlBA* et, d'autre part, tenté d'identifier des facteurs de régulation grâce à une approche ciblée. Cette dernière consistait à analyser le rôle des régulateurs codés par des gènes à proximité d'*exlBA* et l'implication des régulateurs globaux connus pour contrôler la virulence de *P. aeruginosa*.

Les différents aspects de mon travail ayant permis de mettre en évidence les premiers mécanismes de régulation d'ExlBA sont présentés dans la partie Résultats en 3 chapitres. Un premier chapitre développe l'identification de la région promotrice d'*exlBA* et l'étude de signaux permettant la transcription de ces gènes. Les travaux concernant la recherche de nouveaux régulateurs grâce à une stratégie de mutagenèse ciblée sont présentés dans un second chapitre. Le troisième chapitre se focalise sur la régulation du TPS ExlBA par les deux principaux messagers secondaires de *P. aeruginosa*, qui appartiennent à deux voies importantes de contrôle de la virulence. Enfin, un quatrième chapitre présente des résultats obtenus dans le cadre d'une étude à laquelle j'ai participé pour comprendre l'évolution de la virulence ExlBA-dépendante des souches CLJ1 et CLJ3 chez l'hôte, en caractérisant leur pathoadaptation grâce à une approche multi-omique.

Bien que mon projet ait débuté en travaillant sur la souche CLJ1, l'équipe a très rapidement changé de souche d'étude du fait de l'instabilité phénotypique de CLJ1. Les résultats présentés dans ce manuscrit ont ainsi été majoritairement obtenus avec la nouvelle souche clinique IHMA87. Pour faciliter la lecture et la compréhension, les gènes seront donc toujours annotés selon la nomenclature d'IHMA87 (AZPAE15042, pseudomonas.com).

RESULTATS

Chapitre 1

Expression des gènes *exlBA* : région promotrice et signaux de régulation

La synthèse des facteurs de virulence de *P. aeruginosa* repose sur une régulation finement contrôlée qui intègre différents signaux métaboliques ou environnementaux, qui peuvent être d'origine chimique, thermique ou mécanique. Comme déjà mentionné, la virulence bactérienne peut être activée en réponse à des signaux environnementaux spécifiques de l'hôte. Il a notamment été démontré que la transcription de gènes liés à la virulence de *P. aeruginosa* est généralement activée à 37°C ou en condition de déplétion en fer. En effet, la température des mammifères à sang chaud est de 37°C et le milieu extracellulaire contient peu de fer chez ces hôtes (Wurtzel *et al.*, 2012; Reinhart and Oglesby-Sherrouse, 2016). Le fer est utilisé par les cellules immunitaires de l'hôte pour réguler leur prolifération ou la synthèse de leurs effecteurs et il est fixé par les microenvironnements extracellulaires (sang, protéines plasmatiques, liquide interstitiel, surface épithéliale...) pour le rendre inaccessible aux micro-organismes qui en ont besoin pour leur survie (Nairz *et al.*, 2010). De plus, lors de la colonisation d'un hôte, les bactéries se coordonnent pour optimiser leur infection grâce au QS, ce qui permet d'activer la synthèse des facteurs de virulence seulement après qu'un nombre minimal de bactéries soit atteint pour lutter efficacement, entre autres, contre le système immunitaire de l'hôte (Gama *et al.*, 2012).

Mon projet de thèse a consisté en l'étude de la régulation d'un nouveau système de virulence identifié chez les souches de type PA7, le TPS ExlBA qui joue un rôle majeur pour la virulence de ces souches. J'ai tenté d'identifier les conditions d'expression des gènes *exlB* et *exlA*. Dans ce but, j'ai analysé l'environnement génétique du locus *exlBA* et étudié l'expression de ces gènes en fonction de différents stimuli environnementaux connus pour activer la pathogénicité de *P. aeruginosa*. Grâce à une collaboration, la région promotrice permettant cette transcription a également été déterminée.

1. Contexte génétique d'*exlBA*

Les gènes *exlB* et *exlA* sont présents sur le génome des souches de type PA7, orientés dans le même sens de transcription et séparés par 89 bases (Fig. 29.A). Chez la souche de référence PA7, la database pseudomonas.com prédit une organisation en opéron, avec absence de signaux terminateurs de la transcription entre les deux gènes.

Pour débiter mon projet, j'ai examiné l'environnement génétique du locus *exlBA* (Fig. 29.A). En amont d'*exlB*, le gène *RS13160* code pour une topoisomérase de type II potentielle. Le gène *RS13155* permet la synthèse d'une protéine prédite pour être la sous-unité d'une pompe à efflux impliquée dans la résistance à l'acide fusarique, une toxine synthétisée par les champignons appartenant à l'espèce phytopathogène *Fusarium*. Deux gènes codant pour des régulateurs transcriptionnels de type LysR sont présents plus en amont (*RS13145* et *RS13150*). Enfin, le gène *phhR* et l'opéron *phhABC*, impliqués dans le catabolisme de la phénylalanine, sont localisés en aval d'*exlA*. Ce contexte génétique est conservé chez toutes les souches de *P. aeruginosa* (Fig. 29.A) et l'identité de séquence des gènes *exlBA* au sein des souches de type PA7 est supérieure à 99%.

Après analyse de ce locus avec le logiciel bio-informatique BPROM (www.softberry.com ; Solovyev and Salamov, 2011), quatre promoteurs putatifs reconnus par l'ARN polymérase/ σ^{70} ont été identifiés en amont d'*exlB* ou des gènes *RS13160* et *RS13155* (Fig. 29.A). En se basant sur les consensus connus chez *E. coli*, le logiciel a également prédit des sites spécifiques de FT très peu conservés en amont de ces promoteurs, comme une « Pho box », mais aucun n'a été confirmé par la recherche des séquences consensus identifiées chez *P. aeruginosa* avec le logiciel RSAT (www.embnet.ccg.unam.mx/rsat ; Nguyen *et al.*, 2018).

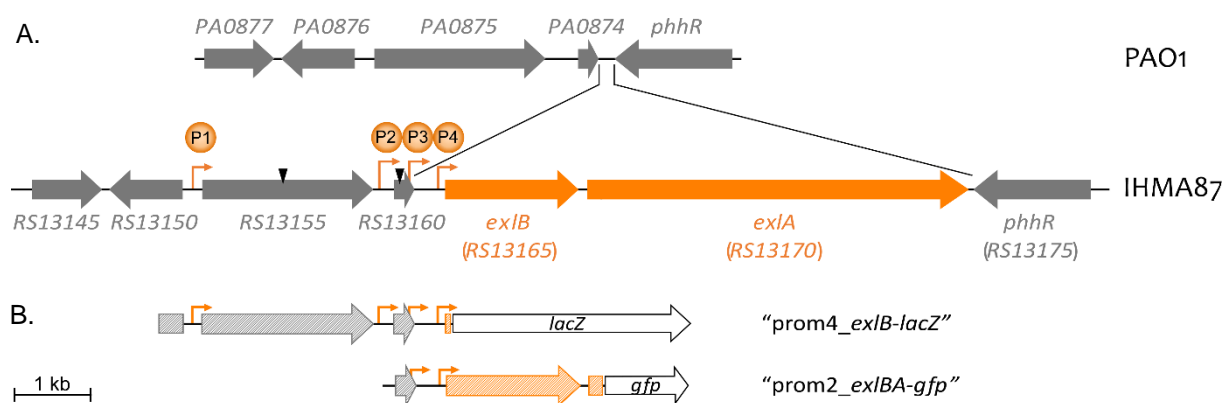


Figure 29 : Représentation de la région chromosomique d'*exlBA*.

A) Les gènes sont représentés par des flèches indiquant le sens de transcription et annotés selon la database *pseudomonas.com* (PAO1 et AZPAE15042). Les quatre promoteurs prédits par bio-informatique sont représentés par de fines flèches oranges et numérotés. Deux triangles noirs localisent l'insertion de l'interposon oméga dans les gènes *RS13155* et *RS13160* (Résultats/Chapitre 1.2). B) Schéma représentant les fusions transcriptionnelles portées par les plasmides miniCTX-prom4_*exlB-lacZ* et miniCTX-prom2_*exlBA-gfp*.

2. Etude de l'expression des gènes *exlBA*

Pour étudier l'expression de gènes, deux techniques sont généralement utilisées : la RT-qPCR (Reverse Transcription-quantitative PCR) et les fusions transcriptionnelles avec un gène rapporteur.

La RT-qPCR permet d'analyser le niveau d'ARNm d'un gène dans un échantillon par comparaison avec un gène de référence. Ce niveau dépend à la fois des activités de synthèse et de dégradation des ARNm. Après purification et transcription inverse des ARN totaux, les ADNc cibles sont amplifiés spécifiquement par qPCR en présence d'un fluorophore marquant l'ADN double brin. La quantification du nombre minimum de cycles de PCR (Cq) nécessaires pour détecter un signal fluorescent exponentiel traduit le niveau en ARNm cibles (Matériel et Méthodes/Chapitre 1.9). Il s'agit d'une technique sensible à la dégradation des ARN, qui nécessite donc une préparation minutieuse des échantillons.

Pour obtenir une fusion transcriptionnelle, un gène rapporteur est fusionné, avec son RBS, à une séquence promotrice. Le niveau d'activité spécifique ou la quantité de protéine rapportrice synthétisée traduit alors l'activité promotrice de la séquence étudiée. Les 3 gènes rapporteurs principalement utilisés pour la construction de ces fusions sont *lacZ*, qui code pour l'enzyme β -galactosidase, *gfp*, codant pour la protéine fluorescente GFP, et l'opéron *luxCDABE*, dont les produits forment l'enzyme luciférase et permettent la synthèse de son substrat. Cette technique a pour avantage de permettre des mesures rapides et en cinétique (pour *gfp* et *lux*) mais l'un des inconvénients est le manque de dynamique du système : si la protéine rapportrice est stable, il y aura une accumulation qui ne reflète pas forcément la dynamique réelle d'expression du promoteur cible. Pour pallier à cela, il est possible d'utiliser par exemple un système rapporteur

gfp codant pour une protéine rendue instable (Andersen *et al.*, 1998). De plus, les fusions transcriptionnelles comprenant souvent la séquence 5'-UTR du gène dont le promoteur est étudié, la synthèse de la protéine rapportrice peut être affectée par une potentielle régulation post-transcriptionnelle exercée sur l'ARNm de ce gène et conduisant à sa dégradation. Certains vecteurs, comme le miniCTX-*lacZ*, contiennent en amont du RBS du gène rapporteur un site de clivage de l'ARN pour ne refléter que l'activité transcriptionnelle de la séquence étudiée (structure tige-boucle reconnue par la RNaseIII pour le miniCTX). Enfin, l'analyse des fusions transcriptionnelles étant généralement réalisée hors du contexte génétique de la séquence étudiée, l'activité promotrice observée peut être biaisée par l'absence de signaux de régulation tels que la structuration locale de l'ADN.

Les deux approches étant complémentaires, elles ont toutes les deux été utilisées pour analyser l'expression d'*exlB* et *exlA*. Ainsi ma thèse a débuté par l'étude des niveaux d'ARNm par RT-qPCR chez la souche CLJ1, cultivée en milieu LB. Le nombre minimal de cycles d'amplification nécessaires pour détecter un signal fluorescent exponentiel était beaucoup plus important pour les ADNc d'*exlB* et *exlA* ($Cq \approx 29-30$) que pour ceux du gène de référence *uvrD* ($Cq \approx 18-19$) et plus proches de ceux des conditions contrôle « non RT » ($Cq \approx 33-34$). Ceci indique que les niveaux en ARNm *ExlB* et *ExlA* dans les bactéries sont faibles. L'expression relative d'*exlB* et *exlA* en phase exponentielle de croissance ($DO_{600}=1$) est 2,5 à 3 fois plus faible que celle obtenue en début de phase stationnaire ($DO_{600}=2,5$; Fig. 30.A). Par conséquent, les niveaux en ARNm *ExlB* et *ExlA* chez CLJ1 sont très faibles en LB et augmentent légèrement au cours de la croissance.

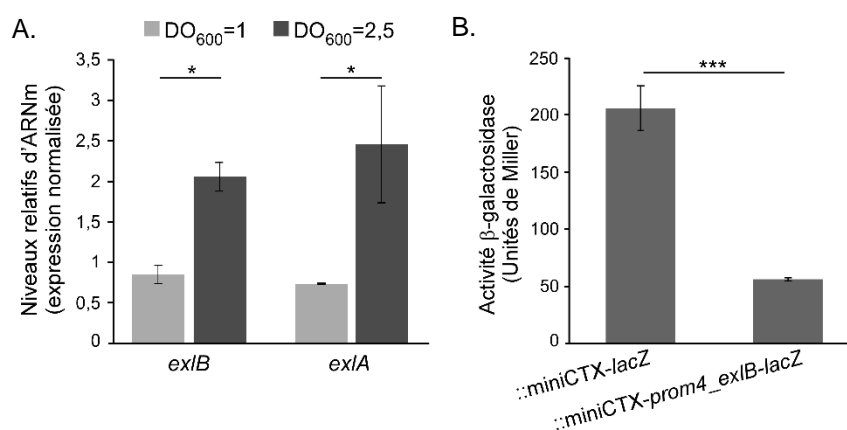


Figure 30 : L'expression d'*exlBA* est faible en milieu riche LB.

A) Analyse de l'expression relative d'*exlB* et *exlA* chez CLJ1 par RT-qPCR au cours de la croissance. Le gène *uvrD* a été utilisé comme référence. L'expérience a été réalisée en triplicat biologique et les barres d'erreur indiquent l'erreur type sur la moyenne. B) Activités β -galactosidase obtenues avec la souche CLJ1 contenant la fusion *miniCTX-prom4_exlB-lacZ* intégrée au site *attB* du génome bactérien. Le vecteur *miniCTX-lacZ* est utilisé comme contrôle négatif. Les expériences ont été réalisées en triplicats et les barres d'erreur indiquent l'écart type standard (T test : *** : valeur- $p \leq 0,001$; * : valeur- $p \leq 0,05$).

La région chromosomique permettant l'expression des gènes *exlB* et *exlA* a, par la suite, été analysée à l'aide de fusions transcriptionnelles. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser le gène rapporteur *lacZ*, car le dosage de l'activité β -galactosidase est une technique informative et bien établie chez *P. aeruginosa*. L'utilisation du gène rapporteur *gfp*, intéressante car permettant une mesure de fluorescence en cinétique, n'était pas envisageable du fait de la faible expression d'*exlBA* et de l'auto-fluorescence du milieu de culture LB.

Afin de situer le(s) promoteur(s) permettant la transcription d'*exlBA*, un fragment contenant les quatre promoteurs putatifs prédits par BPROM a été fusionné au gène *lacZ* sur un vecteur intégratif miniCTX et intégré au site *attB* du chromosome de la souche CLJ1 (Fig. 29.B). Le but était de voir si une activité promotrice était obtenue avec ce grand fragment pour ensuite, le cas échéant, affiner la fusion et observer plus spécifiquement l'activité promotrice d'*exlBA*. La transcription des gènes *exlBA* a été analysée en comparant l'activité β -galactosidase de la souche CLJ1::miniCTX-*prom4_exlB-lacZ* avec celle d'une souche contrôle portant le vecteur sans promoteur CLJ1::miniCTX-*lacZ*, mais aucune activité promotrice n'a été détectée (Fig. 30.B).

Il est à noter que l'activité β -galactosidase observée avec le miniCTX-*lacZ* vide résulte probablement d'une fuite du promoteur du gène de résistance à la tétracycline (*ptet*) présent dans le plasmide en amont de *lacZ*. Sur le plasmide contenant la fusion *exlBA-lacZ*, la transcription dépendante du *ptet* pourrait être moins importante du fait d'une structuration de l'ADN différente ou de l'éloignement entre le gène *lacZ* et ce promoteur.

Malheureusement, comme je l'ai déjà signalé, une certaine instabilité phénotypique de la souche CLJ1 a été révélée au cours des études réalisées au laboratoire et il a été décidé de la remplacer par la souche IHMA87, qui est phénotypiquement stable et présente les mêmes niveaux d'expression d'*exlBA* que CLJ1 (Annexe 2). L'ensemble de mes travaux de thèse ont donc été poursuivis en utilisant cette nouvelle souche, dans laquelle la fusion miniCTX-*prom4_exlB-lacZ* a été intégrée. L'analyse de l'activité β -galactosidase a conduit au même résultat que celui obtenu avec la fusion chez CLJ1, à savoir une absence d'activité en comparaison avec le contrôle négatif (données non montrées).

Quatre hypothèses ont alors été émises pour expliquer l'absence d'activité de la fusion transcriptionnelle alors que des ARNm avaient été détectés par RTqPCR, démontrant l'expression des gènes :

- (1) la séquence utilisée pour cette fusion pouvait ne pas comprendre le promoteur permettant l'expression d'*exlBA*,
- (2) il était possible qu'il y ait une hétérogénéité d'expression d'*exlBA* au sein de la population, le signal des bactéries exprimant faiblement la fusion aurait ainsi pu ne pas être détecté dans le bruit de fond global de la population,

- (3) l'expression d'*exlBA* pouvait être influencée par la topologie de l'ADN qui était différente au site *attB*,
- (4) les conditions d'étude en milieu LB pouvaient finalement ne pas correspondre aux conditions optimales permettant l'expression d'*exlBA*.

(1) Afin de localiser le promoteur d'*exlBA* et déterminer si des promoteurs en amont des gènes *RS13155* et *RS13160* contrôlaient cette transcription, un interposon oméga comportant des signaux d'arrêt de transcription a été inséré dans chacun de ces deux gènes (Frey and Krisch, 1985 ; Fig. 29.A). L'impact sur l'expression d'*exlBA* a été mesuré en analysant la cytotoxicité ExlBA-dépendante et, comme le montre la figure 31, après 4h d'infection de cellules épithéliales, la virulence des souches *RS13155Ω* et *RS13160Ω* est similaire à celle de la souche WT. Le promoteur d'*exlBA* se situe donc en aval du gène *RS13160*, ce qui invalide les promoteurs putatifs P1 et P2 dans ces conditions (Fig. 29.B).

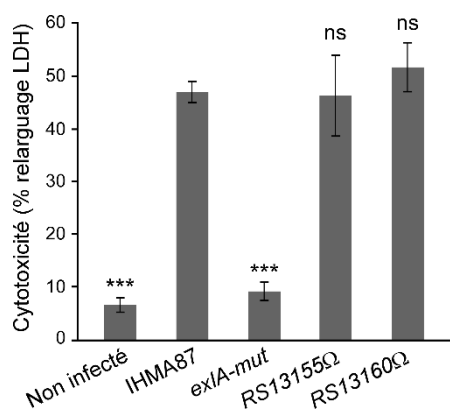


Figure 31 : Les promoteurs des gènes amont d'*exlBA* n'influent pas sur la cytotoxicité ExlBA-dépendante dans ces conditions d'infection.

Cytotoxicité des souches IHMA87, IHMA87 *RS13155Ω* et IHMA87 *RS13160Ω* après 4h30 d'infection de cellules épithéliales A549 à MOI=10. Le gène *exlA* est inactivé chez la souche *exlA-mut*, qui est utilisée comme contrôle négatif (Matériel et Méthodes/Tableau 4). L'expérience a été réalisée en triplicat et les barres d'erreur indiquent l'écart type standard. (T-test, *** : valeur- $p \leq 0,001$; ns : non significatif ; les valeurs- p notées au dessus des barres d'erreur indiquent la différence avec la souche sauvage).

(2) Des profils d'expression hétérogènes ont déjà été rapportés concernant des facteurs de pathogénicité chez diverses espèces bactériennes, dont *P. aeruginosa* (Vallet-Gely *et al.*, 2005; Dubnau and Losick, 2006; Turner *et al.*, 2009). Cette diversité d'expression peut être due à des modifications génétiques (variation de phase) ou des modifications épigénétiques liées à des systèmes de régulation impliquant des boucles de rétrocontrôle (bistabilité). Ainsi, l'expression du SST3 de *P. aeruginosa* est connue pour être bistable, phénomène notamment influencé par le niveau intracellulaire en AMPc et le régulateur transcriptionnel Vfr (Marsden *et al.*, 2016).

Pour savoir si l'expression des gènes *exlBA* était hétérogène au sein de la population, une fusion entre un fragment comprenant les promoteurs P3 et P4 et le gène rapporteur *gfp* (miniCTX-prom2_*exlBA-gfp* ; Fig. 29.B) a été utilisée et le signal fluorescent de chaque bactérie de la population a été mesuré par cytométrie en flux avec l'aide de Véronique Collin-Faure. Pour paramétrer les réglages, la souche IHMA87::miniCTX-pX2-*gfp*, qui synthétise de façon constitutive un niveau élevé de GFP, a été utilisée. Aucune fluorescence n'a été détectée dans la population

IHMA87::*miniCTX-prom2_exlBA-gfp*, indiquant que l'expression d'*exlBA* ne semble pas hétérogène dans ces conditions de test (Fig. 32).

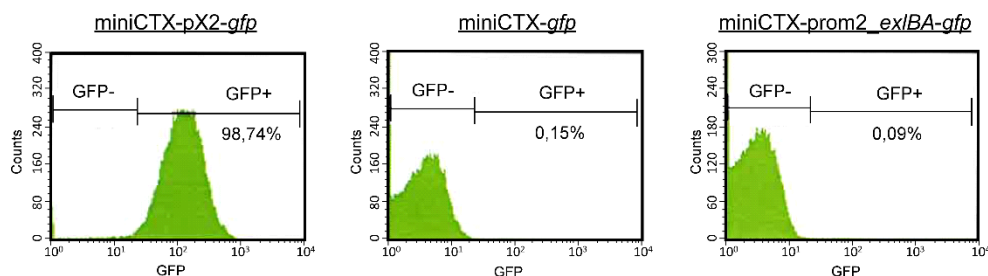


Figure 32 : La fusion *prom2_exlBA-gfp* ne montre pas d'hétérogénéité d'expression.

Mesure de la fluorescence GFP émise par les souches IHMA87::*miniCTX-pX2-gfp* (contrôle positif), IHMA87::*miniCTX-gfp* (contrôle sans promoteur) et IHMA87::*miniCTX-prom2_exlBA-gfp* par cytométrie en flux. Les bactéries ont été cultivées en LB jusqu'à $DO_{600}=1$.

(3) Les problèmes de détection pouvaient être liés au site d'intégration des fusions transcriptionnelles. Il a donc été décidé d'introduire *lacZ* directement dans le gène *exlA* sur le génome d'IHMA87 pour créer une fusion chromosomique *exlA-lacZ*. Ce travail a été réalisé par Julian Trouillon durant son stage de Master 2 en 2017. Comme le montre la figure 33.A, une activité promotrice a été détectée avec la souche IHMA87 *exlA::lacZ*. Celle-ci est particulièrement faible et stable au cours de la croissance bactérienne ce qui n'est pas en accord avec l'augmentation du niveau en ARNm observée avec CLJ1 par RT-qPCR. Il est possible que les résultats obtenus par RT-qPCR indiquent une variation de la stabilité, et non de la synthèse, des ARNm au cours de la croissance bactérienne.

La souche contenant cette fusion chromosomique a été utilisée ultérieurement pour diverses études et a permis notamment de confirmer que la présence de l'interposon Ω dans les gènes *RS13155* et *RS13160* n'affectait pas l'activité β -galactosidase et donc n'inhibait pas l'expression d'*exlBA* en milieu de culture LB (Fig. 33.B). Il est à noter que l'inhibition de la transcription du gène *RS13160* induit une très légère augmentation de l'expression d'*exlBA*. Ce gène codant pour une topoisomérase putative, la protéine *RS13160* pourrait avoir un effet sur la conformation de l'ADN et affecter l'expression de l'opéron *exlBA* dans ces conditions de croissance. Cela n'a pas été exploré au cours de ma thèse.

Au vu de la très faible activité promotrice obtenue avec cette fusion chromosomique, il est finalement probable que les fusions transcriptionnelles construites avec le *miniCTX* révélaient bien l'activité promotrice d'*exlBA* mais l'influence du vecteur intégré (dont l'effet du *ptet*) empêche leur utilisation.

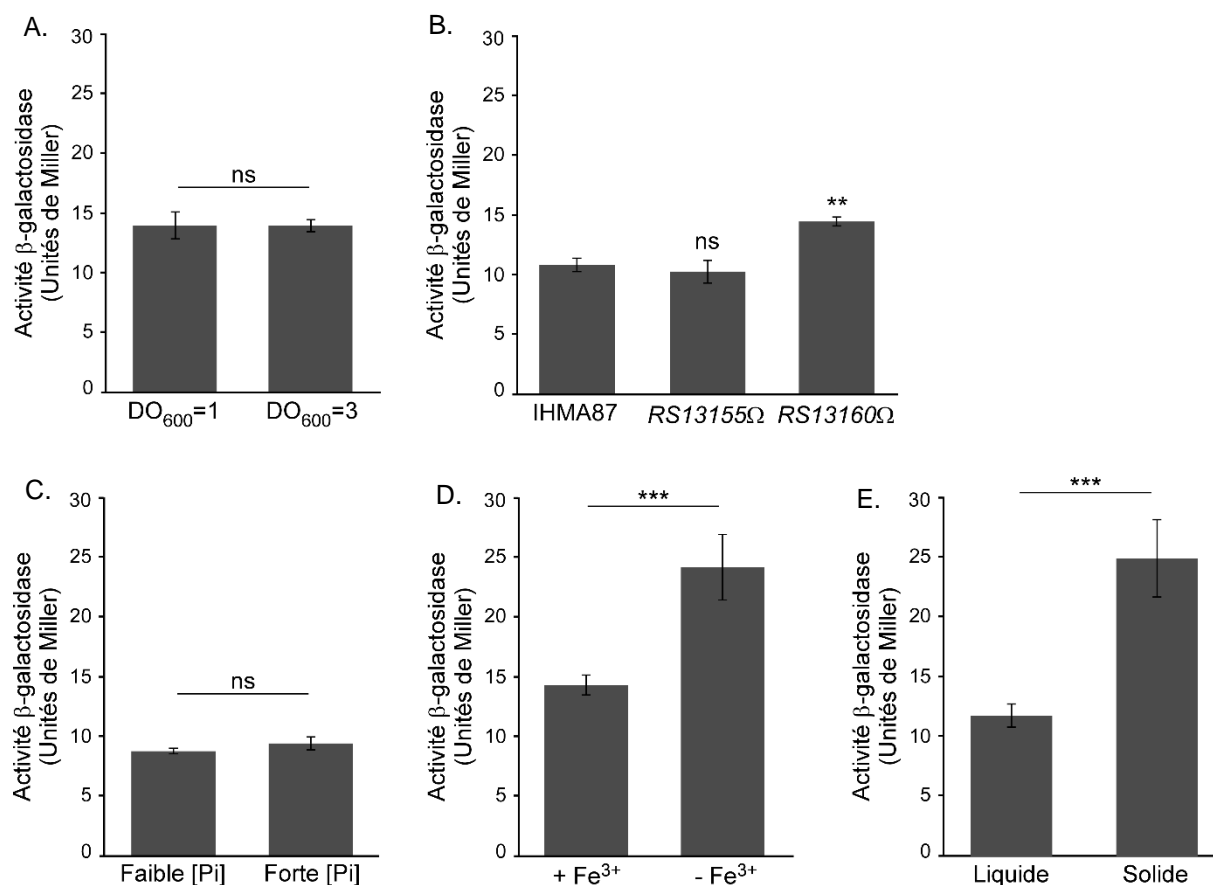


Figure 33 : Activité promotrice d'*exlBA* en fonction des conditions de croissance.

A-E) Activités β-galactosidase obtenues avec la souche IHMA87 comprenant la fusion chromosomique *exlA-lacZ*. A) Les bactéries ont été cultivées en LB jusqu'à DO₆₀₀=1 et 3. B-E) Les souches ont été cultivées jusqu'à DO₆₀₀=1 en milieu LB (B), en milieu minimum M9 supplémenté avec une concentration faible en phosphate (« Faible [Pi] ») ou élevée (« Forte [Pi] ») (C), en milieu LB supplémenté (« - Fe³⁺ ») ou non (« + Fe³⁺ ») par le chélateur du fer 2,2'-dipyridyl (D) ou ont été cultivées sur la nuit en LB liquide (« liquide ») ou sur gélose LB-agar (« solide ») (E). Toutes les expériences ont été réalisées en triplicats et les barres d'erreur indiquent l'écart-type standard (T test ; *** : valeur-*p* ≤ 0,001 ; ** : valeur-*p* ≤ 0,01 ; ns : non significatif ; les différences avec la souche WT sont indiquées au-dessus des barres d'erreurs).

(4) Pour identifier des conditions de culture propices à une meilleure expression d'*exlBA*, deux stimuli fréquents d'activation des systèmes TPS, à savoir la déplétion en fer et en phosphate, ont été analysés. Comme le montre les figures 33.C et D, si la chélation de phosphate du milieu de culture n'a eu aucun effet sur l'expression d'*exlBA*, la déplétion du fer a induit une activation d'un facteur 1,7. J'ai également observé que la transcription d'*exlBA* était 2 fois plus importante après culture sur gélose LB-agar qu'en culture en milieu LB liquide (Fig. 33.E). Enfin, j'ai souhaité déterminer si le contact avec des cellules eucaryotes pouvait activer l'expression d'*exlBA* *in vivo* au cours de l'infection. En effet, il est admis que le contact cellulaire stimule la synthèse du SST3 (Yahr and Wolfgang, 2006). J'ai tenté de comparer par RT-qPCR les niveaux en ARNm *ExlB* et *ExlA* d'IHMA87, après contact de cellules épithéliales ou en absence de contact. Cependant, je n'ai pas réussi à m'affranchir d'une trop forte contamination par les ARN eucaryotes et n'ai pu conclure

sur cette potentielle activation suite au contact avec les cellules eucaryotes. Ce point sera plus amplement discuté dans le [Chapitre 3 des Résultats](#).

3. Identification d'un promoteur

Ce projet portant sur l'analyse de la transcription et la recherche de régulateurs transcriptionnels d'*exlBA*, il était important d'identifier le site d'initiation de la transcription (TSS, *transcription start site*) et les boîtes promotrices d'*exlBA* pour comprendre le mécanisme de régulation transcriptionnelle exercé par ces facteurs.

Nous savions que le promoteur contrôlant *exlBA*, dans les conditions *in vitro* en LB ou *in vivo* au cours d'une infection, devait se situer entre le gène *RS13160* et *exlB*. Les promoteurs P3 et P4 prédits par analyse bio-informatique étaient donc les deux meilleurs candidats ([Fig. 29.A](#)).

Nous avons déterminé le TSS d'*exlBA* en collaboration avec l'équipe du Pr Stephen Lory (Harvard Medical School, Boston). Pour cela, le post-doctorant Kook Han a réalisé diverses expériences de 5'-RACE-PCR, circularisation et RNAseq. Cette étude a été longue et difficile, principalement du fait de la très faible expression d'*exlBA*. Après optimisation, Kook a finalement identifié un site d'initiation en amont d'*exlB* par circularisation de l'ARNm *ExlB* d'IHMA87. Ce site a été confirmé chez PAO1 par 5' RACE-PCR en utilisant le plasmide répliquatif pKH6-*pexlBA*, qui comprend la région promotrice putative d'*exlBA*, *exlB* et une partie du gène *exlA*. Ce plasmide multicopie a permis d'obtenir un niveau en ARNm important et la souche PAO1 a été utilisée car le plasmide ne pouvait pas être transformé dans IHMA87. Aucun TSS n'a été identifié en amont du gène *exlA*.

Le TSS déterminé par Kook nous a permis de définir les boîtes promotrices permettant la fixation de l'ARN polymérase en amont d'*exlBA*, qui étaient en accord la prédiction du logiciel BPROM ([Fig. 29](#) ; [Fig. 34.A](#), « prédiction BPROM »). J'ai ensuite validé ces boîtes en mesurant l'activité promotrice chez la souche IHMA87 *exlA::lacZ* portant des mutations au niveau du promoteur d'*exlBA*. Alors que la mutation introduite au niveau de la boîte « -10 » a bien induit une diminution de l'activité promotrice, en mutant directement sur le chromosome de la souche 4 bases de la boîte « -35 », l'activité promotrice du *pexlBA* a été augmentée d'un facteur 30 ([Fig. 34.B](#)). Cette forte augmentation d'activité semblait indiquer qu'au lieu d'empêcher la fixation de l'ARN polymérase au niveau de la boîte promotrice « -35 » la mutation l'avait favorisée. En analysant mieux la séquence obtenue après mutation, nous nous sommes effectivement rendu compte que nous avons créé, quelques bases en aval, une boîte promotrice optimisée (partageant 5 bases sur 6 avec la boîte consensus, encadrée sur la [figure 34.B](#)). Avec l'hypothèse que cette séquence pouvait correspondre à la vraie boîte « -35 » du promoteur des gènes *exlBA*, nous avons relocalisé les boîtes promotrices et de nouvelles mutations ont été introduites dans la souche

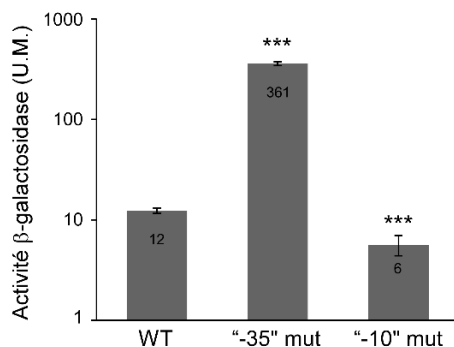
IHMA87 *exlA::lacZ* afin d'inhiber l'expression des gènes *exlBA* (« *pexlBA* validé », Fig. 34.A et C). Lorsque la nouvelle boîte « -35 » a été entièrement mutée pour ne partager aucune base avec la séquence consensus, une diminution d'un facteur 2 de l'expression a alors été observée. Ces résultats tendent à prouver qu'il s'agit bien de la séquence qui est impliquée dans le recrutement de l'ARN polymérase nécessaire à l'expression d'*exlBA*. Le même effet est observé lorsque la nouvelle boîte « -10 » est mutée pour ne partager plus qu'une seule base avec la séquence consensus (Fig. 34.C).

Grâce à l'ensemble de ce travail, nous avons pu valider le site d'initiation de la transcription des gènes *exlBA* déterminé par Kook en localisant la région promotrice qui permet l'expression des gènes dans nos conditions d'étude. Ces données font partie d'un article scientifique paru chez « *Journal of Bacteriology* » en juin 2018 (Berry *et al.*, 2018).

A. **Consensus :** **TTGACA** $N_{16/18}$ **TATAAT** $N_{6/8} +1$ (A ou G)
 Prédiction BPROM : ATGTAA N_{18} GACTAATCT $N_7 +1$ (A)
pex/BA proposé : GTAACA N_{17} ACTAAT $N_9 +1$ (A)
pex/BA validé : TAACAA N_{18} TAATCT $N_7 +1$ (A)

GGATG**TAACAA**AACGGGTGAGGTCTGCG**ACTAATCT**ACGCAAGA

B. *pex/BA* : GGAT**GTAACA**AACGGGTGAGGTCTGCG**ACTAATCT**ACGCAAGA
 "-35" mut : GGAT**GTCGAC**AACGGGTGAGGTCTGCG**ACTAATCT**ACGCAAGA
 "-10" mut : GGAT**GTAACA**AACGGGTGAGGTCTGCG**GCATGC**CTACGCAAGA



C. *pex/BA* : GGATG**TAACAA**AACGGGTGAGGTCTGCG**TAATCT**ACGCAAGA
 "-35" mut bis : GGATG**GCATGC**AACGGGTGAGGTCTGCG**TAATCT**ACGCAAGA
 "-10" mut bis : GGATG**TAACAA**AACGGGTGAGGTCTGCG**GCATGC**ACGCAAGA

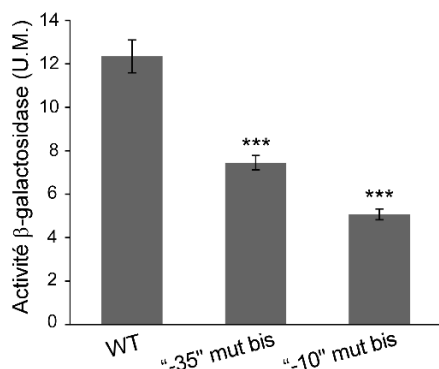


Figure 34 : Identification du promoteur d'*ex/BA*.

A) Comparaison des séquences promotrices consensus à celles du promoteur d'*ex/BA* prédites par BPROM, proposées en fonction du TSS puis relocalisées. Les identités de séquences avec le consensus sont surlignées en gris. Les boîtes promotrices correspondantes sont positionnées sur la séquence génétique en amont du TSS d'*ex/BA* (identifié par 5' RACE PCR et circularisation), indiqué en gras et italique. B-C) Représentation des mutations introduites dans le promoteur *pex/BA* proposé (B) et dans le promoteur validé après relocalisation (C), et activité β-galactosidase de la souche IHMA87 *ex/BA::lacZ* avec les différentes séquences promotrices. Les identités de séquences avec le consensus sont surlignées en gris et les bases mutées sont soulignées en noir. Les expériences ont été réalisées en triplicat et les barres d'erreur indiquent l'écart-type standard (la significativité des différences avec la souche WT ont été déterminées avec un T test et sont indiquées au-dessus des barres d'erreurs ; *** : valeur- $p \leq 0,001$). A noter que la boîte « -35 » optimisée lors de la première mutagenèse et responsable de l'augmentation de l'activité promotrice de la souche « « -35 » mut » est encadrée par des pointillés (B).

4. Discussion

Au cours de cette étude, nous avons pu observer par RT-qPCR que les niveaux d'ARNm *ExlB* et *ExlA* semblaient similaires, qu'aucun site d'initiation de la transcription n'était présent en amont d'*exlA* et que la mutation du promoteur en amont d'*exlB* affectait également l'expression d'*exlA*. Nous pouvons donc conclure que les gènes *exlB* et *exlA* sont co-transcrits, comme la plupart des gènes codant pour un TPS.

Le promoteur identifié présente des boîtes promotrices « -10 » et « -35 » très peu conservées par rapport aux séquences consensus. Cela explique en partie le niveau d'expression très faible d'*exlBA* qui a rendu les analyses difficiles : les boîtes promotrices étant peu spécifiques, le recrutement de l'ARN polymérase n'est pas efficace. Cela suggérerait la nécessité d'un facteur favorisant ce recrutement, comme avéré par la suite avec le régulateur transcriptionnel Vfr (Résultats/Chapitre 3). Néanmoins, nous savons désormais que ce promoteur peu conservé n'est pas le seul en cause dans la faible expression d'*exlBA*, puisque Julian Trouillon a identifié un répresseur par mutagenèse aléatoire (banque de transposition chez IHMA87 *exlA::lacZ* criblée sur la base d'une augmentation de l'expression d'*exlBA*). Ce facteur, nommé ErfA (Exolysin regulatory factor A), empêcherait la transcription d'*exlBA* par l'ARN polymérase en se fixant au niveau de l'extrémité 5'-UTR d'*exlB*. En absence d'ErfA, l'activité promotrice de la fusion *exlA-lacZ* est en effet multipliée par un facteur 40.

A cause de cette très faible expression, des difficultés de détection ont été rencontrées avec les fusions transcriptionnelles. Dans ce contexte, il est possible de penser que l'utilisation du rapporteur *luxCDABE* aurait pu être plus adaptée. Néanmoins, Julian Trouillon n'a pas observé d'activité avec une fusion *exlBA-luxCDABE* contenue sur un miniCTX et l'intégration de l'opéron *lux* dans le gène *exlA* était difficilement envisageable du fait de sa taille.

Un seul promoteur permettant l'expression d'*exlBA* en culture LB a été identifié dans cette étude, mais d'autres promoteurs pourraient avoir un rôle dans des conditions de croissance différentes. Les gènes amont d'*exlB* *RS13160* et *RS13165* sont faiblement mais bien exprimés en culture LB, comme le démontre l'analyse du transcriptome d'IHMA87 par RNAseq réalisée au sein de l'équipe (en LB, $DO_{600}=1$), cependant bloquer leur transcription n'a eu aucun effet sur l'expression d'*exlBA*. En absence de signaux terminateurs de transcription entre ces deux gènes et *exlBA*, il est toutefois impossible d'exclure un éventuel rôle sur l'expression de l'opéron dans d'autres conditions que celles testées (milieu LB et infection de cellules épithéliales). Il est donc nécessaire de rester attentif aux nouvelles publications concernant ces gènes pour tenter d'identifier de nouvelles conditions d'analyse, correspondant notamment aux conditions dans lesquelles ils seraient fortement exprimés. Par exemple, *RS13155* code pour la sous-unité d'une

pompe de résistance à l'acide fusarique et son expression pourrait être activée en présence de champignons producteurs de cette toxine afin de permettre à la bactérie de se défendre. Dans ce cas, le promoteur de *RS13155* pourrait également induire l'expression des gènes codant pour le TPS ExlBA afin d'activer la virulence bactérienne. Enfin, si les promoteurs en amont n'ont pas d'effet sur la transcription d'*exlBA*, les produits des gènes peuvent participer à sa régulation. En effet, *RS13160* est probablement une topoisomérase qui pourrait, dans d'autres conditions que celles testées, favoriser une conformation de l'ADN plus optimale pour activer la transcription d'*exlBA*.

Grâce à la fusion chromosomique *exlA-lacZ*, j'ai pu analyser l'expression d'*exlBA* selon différentes conditions de croissance. J'ai ainsi démontré que le phosphate n'est pas un signal de régulation d'*exlBA* mais que la chélation du fer active l'expression de ces gènes. Cependant, le régulateur transcriptionnel Fur, qui est le principal facteur contrôlant la virulence de *P. aeruginosa* en réponse au fer (Reinhart and Oglesby-Sherrouse, 2016), ne contrôle probablement pas directement la transcription des gènes *exlBA* puisqu'aucun site de liaison spécifique n'a été identifié en amont des gènes avec le logiciel RSAT (« Fur box » : 5'-GATAATGATAATCATTATC-3' ; Lorenzo *et al.*, 1987; Ochsner and Vasil, 1996). Il est possible que Fur régule l'expression d'*exlBA* de façon indirecte et/ou qu'un ou plusieurs autres facteurs soient impliqués dans cette régulation par le fer. Finalement, même si je n'ai pas pu le vérifier au cours de ma thèse, il est possible que l'expression d'*exlBA* soit activée au cours de l'infection. En effet, nous avons observé que certaines souches de type PA7 qui ne sécrètent pas ExlA en milieu LB sécrètent la protéine après contact avec des cellules épithéliales (données non montrées). Les mécanosenseurs sont proposés pour permettre l'activation de la virulence de *P. aeruginosa* suite à la détection de surfaces rigides (Siryaporn *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2015). Le système Pil/Chp est notamment décrit pour activer la synthèse d'AMPC suite à la croissance des bactéries sur un milieu de culture gélosé et induire la pathogénicité bactérienne grâce à la voie CyaB-AMPC/Vfr (D'Argenio *et al.*, 2001; Whitchurch *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2015 ; [Introduction/Chapitre 3.2.c.i](#)). Or, j'ai observé que l'expression d'*exlBA* était plus importante lorsque les bactéries étaient cultivées sur LB-agar par rapport à une culture en milieu liquide et j'ai démontré au cours de ce projet que le complexe AMPC/Vfr était un activateur de l'expression d'*exlBA* ([Résultats/Chapitre 3.1](#)). Il est donc envisageable que le système Pil/Chp puisse détecter une surface solide, telle la surface des cellules eucaryotes, et induire la stimulation de l'expression d'*exlBA* au cours d'une infection.

Chapitre 2

Régulation d'ExlBA : à la recherche de nouveaux régulateurs

La synthèse des facteurs de virulence étant finement régulée pour optimiser leur utilisation, il était important d'identifier les régulateurs impliqués dans le contrôle exercé sur ExlBA. Pour cela, deux approches ont été mises en place dans le laboratoire : une stratégie de mutagenèse aléatoire et une stratégie de mutagenèse ciblée.

Deux banques de mutagenèse aléatoire par transposition ont été créées au sein de l'équipe PBRC. L'une d'entre elles est celle construite récemment avec la souche IHMA87 *exlA::lacZ* par Julian Trouillon qui a permis la découverte d'ErfA. Une première banque de transposition avait préalablement été créée dans la souche sauvage IHMA87 en 2015 par l'étudiante Pauline Basso, qui a mis en évidence 18 mutants présentant une faible toxicité dépendante d'ExlBA envers les cellules épithéliales. Ensemble, nous avons déterminé que 14 de ces mutants présentaient un défaut d'expression d'*exlBA*. J'ai souhaité approfondir leur étude afin d'identifier de potentiels régulateurs d'*exlBA*, mais d'importants problèmes de reproductibilité ont été rencontrés lorsque les expériences d'infection cellulaire ont été refaites. J'ai tout de même sélectionné deux mutants dont le phénotype « peu cytotoxique » était constant mais la construction de mutants propres

($\Delta pqqE$ et $\Delta RS09760$) n'a pas abouti à des résultats concluants. Cette analyse a été arrêtée et ne sera pas développée dans ce manuscrit.

Pour répondre à mon objectif de thèse, j'ai donc principalement eu recours à l'approche ciblée, en étudiant le rôle des régulateurs codés dans l'environnement génétique d'*exlBA* et celui des facteurs de régulation globaux de *P. aeruginosa* (Introduction/Chapitre 3.2). Les résultats obtenus sont présentés dans les chapitres 2 et 3 qui vont suivre, avec une attention particulière dans le chapitre 3 sur l'implication des messagers secondaires de *P. aeruginosa* dans la régulation d'*ExlBA*.

1. Etude ciblée sur l'environnement génétique d'*exlBA*

Des gènes codant pour deux régulateurs transcriptionnels de la famille LysR et pour le FT PhhR se trouvent dans l'environnement génétique du locus *exlBA* (Fig. 29). À l'image des protéines MexT, PqsR (MvfR) ou encore ExsA, il a souvent été démontré que des régulateurs transcriptionnels peuvent être impliqués dans le contrôle de l'expression de gènes présents dans leur environnement génétique (Yahr and Frank, 1994; Köhler *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 2001). J'ai donc décidé d'investiguer un lien potentiel entre la présence de ces trois gènes et la régulation du TPS *ExlBA*.

a. Les régulateurs de type LysR codés par *RS13145* et *RS13150*

Les deux gènes *RS13145* et *RS13150*, situés en amont d'*exlB*, codent pour des protéines de la famille LysR (Introduction/Chapitre 3.1.b). Le site de liaison des régulateurs de cette famille consiste en la séquence consensus CTATA-N₉-TATAG, qui est cependant peu conservée (Oliver *et al.*, 2016). Plusieurs sites de liaison sont présents en amont du gène régulé et sont généralement proches du promoteur. Il arrive néanmoins que ces sites soient très éloignés, comme c'est le cas pour l'opéron *gcv* chez *E. coli* pour lequel GcvA se fixe sur deux sites centrés à -229 pb et -258 pb du TSS (Wilson *et al.*, 1995).

Au début de ma thèse, le site consensus CTATA-N₉-TATAG n'était pas encore publié et seule une séquence répétée inversée de type T-N₁₁-A avait été identifiée pour la fixation des régulateurs de type LysR (Goethals *et al.*, 1992). Différentes séquences répondant à ce consensus sont présents au niveau du locus *exlBA*, suggérant une régulation potentielle d'*exlBA* par les protéines *RS13145* et/ou *RS13150*. Les deux gènes codant pour ces protéines ont donc été délétés ensemble du génome de la souche IHMA87 (IHMA87 $\Delta lysR$ -like) mais l'analyse par western-blot des sécrétomes de la souche sauvage et du mutant n'a révélée aucune différence dans les quantités

d'ExlA sécrétée (Fig. 35.A). La cytotoxicité de la souche IHMA87 $\Delta lysR-like$ a également été analysée par mesure du relargage de LDH et était similaire à celle de la souche sauvage (Fig. 35.B). Ainsi, j'ai conclu que les protéines RS13145 et RS13150 n'avaient pas de rôle dans la régulation d'ExlBA dans nos conditions de test.

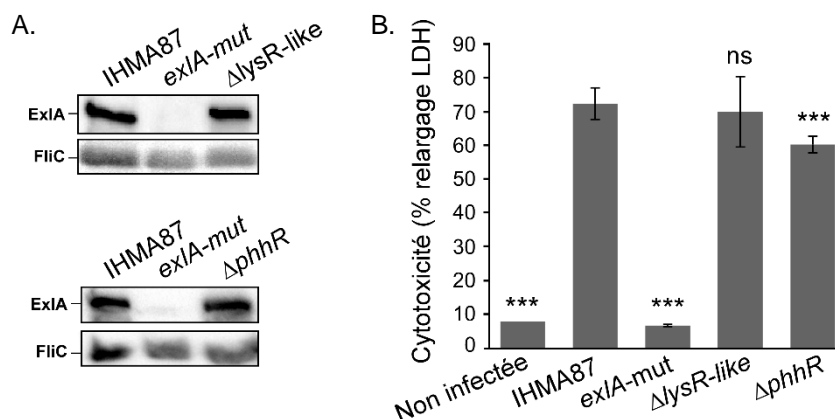


Figure 35 : Les protéines de type LysR RS13145 et RS13150 et PhhR ne sont pas impliquées dans l'activation d'ExlBA, dans les conditions d'étude.

A) Analyse de la sécrétion d'ExlA par IHMA87, IHMA87 $\Delta lysR-like$ et IHMA87 $\Delta phhR$ cultivées jusqu'à $DO_{600}=1$ en LB. Les protéines des surnageants de culture ont été précipitées au TCA/DOC et l'immuno-blot réalisé avec des Ac anti-ExlA et anti-FliC. La flagelline FliC est utilisée comme contrôle de charge du sécrétome. B) Cytotoxicité ExlBA-dépendante de différentes souches d'IHMA87. Le relargage de la LDH a été mesuré après 4h30 d'infection de cellules épithéliales à MOI=10. Les expériences ont été réalisées en triplicats et les barres d'erreur indiquent l'écart type standard (T test ; *** : valeur- $p \leq 0,001$; ns : non significatif).

b. Le facteur transcriptionnel PhhR

En aval d'*exlA*, le gène *RS13175* code pour le régulateur transcriptionnel PhhR connu pour être impliqué dans la régulation du métabolisme de la phénylalanine (Song and Jensen, 1996). En présence de phénylalanine, PhhR se fixe sur le promoteur et active la transcription de l'opéron adjacent *phhABC*, permettant ainsi le catabolisme de l'acide aminé. Plus récemment, le régulon de PhhR a été étudié chez *Pseudomonas putida* et comprend des gènes dont les produits sont des facteurs impliqués dans le catabolisme ou la biosynthèse de composés aromatiques, mais également des régulateurs transcriptionnels, des composants de pompes à efflux ou des protéines à fonction non identifiée (Herrera *et al.*, 2010). Il a été démontré que PhhR possède un domaine de liaison à l'ADN C-terminal et peut activer ou réprimer la transcription des gènes, de façon dépendante ou indépendante de la phénylalanine. Enfin, décrit comme un membre de la famille des FT de type NtrC (dépendants de σ^{54}), différentes études ont montré que PhhR interagit avec des promoteurs qui recrutent l'ARN polymérase contenant le σ^{70} (Song and Jensen, 1996; Herrera and Ramos, 2007; Herrera *et al.*, 2009). La séquence consensus du site de liaison de PhhR est

TGTAAAN₆TTTACA (Herrera *et al.*, 2009). La localisation du site par rapport au promoteur est très variable, mais toujours en amont du TSS.

Même si aucun site spécifique pour la liaison de PhhR n'a été identifié en amont d'*exlBA*, j'ai cherché un rôle potentiellement indirect de ce facteur sur la régulation d'ExlBA en créant un mutant de délétion. Cependant, comme le montre la [figure 35](#), l'absence du FT n'influe pas sur la sécrétion de l'exolysine en milieu LB et n'impacte que très faiblement la cytotoxicité ExlBA-dépendante d'IHMA87. Ces résultats indiquent que PhhR n'est pas impliqué dans le contrôle de l'expression des gènes codant pour le système ExlBA en LB.

PhhR régulant la transcription de certaines cibles en présence de phénylalanine, j'ai également voulu déterminer l'implication de PhhR en réponse à cet acide aminé en milieu minimum. Cependant, la protéine ExlA apparaissant trop dégradée en western-blot, je n'ai malheureusement pas réussi à analyser l'impact sur ExlA dans ce milieu.

c. Discussion et Perspectives

Au cours de ces travaux, j'ai montré que les trois régulateurs transcriptionnels codés par des gènes environnants à *exlBA* (*RS13145*, *RS13150*, *RS13175*) n'avaient pas de rôle sur l'expression d'*exlBA* dans les deux conditions testées, *in vitro* en LB et *in vivo* au cours de l'infection de cellules épithéliales. Grâce à l'analyse du transcriptome d'IHMA87 par RNAseq, l'expression des gènes codant pour ces régulateurs en culture LB a pu être vérifiée, bien que les gènes codant pour les facteurs de type LysR le soient faiblement. Il est cependant possible que ces régulateurs puissent être impliqués dans le contrôle d'ExlBA dans des conditions précises non testées durant cette étude. En effet, puisque les régulateurs de la famille LysR sont généralement activés par un co-facteur, les deux FT *RS13145* et *RS13150* peuvent éventuellement ne pas avoir eu d'effet à cause de l'absence de leur molécule activatrice dans les conditions que j'ai étudiées. Malgré tout, le fait qu'ils n'aient pas de rôle dans cette régulation est en accord avec l'absence, au niveau du locus *exlBA*, du site consensus identifié ultérieurement pour les facteurs de type LysR par Oliver *et al.* (Oliver *et al.*, 2016). De ce fait, il est encore une fois important de mener une veille scientifique pour tenter d'identifier des conditions dans lesquelles ces facteurs sont plus fortement exprimés ou sont connus pour contrôler l'expression de gènes. Concernant PhhR, son effet en fonction de la présence de phénylalanine pourrait être investigué par RT-qPCR, même si cela risque d'être compliqué pour la souche sauvage puisque la transcription d'*exlBA* observée avec la souche IHMA87 *exlA::lacZ* est encore plus faible en milieu minimum qu'en milieu LB. Enfin, puisque les régulateurs de type LysR et PhhR peuvent être des répresseurs, il serait intéressant de surexprimer ces trois gènes chez IHMA87 pour rechercher un éventuel effet négatif des protéines sur ExlBA. Cela est devenu possible maintenant que nous avons le mutant Δ *erfA* qui surexprime *exlBA*.

2. Etude ciblée sur deux systèmes de régulation globaux : QS et Gac/Rsm

a. Analyse du rôle du Quorum Sensing

Le QS est un système de communication inter-bactéries permettant de moduler l'expression de divers gènes en fonction de la densité bactérienne et impliquant chez *P. aeruginosa* 4 systèmes : *las*, *rhl*, *pqs*, *iqs* (Introduction/Chapitre 3.2.b).

Au début de ma thèse, j'avais observé par RT-qPCR une augmentation du niveau d'ARNm *exlB* et *exlA* au cours de la croissance de la souche CLJ1 (Fig. 30.A), ce qui pouvait indiquer un contrôle par le QS. J'ai alors créé des mutants en délétant les gènes codant pour les régulateurs transcriptionnels LasR, RhlR et PqsR et analysé leur implication sur la transcription d'*exlBA* dans les souches contenant la fusion *exlA-lacZ*. Comme le montre la figure 36.A, PqsR et RhlR n'ont pas d'effet sur la transcription d'*exlBA*, quelle que soit la phase de croissance. L'analyse de la toxicité bactérienne par incorporation d'IP au cours d'une infection de cellules épithéliales a permis de conclure que l'absence de LasR n'influe pas la cytotoxicité dépendante d'ExlBA et a confirmé l'absence de rôle de PqsR (Fig. 36.B). Suite aux difficultés de mutagenèse, seules les souches $\Delta pqsR$ *exlA::lacZ*, $\Delta rhlR$ *exlA::lacZ*, $\Delta pqsR$ et $\Delta lasR$ ont pu être étudiées. Au cours de cette étude, la voie *iqs* n'a pas été analysée car elle était peu caractérisée et son signal activateur, qui est la déplétion en phosphate, n'avait pas d'effet sur l'expression d'*exlBA*.

En conclusion, le QS n'est pas impliqué dans la régulation du facteur de virulence ExlBA.

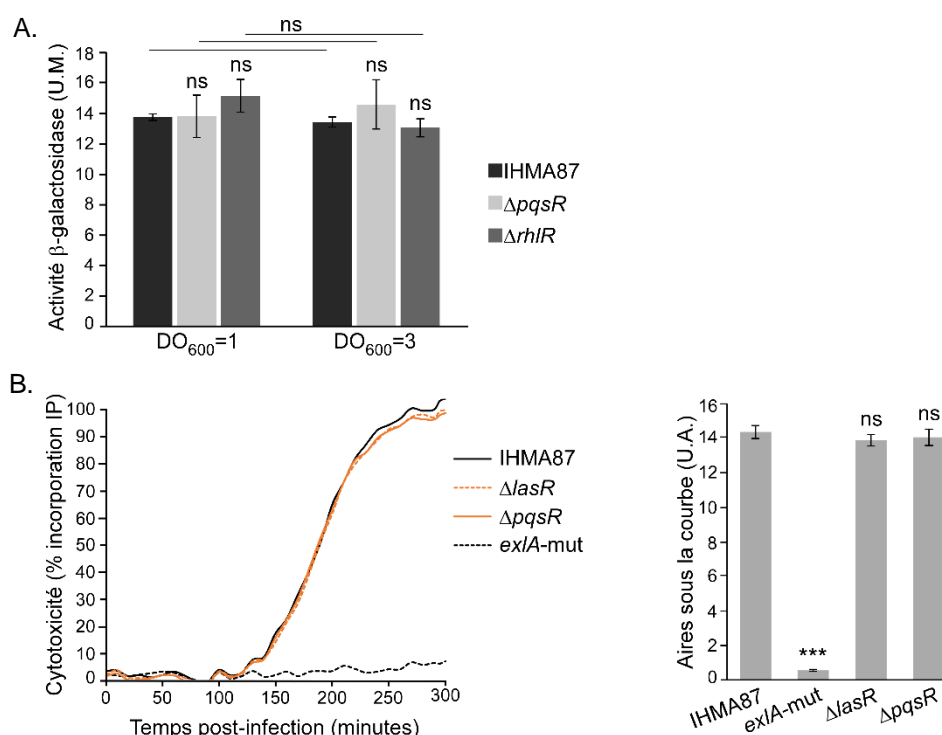


Figure 36 : Le Quorum Sensing ne régule pas ExlBA.

A) Activités β-galactosidase obtenues avec les souches IHMA87, Δpqsr et ΔrhIR portant la fusion transcriptionnelle chromosomique *exlA-lacZ* après culture en LB jusqu'à DO₆₀₀=1 (phase exponentielle de croissance) et 3 (phase stationnaire de croissance). B) Cytotoxicité ExlBA-dépendante de la souche sauvage et des mutants Δ*lasR* et Δ*pqsR* par suivi de l'incorporation d'IP au cours de l'infection de cellules épithéliales A549 à MOI=10 et représentation des aires sous la courbe entre 110 et 280 min post-infection. Les expériences ont été réalisées en triplicats et les barres d'erreur indiquent l'écart-type standard (T test ; *** : valeur-*p* ≤ 0,001 ; ns : non significatif).

b. Etude de l'implication de la voie Gac/Rsm

La voie de régulation globale Gac/Rsm est composée du TCS GacS/GacA, qui contrôle l'expression de deux petits ARN régulateurs RsmY et RsmZ dont le rôle est de séquestrer le régulateur post-transcriptionnel RsmA.

Chez *P. aeruginosa*, la séquence consensus de RsmA sur l'ARNm est CANGGAYG, avec « GGA » 100% conservée (Schulmeyer *et al.*, 2016). La position de ce site coïncide généralement avec la séquence de Shine-Dalgarno. Après analyse de la séquence d'*exlBA* avec le logiciel RSAT, un site correspondant en partie à ces critères a été identifié (séquence CATGAAGG centrée à 11 bases en amont du site d'initiation de la traduction) mais la séquence « GGA » du consensus n'était pas conservée. Une régulation post-transcriptionnelle directe de la synthèse d'ExlBA par RsmA était donc peu probable, mais RsmA pouvait tout de même participer indirectement à sa régulation. Un mutant de délétion a été construit et a montré qu'en LB la quantité d'ExlA synthétisée et sécrétée était plus faible en absence de RsmA (Fig. 37.A). Le mutant Δ*rsmA* présentait aussi une toxicité vis-à-vis des cellules épithéliales A549 plus faible que celle de la

souche sauvage (Fig. 37.B). Ces résultats montrent donc que RsmA participe positivement à la synthèse d'ExlBA.

Pour confirmer le phénotype du mutant, une complémentation a été initiée. Néanmoins, malgré l'utilisation de divers vecteurs de complémentation (réplicatif/intégratif, sous contrôle du *pbad*/de son propre promoteur), il a été impossible de rétablir la synthèse de RsmA chez le mutant (données non montrées).

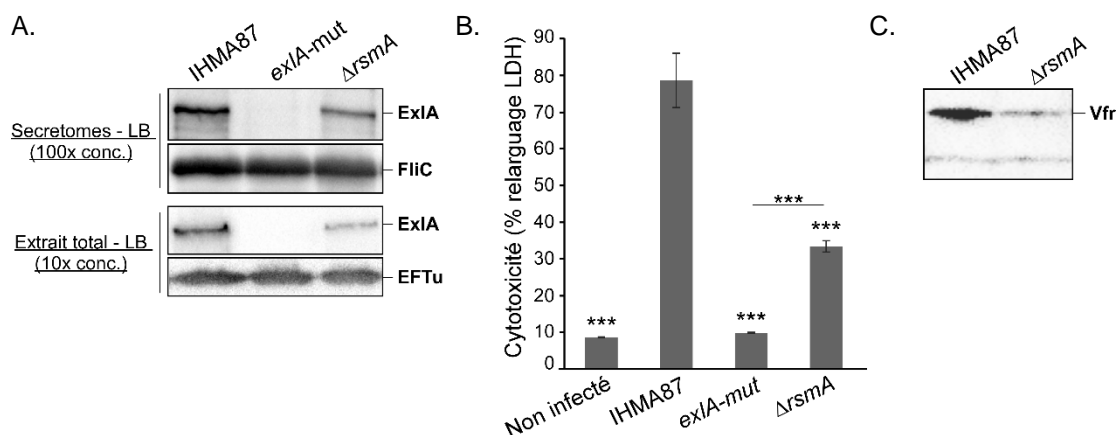


Figure 37 : RsmA active la synthèse d'ExlBA et de Vfr.

A) Analyse de la synthèse d'ExlA par IHMA87 et le mutant $\Delta rsmA$. Les souches ont été cultivées jusqu'à $DO_{600}=1$ en LB. L'immuno-blot a été réalisé à partir du surnageant de culture et du lysat bactérien. Des Ac anti-ExlA, anti-FliC et anti-EFTu ont été utilisés pour le marquage.

B) Cytotoxicité ExlBA-dépendante du mutant IHMA87 $\Delta rsmA$ comparée à celle de la souche IHMA87 WT. Le relargage de la LDH a été mesuré après 4 heures d'infection de cellules épithéliales A549 à MOI=10. L'expérience a été réalisée en triplicats et les barres d'erreur indiquent l'écart type standard (T test ; *** : valeur- $p \leq 0,001$). C) Analyse de la synthèse de Vfr par le mutant $\Delta rsmA$ et la souche sauvage, cultivés jusqu'à $DO_{600}=1$ en LB. L'immuno-blot a été réalisé à partir de la fraction cytosolique et des Ac anti-Vfr ont été utilisés pour le marquage. La bande inférieure correspond à un contaminant et sert de contrôle de charge.

Des travaux menés au cours de cette thèse ont montré que le FT Vfr régule positivement l'expression d'*exlBA* (Résultats/Chapitre 3.1). Or, Burrowes *et al.* ont décrit en 2006 qu'un mutant PA01 $\Delta rsmA$ exprimait moins le gène *vfr* que la souche sauvage (Burrowes *et al.*, 2006) et effectivement, comme le montre la figure 37.C, le mutant IHMA87 $\Delta rsmA$ produit moins de Vfr que la souche IHMA87 WT. Il est donc probable que l'effet du mutant $\Delta rsmA$ sur la synthèse d'ExlA soit dû à l'expression plus faible de *vfr*.

c. Discussion et perspectives

Après avoir observé un effet de la phase de croissance sur la quantité en ARNm de CLJ1 par RT-qPCR, la recherche d'un rôle potentiel du QS dans cette régulation semblait pertinente. Cependant, cet effet de la croissance n'a pas été observé chez IHMA87 lorsqu'il a été investigué plus tard en analysant la transcription d'*exlBA* à l'aide d'une fusion transcriptionnelle. Ceci est en

accord avec l'absence de rôle des FT LasR, PqsR et RhlR sur la transcription d'*exlBA* ou la cytotoxicité d'IHMA87. L'expression d'*exlBA* ne semble donc pas être modulée en fonction de la croissance chez IHMA87. De plus, Julian Trouillon a également observé que l'absence de RpoS, facteur sigma de la phase stationnaire, n'affectait pas l'expression d'*exlBA*. Cela renforce la conclusion selon laquelle l'augmentation du niveau en ARNm au cours de la croissance de CLJ1 est soit spécifique à cette souche soit due à une variation de la stabilité des ARNm en fonction de la croissance, effet qui pourrait potentiellement impliquer le régulateur post-transcriptionnel RsmA.

La régulation d'ExlBA est effectivement intégrée dans la voie globale de régulation Gac/Rsm puisque l'absence de RsmA impacte négativement la synthèse d'ExlA. Il est probable que la diminution de production d'ExlBA chez le mutant $\Delta rsmA$ résulte de l'effet sur la synthèse de Vfr. En effet, RsmA stimule par un mécanisme inconnu la transcription du gène *vfr* et, comme cela sera présenté dans le chapitre suivant, ce FT est un activateur de l'expression d'*exlBA*. Néanmoins, même si le site consensus de RsmA identifié sur le locus d'*exlBA* n'est pas entièrement conservé, le fait que RsmA puisse avoir un rôle indépendant de Vfr sur *exlBA* ne peut être exclu à ce stade de l'étude.

Pour mieux caractériser le rôle du régulateur post-transcriptionnel dans le contrôle d'ExlBA, il faudrait analyser la transcription des gènes grâce à la fusion chromosomique *exlA-lacZ* et la stabilité des ARN par RT-qPCR après traitement à la rifampicine dans le mutant $\Delta rsmA$. Afin d'avoir un niveau d'expression d'*exlBA* suffisamment élevé pour observer un potentiel effet sur la stabilité des ARNm, il est envisagé d'utiliser le fond génétique $\Delta erfA$. L'étude de la synthèse du TPS chez un double mutant $\Delta rsmA \Delta vfr$ comparée à celle des mutants simples (en conditions classiques de culture en LB ou suite à la chélation du calcium pour stimuler la voie CyaB-AMPC/Vfr) permettra également d'identifier un potentiel effet de RsmA, indépendant de Vfr.

Chapitre 3

Régulation d'ExlBA : L'importance des messagers secondaires

Dans ce troisième chapitre, les résultats permettant de comprendre comment le facteur de virulence ExlBA est contrôlé par les deux messagers secondaires AMPc et di-GMPc sont développés.

1. La voie CyaB-AMPc/Vfr active l'expression d'exlBA

L'AMPc est une molécule présente chez de nombreux organismes, procaryotes comme eucaryotes, dans lesquels elle a toujours un rôle important de régulation (Gancedo, 2013). Chez les procaryotes, l'AMPc est un régulateur allostérique des facteurs transcriptionnels de la famille CRP. Le premier facteur de type CRP a été décrit chez *E. coli* pour être un activateur de la répression catabolique, mais les protéines de type CRP ont différents rôles physiologiques selon les bactéries, comme par exemple la régulation du métabolisme chez *P. putida*, de la virulence et de la formation de biofilm chez *Vibrio cholerae* ou encore de la motilité chez *Sinorhizobium meliloti*

(Soberón-Chávez *et al.*, 2017). Chez *P. aeruginosa*, l'orthologue de CRP, Vfr, n'est pas impliqué dans la repression catabolique mais possède une fonction de régulateur global ayant un rôle important dans le contrôle de la virulence : un tiers des gènes de son régulon sont impliqués dans la synthèse des SST2 et SST3 ainsi que des facteurs de motilité flagelle et T4_aP (Introduction/Chapitre 3.2.c ; Suh *et al.*, 2002; Wolfgang *et al.*, 2003). Vfr peut également activer la transcription de certains gènes de façon indépendante de l'AMPc, comme c'est le cas du gène *lasR* (Fuchs *et al.*, 2010a).

a. Vfr active la transcription d'*exlBA* *in vitro*

En 2006, Kanack *et al.* ont déterminé le site consensus de liaison de Vfr chez *P. aeruginosa* (5'-ANWWTGNGAWNYAGWTCACAT-3') en analysant l'interaction entre ce régulateur transcriptionnel et différentes régions promotrices (Kanack *et al.*, 2006). Grâce au logiciel RSAT, la présence de cette séquence consensus a été identifiée dans la région promotrice d'*exlBA*, centrée à 95 pb en amont du site d'initiation de la transcription d'*exlBA* (Fig. 38).

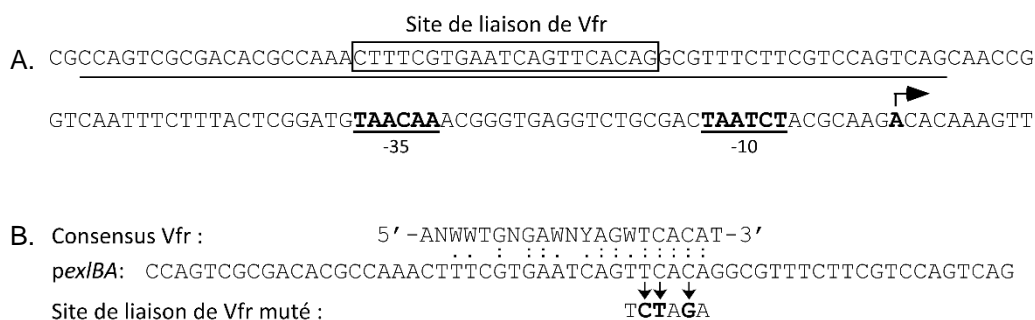


Figure 38 : Un site putatif de liaison de Vfr a été identifié en amont des boîtes promotrices d'*exlBA*.

A) Séquence du promoteur d'*exlBA*. Le TSS est en gras et surmonté d'une flèche, les boîtes promotrices associées sont en gras et soulignées. Le site de liaison de Vfr est encadré. La séquence 60-mer de la sonde de retard sur gel est soulignée. B) Comparaison de la séquence consensus de Vfr avec celle trouvée au niveau de la région promotrice d'*exlBA*. La mutation introduite sur le chromosome de la souche VBM (Vfr Binding Mutated) et présente sur la sonde *pexlBA*-mut de l'expérience de retard sur gel est également indiquée.

Afin de décrypter le rôle potentiel de Vfr dans la régulation d'*exlBA*, un mutant a été construit en délétant le gène *vfr*. L'impact de cette mutation sur la transcription des gènes *exlB* et *exlA* a été analysé par RT-qPCR, indiquant que les niveaux d'ARNm *exlB* et *exlA* étaient plus faibles chez le mutant Δvfr que chez la souche sauvage (Fig. 39.A). La quantité de protéine ExlA sécrétée dans le surnageant de culture par le mutant cultivé en milieu LB était également réduite en comparaison de celle de la souche WT (Fig. 39.B). Enfin, ces deux phénotypes ont été partiellement restaurés par la complémentation du mutant avec le vecteur miniCTX-*vfr*. Ces résultats indiquent donc que, *in vitro*, Vfr contrôle positivement l'expression d'*exlBA*.

Il est à noter que chez la souche $\Delta vfr::vfr$, les phénotypes ne sont pas parfaitement rétablis par la complémentation avec le miniCTX-*vfr* (*vfr* sous le contrôle de son promoteur natif). En effet, il a été observé par western-blot que l'intégration du miniCTX-*vfr* chez le mutant Δvfr ne permettait pas de rétablir un niveau en protéine Vfr similaire à celui de la souche WT (Fig 39.C). Une complémentation avec le vecteur pSW196-*vfr* comprenant le gène *vfr* sous le contrôle d'un promoteur *pbad* a également été tentée mais ne permettait pas de compléter, même partiellement, le mutant. Lors de l'étude de l'activation du promoteur d'*exsA* par Vfr, Marsden *et al.* ont utilisé un plasmide répliatif avec un promoteur inductible pour compléter leur mutant Δvfr (Marsden *et al.*, 2016).

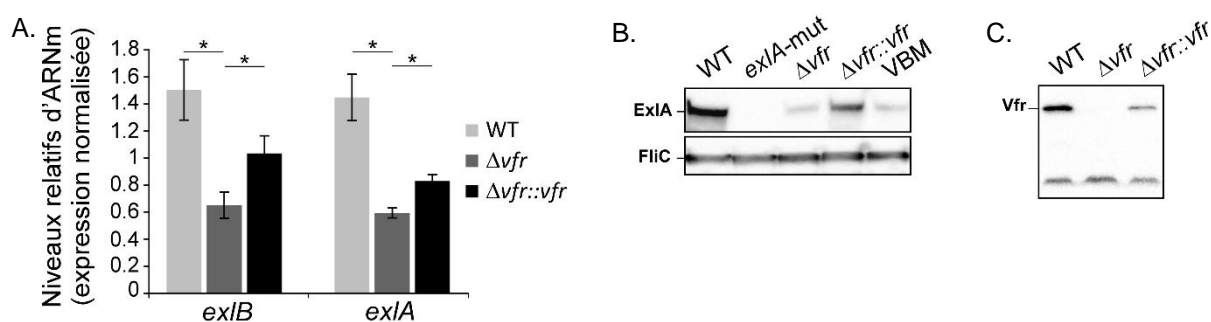


Figure 39 : Vfr contrôle l'expression d'*exlBA*.

A) Analyse de l'expression relative d'*exlB* et *exlA* par RT-qPCR chez IHMA87, Δvfr et $\Delta vfr::vfr$.

Le gène *rpoD* a été utilisé comme référence. L'expérience a été réalisée en triplicats et les barres d'erreur indiquent l'erreur type sur la moyenne (T test ; * : valeur- $p \leq 0,05$). B) Analyse de la sécrétion d'ExlA par les souches indiquées. Les protéines du surnageant de culture ont été précipitées au TCA/DOC (conc. 100x) et l'immuno-blot réalisé avec des Ac anti-ExlA et anti-FliC (contrôle de charge). C) Analyse de la synthèse de Vfr chez la souche sauvage, le mutant Δvfr et la souche complétement par western-blot. L'immuno-blot a été réalisé à partir de la fraction cytosolique et des Ac anti-Vfr utilisés pour le marquage. La bande en bas du gel correspond à un contaminant utilisé comme contrôle de charge. Pour toutes les expériences, les bactéries ont été cultivées jusqu'à $DO_{600}=1$ en LB.

Pour vérifier si la régulation de l'expression d'*exlBA* résultait d'une interaction directe entre Vfr et le promoteur, j'ai réalisé une expérience de retard sur gel. Pour cela, la protéine recombinante His₆-Vfr, surproduite chez *E. coli*, a été purifiée par chromatographie d'affinité au nickel. En utilisant une sonde marquée par le fluorochrome Cy5, j'ai pu confirmer que Vfr se liait directement à la région promotrice d'*exlBA* (Cy5-*pexlBA*, Fig. 38.B et 40.A). L'expérience a montré que cette interaction avait une forte affinité, la constante d'équilibre étant d'environ 2,5 nM. Les résultats ont également prouvé que Vfr se liait spécifiquement au niveau du site consensus identifié puisque la mutation de 3 bases de ce site empêchait l'interaction entre Vfr et le promoteur d'*exlBA* (Cy5-*pexlBA*-mut, Fig. 38.B et 40.B). De plus, une compétition pour la fixation de Vfr sur la sonde fluorescente était visible en présence d'un excès de sonde non marquée sauvage, mais n'était pas observé en présence d'un excès de sonde non marquée mutée sur les 3

mêmes bases (Fig. 40.C). Vfr se lie donc directement et spécifiquement au niveau du site de liaison prédit dans le promoteur d'*exlBA*.

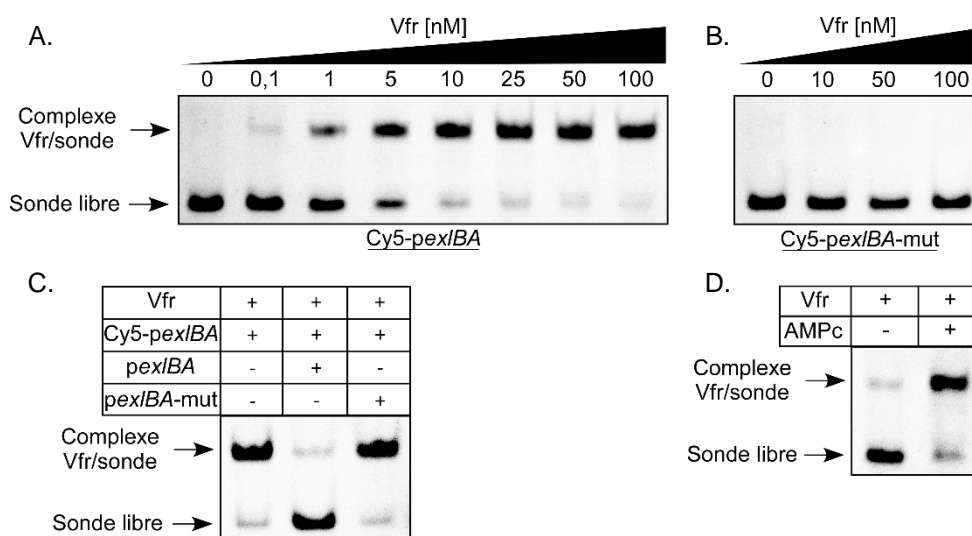


Figure 40 : Vfr se lie directement au promoteur d'*exlBA*, en présence d'AMPc.

Expériences de retard sur gel. A et B) Les concentrations indiquées de protéine recombinante His₆-Vfr ont été incubées avec 0,5 nM de sonde *Cy5-pexlBA* (A) ou *Cy5-pexlBA-mut* (B). Les flèches indiquent la position du complexe formé par l'interaction Vfr/sonde ou des sondes seules. C) La protéine His₆-Vfr (50 nM) a été incubée avec la sonde *Cy5-pexlBA* et, quand indiqué, avec un excès de 200 fois plus de sonde sauvage (*pexlBA*) ou mutée (*pexlBA-mut*) non marquée. D) La protéine His₆-Vfr (50 nM) a été incubée avec la sonde *Cy5-pexlBA* en présence ou en absence d'AMPc (20 μM). Dans les panneaux A, B et C, 20 μM d'AMPc étaient présents dans le tampon de réaction.

b. Vfr contrôle la cytotoxicité dépendante d'ExlBA

Pour déterminer si Vfr contrôlait également l'expression d'*exlBA in vivo*, j'ai étudié la toxicité du mutant Δvfr ainsi que sa capacité à sécréter ExlA au cours d'une infection de cellules épithéliales A549. Comme le montre les figures 41.A et B, l'absence de Vfr chez IHMA87 Δvfr a impacté négativement ces deux phénotypes.

Chez les souches de type PA01 et PA14, la voie AMPc/Vfr active l'assemblage des T_{4a}P grâce au TCS FimS/AlgR (Introduction/Chapitre 3.1.c et Chapitre 3.2.c.i). Cette régulation est également effective chez IHMA87 puisque, comme l'illustre la figure 41.C, l'absence de Vfr induit également une diminution de la capacité à « twitcher » chez cette souche. Effectivement, le site de liaison de Vfr sur le promoteur de *fimS* chez PA01 est conservé sur le génome d'IHMA87 (Fig. 41.D). Cependant, il a été démontré au laboratoire que les T_{4a}P étaient nécessaires à la toxicité dépendante d'ExlBA, en favorisant la proximité entre les bactéries et les cellules eucaryotes (Basso *et al.*, 2017a ; Fig. 41.A). Pour confirmer la régulation directe de Vfr sur *exlBA in vivo*, il fallait donc différencier l'effet de Vfr sur les T_{4a}P de celui que ce facteur transcriptionnel exerce sur *exlBA* au cours de l'infection. La souche VBM (Vfr Binding Mutated) a donc été créée en

introduisant au niveau du promoteur du TPS sur le chromosome d'IHMA87 la mutation inhibant la liaison *Vfr/pexlBA in vitro* (Fig. 38.B et 40.B). *Vfr* ne pouvait alors plus induire la transcription d'*exlBA* mais activait toujours l'assemblage des T₄aP et la motilité de type *twitching* (Fig. 42.A et 41.C). La sécrétion d'ExlA par la souche VBM, après infection de cellules épithéliales ou en culture LB, était similaire à celle du mutant Δvfr (Fig. 38.B et 40.B), ce qui indique que *Vfr* a un rôle direct sur *exlBA in vitro* et *in vivo*. De plus, la cytotoxicité d'IHMA87 VBM était réduite par rapport à celle de la souche sauvage, même si elle restait légèrement plus importante que la toxicité du mutant Δvfr (Fig. 40.A). Ces résultats confirment donc la régulation d'ExlA et des T₄aP par *Vfr*. De plus, ils illustrent l'importance de ces deux facteurs de virulence au cours de l'infection.

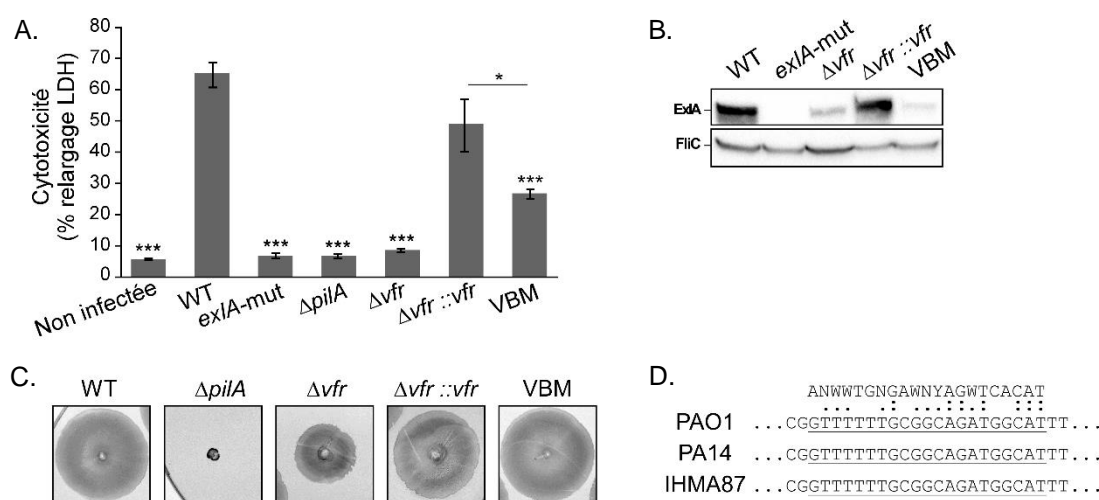


Figure 41 : *Vfr* contrôle la synthèse d'ExlA et du pilus de type 4 *in vivo*.

A) Cytotoxicité ExlA-dépendante d'IHMA87, des mutants indiqués et des souches complémentées après 4,5 heures d'infection de cellules A549 à MOI=10. L'expérience a été réalisée en triplicats et les barres d'erreur indiquent l'écart type standard. La valeur-*p* a été déterminée par un T test et est indiquée au-dessus des barres d'erreurs lorsque la différence avec la souche WT est significative (***) : valeur-*p* ≤ 0,001 ; * : valeur-*p* ≤ 0,05). B) Analyse de la sécrétion d'ExlA par IHMA87, le mutant Δvfr , la souche complémentée et VBM, après 2h30 d'infection de cellules épithéliales A549. Les protéines du surnageant d'infection ont été précipitées au TCA/DOC et l'immuno-blot a été réalisé avec des Ac anti-ExlA et anti-FliC (contrôle de charge). C) Capacité de *twitching* des souches indiquées. La surface de *twitching* a été colorée au Bleu de Coomassie après 48h à 37°C. D) Conservation de séquence du site de fixation de *Vfr* au niveau du promoteur de *fimS* sur le génome de PAO1, PA14 et IHMA87.

c. La régulation d'*exlBA* par *Vfr* est médiée par l'AMPc et *CyaB*

Puisque *Vfr* peut se fixer à certains promoteurs en absence d'AMPc, je me suis intéressée à l'importance de ce messager secondaire dans la voie de régulation d'*exlBA*.

Il a été démontré chez *P. aeruginosa* que le niveau intracellulaire en AMPc peut être modulé par la concentration en calcium extracellulaire (Inclan *et al.*, 2011). Il est en effet bien établi que la chélation du calcium par l'ajout d'EGTA augmente la synthèse d'AMPc en activant la synthèse et/ou l'activité de l'adénylate cyclase *CyaB* (Wolfgang *et al.*, 2003; Inclan *et al.*, 2011).

Cette condition est notamment utilisée pour activer l'expression des gènes du SST3 *in vitro* (Frank, 1997). J'ai donc mesuré l'activité β -galactosidase des souches IHMA87, Δvfr et VBM cultivées en milieu LB supplémenté ou déplété en calcium (suite à l'addition de CaCl_2 ou d'EGTA respectivement) pour observer l'influence de la concentration intracellulaire en AMPc des bactéries. Chez la souche sauvage, la chélation du calcium par l'EGTA a induit une augmentation de l'activité β -galactosidase d'un facteur 1,6 (Fig. 42.A.). Ceci montre que l'AMPc est probablement important pour l'activation de l'expression d'*exlBA*. Au contraire, la déplétion en calcium n'a pas affecté l'activité β -galactosidase dans les souches Δvfr et VBM, démontrant ainsi le lien direct entre l'AMPc et l'activation de la transcription par Vfr. J'ai également pu vérifier au cours de l'expérience de retard sur gel que Vfr avait besoin d'AMPc pour se lier sur le promoteur *exlBA in vitro*. En effet, en absence du messager secondaire il n'y avait pas d'interaction entre Vfr et *pexlBA* (Fig. 40.D). Vfr active donc la transcription d'*exlBA* de façon AMPc-dépendante.

Chez *P. aeruginosa*, l'AMPc peut être synthétisé par les deux adénylate cyclases CyaA et CyaB. Afin de déterminer la source d'AMPc dans nos conditions d'étude, j'ai analysé l'impact de la délétion de *cyaA* et *cyaB* sur la transcription d'*exlBA* et la toxicité d'IHMA87 vis à vis de cellules épithéliales (Fig. 42.A et B). Seule l'activité β -galactosidase du mutant $\Delta cyaB$ *exlA::lacZ* était réduite d'un facteur 2 comparée à celle de la souche IHMA87 *exlA::lacZ*. Ce mutant présentait également une absence de réponse à la chélation du calcium extracellulaire. De plus, contrairement au mutant $\Delta cyaA$, la souche $\Delta cyaB$ manifestait une toxicité réduite, similaire à celle du mutant Δvfr . Enfin, la double délétion de *cyaB* et *cyaA* au sein de la même souche n'accentuait pas le phénotype du mutant simple $\Delta cyaB$. Ces résultats démontrent ainsi que l'adénylate cyclase CyaB est l'enzyme prépondérante dans la synthèse d'AMPc permettant l'activation de l'expression d'*exlBA* par Vfr chez IHMA87. Il s'agit ainsi de la même source majoritaire d'AMPc que chez les souches classiques de *P. aeruginosa* (Wolfgang *et al.*, 2003).

Il est important de noter que la légère diminution de cytotoxicité observée pour la souche $\Delta cyaA$ est due à la manipulation génétique des bactéries. En effet, une souche « révertante » (qui a subi la même manipulation génétique mais retrouvé le génotype sauvage au terme de la deuxième recombinaison) a été isolée en même temps que le mutant et présente la même réduction de toxicité (données non montrées). Ce phénomène est observé occasionnellement lors de la manipulation de souches cliniques. Cela explique qu'il n'y ait pas de différence significative entre la cytotoxicité de $\Delta cyaA$ et $\Delta cyaA::cyaA$ et que la souche $\Delta cyaA::cyaA$ ne semble pas être complémentée.

L'absence d'effet de la délétion de *cyaA* pouvant être due à un défaut d'expression du gène chez la souche sauvage, j'ai vérifié que le gène *cyaA* était bien exprimé chez IHMA87 en utilisant les données de transcriptomique obtenues au laboratoire par RNAseq. Ne disposant pas d'Ac spécifique, je n'ai toutefois pas pu contrôler que la protéine CyaA était bien synthétisée.

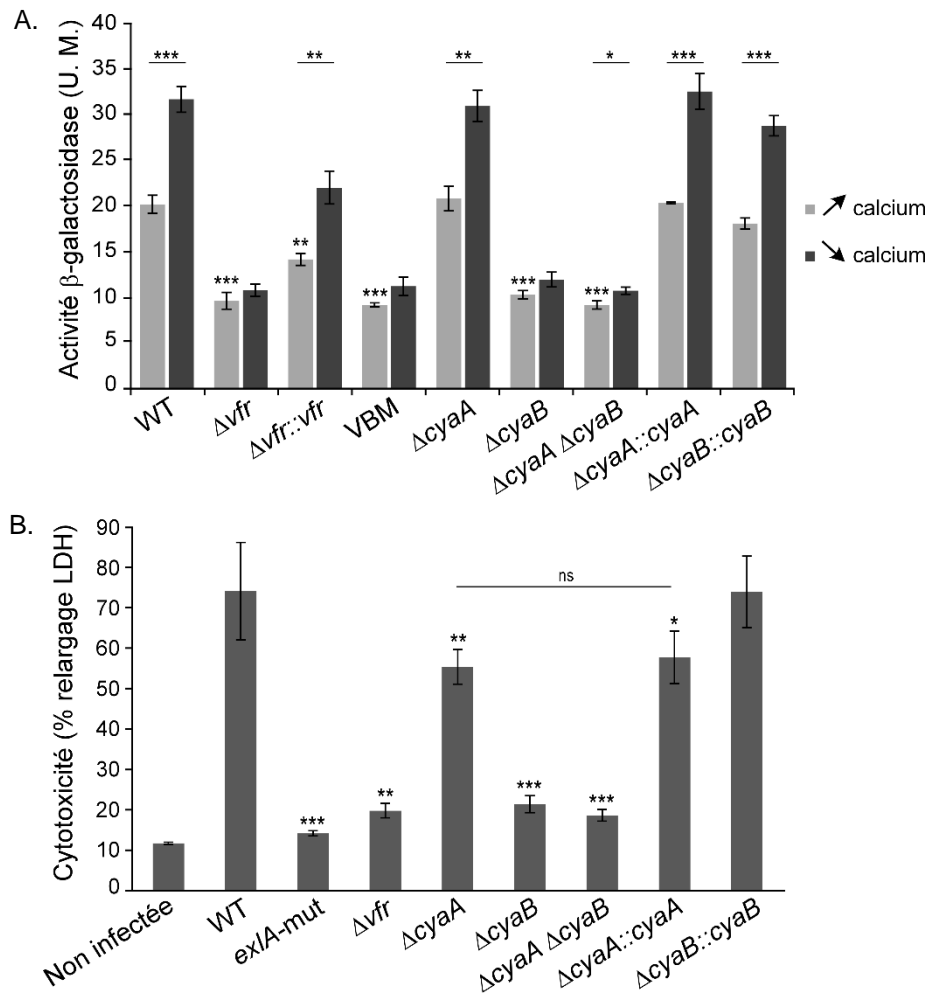


Figure 42 : CyaB est l'adénylate cyclase nécessaire à l'activation d'exlBA par Vfr, in vitro et in vivo.

A) Activités β-galactosidase obtenues avec IHMA87, les mutants indiqués et les souches complémentées, portant toutes la fusion transcriptionnelle chromosomique *exlA-lacZ*. Les bactéries ont été cultivées en LB supplémenté en CaCl_2 (↑ calcium) ou EGTA (↓ calcium) jusqu'à $\text{DO}_{600}=1,5$. B) Cytotoxicité ExlBA-dépendante des souches indiquées après 4,5 heures d'infection de cellules épithéliales A549 à $\text{MOI}=10$. Les expériences ont été réalisées en triplicats et les barres d'erreur indiquent l'écart type standard. La valeur-p a été déterminée par un T test et est indiquée au-dessus des barres d'erreur lorsque la différence avec la souche WT est significative (***) : valeur-p $\leq 0,001$; ** : valeur-p $\leq 0,01$; * : valeur-p $\leq 0,05$; ns : non significatif).

En conclusion, la voie CyaB-AMPC/Vfr stimule de façon directe l'expression d'exlBA. L'AMPC, synthétisé par CyaB, interagit avec le régulateur transcriptionnel Vfr pour l'activer allostériquement. Le complexe AMPC/Vfr ainsi formé se lie ensuite directement et spécifiquement au promoteur des gènes *exlBA* pour favoriser leur transcription.

d. L'absence de virulence de PA7 est liée à une mutation sur le gène *vfr*.

De façon intéressante, les phénotypes du mutant IHMA87 Δvfr rappelaient ceux observés avec la souche de référence PA7. Effectivement, PA7 est une souche qui ne possède pas de motilité de type *twitching*, qui est non cytotoxique envers les cellules épithéliales et qui sécrète peu de protéines ExlA.

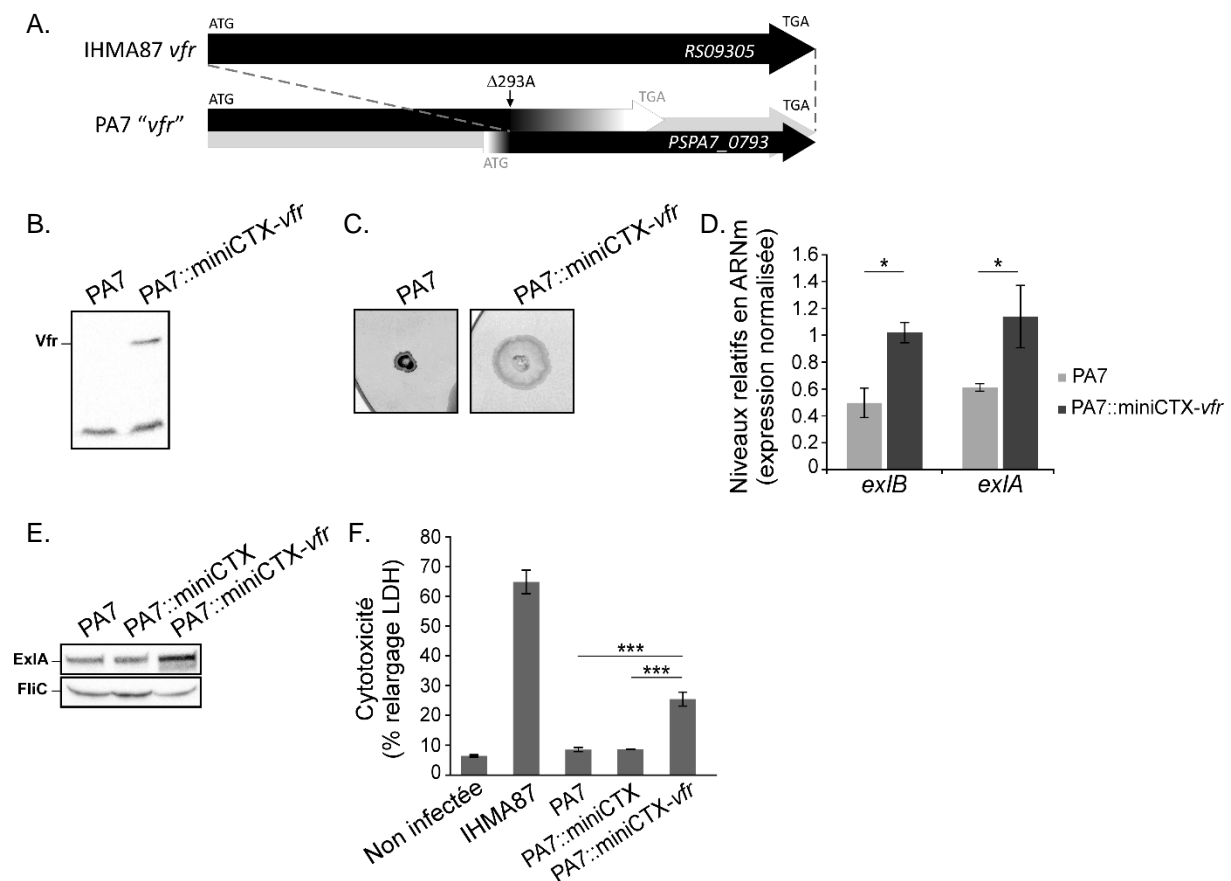


Figure 43 : Une mutation sur le gène *vfr* impacte la virulence de PA7.

A) Représentation du gène *vfr* chez IHMA87 et PA7 (pseudomonas.com). La délétion naturelle chez PA7 est indiquée par une flèche et « $\Delta 293A$ ». Cette délétion induit la création de deux cadres de lecture putatifs, celui indiqué en 3' correspond au gène annoté *vfr* sur la database pseudomonas.com. B) Analyse de la synthèse de Vfr par les souches PA7, PA7::miniCTX et PA7::miniCTX-*vfr*, cultivées jusqu'à $DO_{600}=1$ en LB. L'immuno-blot a été réalisé à partir de la fraction cytosolique et des Ac anti-Vfr utilisés pour le marquage. La bande inférieure correspond à un contaminant et sert de contrôle de charge. C) Capacité de *twitching* des souches PA7 et PA7::miniCTX-*vfr*. La surface de *twitching* a été révélée au Bleu de Coomassie après 48h à 37°C. D) Estimation des niveaux d'ARNm *exlB* et *exlA* par RT-qPCR des souches indiquées après culture en LB jusqu'à $DO_{600}=1$. E) Analyse de la sécrétion d'ExlA par PA7, PA7::miniCTX et PA7::miniCTX-*vfr*. Les protéines du surnageant ont été précipitées au TCA/DOC après culture des bactéries en LB jusqu'à $DO_{600}=1$. L'immuno-blot a été réalisé avec des Ac anti-ExlA et anti-FliC (contrôle de charge). F) Cytotoxicité ExlA-dépendante d'IHMA87 et des souches indiquées de PA7 après 4,5 heures d'infection de cellules épithéliales A549 à $MOI=10$. Les expériences ont été réalisées en triplicats et les barres d'erreur indiquent l'erreur type sur la moyenne (D) ou l'écart type standard (F) (T test ; *** : valeur- $p \leq 0,001$; * : valeur- $p \leq 0,05$).

En comparant la séquence du gène *vfr* de PA7 à celui d'IHMA87 (pseudomonas.com), j'ai observé la délétion d'une base : l'adénine 293. Cette délétion induit un changement de cadre de lecture et laisse la possibilité à deux cadres différents (Fig. 43.A). Le premier coderait pour une protéine de 161 acides aminés et posséderait les 98 aa de l'extrémité N-terminale de Vfr. Le second cadre de lecture, annoté comme étant le gène *vfr* chez PA7, permettrait la synthèse d'une protéine de 118 aa, contenant les 116 résidus C-terminaux de Vfr. La délétion de l'A293 et l'absence de synthèse de Vfr ont été confirmées par séquençage d'un fragment amplifié par PCR à partir du génome de PA7 et western-blot (Fig. 43.B). L'absence de Vfr chez PA7 pouvait donc être la cause de défaut de cytotoxicité ExlBA-dépendante de cette souche. J'ai alors introduit le plasmide de complémentation chez PA7 et vérifié que la souche PA7::miniCTX-*vfr* synthétisait Vfr, bien que faiblement, et était capable de développer une motilité de type *twitching* (Fig. 43.B et C). En synthétisant le facteur transcriptionnel, la souche PA7 exprimait de façon plus importante les gènes *exlB* et *exlA*, sécrétait plus d'exolysine et était devenue toxique envers les cellules épithéliales (Fig. 43.D à F). Ces résultats montrent que l'absence de Vfr chez PA7 est en partie responsable de la virulence réduite de cette souche.

Après avoir démontré que Vfr activait également la virulence ExlBA-dépendante chez PA7, la synthèse de ce facteur a été analysée chez différentes souches de type PA7 par western-blot afin de déterminer si le niveau de virulence pouvait être corrélé à la quantité de protéines Vfr produites par les souches. Des quantités de Vfr très variées ont été observées chez les 19 souches testées (Fig. 44). Il a notamment été noté une forte production chez les souches PA213, CLJ1 et JT87. A l'inverse, IHMA567230 et PA70 ne synthétisent que très peu de Vfr. Cependant, aucun lien direct entre la virulence et la production de Vfr n'a pu être mis en évidence par cette analyse. Par exemple, la souche PA213 est peu toxique et ne sécrète pas ExlA mais synthétise beaucoup de Vfr (Fig. 44; Reboud *et al.*, 2016).

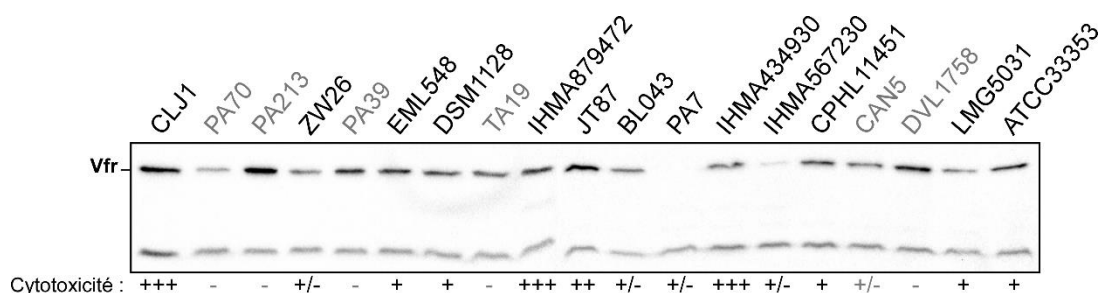


Figure 44 : Analyse de la synthèse de Vfr chez différentes souches de type PA7.

Analyse de la synthèse de Vfr chez 19 souches de type PA7 par western-blot. Les bactéries ont été cultivées jusqu'à $DO_{600}=1$ en LB. L'immuno-blot a été réalisé à partir de la fraction cytosolique et des Ac anti-Vfr ont été utilisés pour le marquage. La bande en bas du gel correspond à un contaminant et sert de contrôle de charge. La cytotoxicité moyenne des 19 souches envers différents types cellulaires est indiquée par les sigles + (cytotoxique) et - (non cytotoxique) d'après Reboud *et al.*, 2016.

e. Discussion et Perspectives

Cette étude a montré que la voie AMPc/Vfr stimule la virulence liée à ExlBA chez les souches de type PA7 en se liant au promoteur des gènes *exlBA* afin d'activer leur transcription (Fig. 45). L'adénylate cyclase CyaB est nécessaire pour la synthèse du messenger secondaire et la déplétion en calcium est un signal activateur de cette voie de régulation. Les résultats de cette étude ont été valorisés par la publication d'un article dans la revue « *Journal of Bacteriology* » en juin 2018 (Berry *et al.*, 2018). Au cours de ce projet, j'ai travaillé en collaboration avec différents membres de l'équipe. J'ai notamment été aidée par Mylène Genthon-Robert pour les expériences de RT-qPCR et Michel Ragno pour la purification de la protéine Vfr. Julian Trouillon a participé aux dosages des activités β -galactosidase.

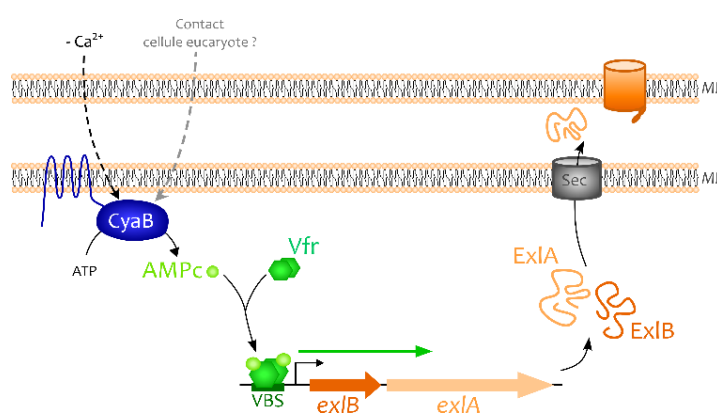


Figure 45 : Schéma de la régulation de l'expression d'*exlBA* par la voie AMPc/Vfr.

Activation de l'expression par Vfr qui se fixe, en présence d'AMPc, sur un site spécifique en amont d'*exlBA*. Cette régulation est activée par la chélation du calcium extracellulaire selon un mécanisme non identifié et pourrait être activée au contact de cellules eucaryotes.

Grâce à la détermination du TSS et des boîtes promotrices d'*exlBA*, il est possible de voir que Vfr se fixe en amont du promoteur, au niveau d'un site centré à -95pb du TSS, et ainsi déduire le mécanisme d'activation sous-jacent. Les FT de type CRP peuvent activer la transcription de gènes selon 3 mécanismes différents (Busby and Ebright, 1999). Au niveau des promoteurs de classe I, CRP se fixe en amont des boîtes promotrices et permet le recrutement de l'ARN polymérase via le domaine C-terminal de la sous-unité α . Lorsque le site de liaison de CRP chevauche les boîtes promotrices, il s'agit d'un promoteur de classe II. Le recrutement de l'ARN polymérase s'exerce alors par les domaines N- et C-terminaux de la sous-unité α . Enfin, l'activation de la transcription des promoteurs dépendants de CRP de classe III nécessite l'intervention de plusieurs molécules CRP et/ou une coopération avec d'autres facteurs activateurs. L'activation de la transcription d'*exlBA* par Vfr serait donc de classe I, avec un recrutement de l'ARN polymérase par l'extrémité C-terminale de la sous-unité α . Cette classe d'activation est effectivement généralement mise en place pour faciliter le recrutement de la polymérase au niveau de

promoteurs dont la séquence de l'une ou des deux boîtes n'est pas optimale, comme cela est le cas pour le promoteur d'*exlBA* (Browning and Busby, 2016 ; [Résultats/Chapitre 1.3](#)).

Malgré l'activation de la transcription d'*exlBA* par la voie de régulation globale AMPc/Vfr et une forte affinité de Vfr pour le promoteur d'*exlBA*, le niveau d'expression de ces gènes est extrêmement faible. De plus, le niveau de transcription d'*exlBA* n'est que 2 fois plus important chez la souche sauvage que chez le mutant Δvfr , comme observé par RT-qPCR et avec la fusion transcriptionnelle. Cela démontre à quel point l'expression d'*exlBA* est verrouillée dans nos conditions d'études, notamment par le répresseur ErfA. En effet, l'activation de la transcription d'*exlBA* par Vfr est plus importante chez le mutant $\Delta erfA$ (activité β -galactosidase de 420 UM chez $\Delta erfA$ et 90 UM chez $\Delta erfA \Delta vfr$, soit une différence d'un facteur 4,6). Puisque la cytotoxicité bactérienne des souches de type PA7 dépend d'ExlBA, cela indique soit qu'une faible expression est suffisante pour induire une toxicité, soit que la transcription d'*exlBA* est augmentée au cours de l'infection par le contact avec les cellules eucaryotes. L'expression d'*exlBA* étant activée par la voie CyaB-AMPc/Vfr, l'hypothèse selon laquelle le système Pil/Chp pourrait permettre de détecter la présence de cellules eucaryotes et transmettre le signal pour stimuler l'expression d'*exlBA* semble pertinente ([Résultats/Chapitre 1.2](#)).

La suite de ce projet consisterait donc à déterminer si cette hypothèse est correcte. L'analyse par RT-qPCR n'ayant pas aboutie, il faudrait soit optimiser le protocole soit envisager d'autres techniques et se placer dans un fond génétique $\Delta erfA$ pour avoir un meilleur signal, en espérant ne pas masquer l'éventuelle activation par le contact cellulaire du fait d'une expression trop élevée ou d'un éventuel rôle de ErfA. Une fusion transcriptionnelle chromosomique *exlA::gfp* pourrait être utilisée pour suivre par microscopie de fluorescence la transcription d'*exlBA* durant l'infection. Si la fluorescence est suffisamment importante pour être détectée, il serait alors possible de distinguer le niveau d'expression d'*exlBA* des bactéries libres dans le milieu d'infection de celui des bactéries au contact des cellules et la cinétique d'activation de l'expression pourrait être observée. L'analyse de cette fusion *gfp* par cytométrie en flux serait également possible. Une hybridation *in situ* des ARNm est envisageable grâce à la technologie RNAscope (Wang *et al.*, 2012), méthode qui a notamment fait ses preuves pour la détection d'ARN viraux au cours d'infections (Yú *et al.*, 2016; Xia *et al.*, 2017). Enfin, des Ac monoclonaux spécifiques d'ExlA viennent d'être développés au laboratoire et des protocoles d'immunomarquage fluorescent sont en cours d'optimisation au laboratoire par Viviana Job et Stéphanie Bouillot ([Résultats/Chapitre 3.2.c](#)). Il sera donc très prochainement possible de visualiser et comparer la quantité d'ExlA synthétisée par les bactéries ayant été ou non en contact avec des cellules eucaryotes par microscopie de fluorescence.

L'analyse du rôle de Vfr sur l'expression d'*exlBA* chez PA7 a permis d'expliquer que la faible virulence de cette souche de référence était en partie due à la mutation du gène *vfr*. Alors que Roy *et al.* avaient bien référencé le gène *PSPA7_4396* comme un pseudogène créé par une mutation dans le gène codant pour le FT PqsR (*mvfr*), la mutation au niveau de *vfr* n'avait pas été observée et/ou reportée (Roy *et al.*, 2010). L'acquisition de mutations spontanées sur le gène *vfr* chez *P. aeruginosa* a déjà été décrite, notamment au cours de l'occupation chronique des poumons de patients atteints de mucoviscidose ou suite à une pression sélective des conditions de croissance en laboratoire telles que la culture statique (Fox *et al.*, 2008; Mena *et al.*, 2008). La mutation chez PA7 pourrait ainsi faire suite à l'adaptation de la souche pour un environnement particulier. Nous pouvons également affirmer que la mutation de *pqsR* chez PA7 n'impacte pas sa virulence *ExlBA*-dépendante. Effectivement, nous avons à la fois observé que ce régulateur du QS n'a pas de rôle sur *exlBA* chez IHMA87 et vérifié que la complémentation de PA7 avec un plasmide contenant le gène *pqsR* sauvage de PAO1 ne modifiait pas la toxicité de la souche (donnée non montrée).

Malgré le lien établi entre Vfr et la toxicité d'IHMA87 ou de PA7, l'étude de la quantité de Vfr produite par différentes souches de type PA7 n'a pas permis de mettre en évidence de lien direct entre le niveau de synthèse du FT et la toxicité bactérienne. Toutefois, il est possible que le niveau intracellulaire en AMPc chez certaines souches étudiées ne soit pas suffisant pour permettre la fixation de Vfr ou que le site de liaison du FT au niveau du promoteur *exlBA* soit muté chez d'autres souches. Les séquences de toutes les souches utilisées n'étant pas accessibles, il n'est pas possible de vérifier la conservation du site de liaison de Vfr au niveau du promoteur *exlBA* parmi les souches de type PA7. Pour compléter cette analyse, il faudrait donc vérifier l'intégrité du site de fixation au niveau du *pexlBA* des 19 souches, par amplification et séquençage de la région promotrice. De plus, il faudrait également analyser les niveaux d'expression d'*exlBA* des souches et les comparer directement à leur quantité de Vfr puisqu'il est possible que les gènes *exlBA* soient exprimés mais régulés négativement au niveau post-transcriptionnel chez les souches non cytotoxiques.

2. Le di-GMPc régule la sécrétion d'*ExlA*

Le premier messenger secondaire à avoir été découvert en 1987 est le di-GMPc (Jenal *et al.*, 2017). Cette molécule signal est très répandue et a été identifiée aussi bien chez les bactéries que chez les cellules mammifères. Le di-GMPc a été décrit pour son implication dans la réponse immunitaire des cellules eucaryotes et il est également reconnu comme le messenger secondaire bactérien universel, possédant surtout un rôle prépondérant dans la régulation de la virulence et la formation des biofilms chez les bactéries.

Le di-GMPc est, par exemple, l'un des facteurs majeurs qui contrôlent le cycle cellulaire de *Caulobacter crescentus* (Jenal *et al.*, 2017). Il induit également l'inhibition de la motilité de type *swimming* chez *E. coli* et *Salmonella enterica* Typhimurium par le blocage de la rotation du flagelle, notamment en se fixant sur l'effecteur YcgR (Jenal *et al.*, 2017). Chez *Clostridium difficile*, le di-GMPc empêche la synthèse des toxines TcdA et TcdB en inhibant l'expression de *sigD* grâce à un riboswitch (McKee *et al.*, 2013). Le facteur sigma alternatif SigD active normalement l'expression d'un autre facteur sigma alternatif, TcdR, qui induit la transcription des gènes *tcdA* et *tcdB*. Chez *P. aeruginosa*, le di-GMPc est reconnu comme le médiateur principal contrôlant la mise en place de la vie sessile et est associé à un mode de vie communautaire (Introduction/Chapitre 3.2.c).

a. IHMA87, une souche produisant beaucoup de di-GMPc

En manipulant IHMA87, nous nous sommes aperçus que la souche avait tendance à former de petits agrégats en culture liquide. Elle est également hyper-adhérente et s'attache par exemple facilement aux cônes en plastique. Ces phénotypes sont connus pour être activés par le di-GMPc (D'Argenio and Miller, 2004), ce qui a été beaucoup décrit chez *P. aeruginosa* dans les travaux concernant l'étude des variants SCV (*Small Colony Variants* ; Starkey *et al.*, 2009). En accord avec la littérature, d'autres phénotypes liés à un niveau intracellulaire élevé en di-GMPc ont également été observés chez IHMA87, telle la formation intense de biofilm ou une motilité de type *swarming* peu développée, suggérant que la souche synthétise beaucoup de ce messager secondaire (Fig. 46.A et B ; Baker *et al.*, 2016; Valentini and Filloux, 2016).

J'ai alors analysé le niveau intracellulaire en di-GMPc d'IHMA87 grâce au rapporteur fluorescent *pcdrA-gfp*, qui est basé sur une fusion transcriptionnelle entre le promoteur de *cdrA* modulé par le di-GMPc et le gène rapporteur *gfp* (Rybtke *et al.*, 2012 ; Introduction/Chapitre 4.1). La figure 46.C montre que la fluorescence des bactéries augmente au cours de la croissance et permet de confirmer que le niveau du second messager est plus élevé chez IHMA87 que chez PAO1. IHMA87 est donc une souche de *P. aeruginosa* qui possède une concentration intracellulaire particulièrement élevée en di-GMPc.

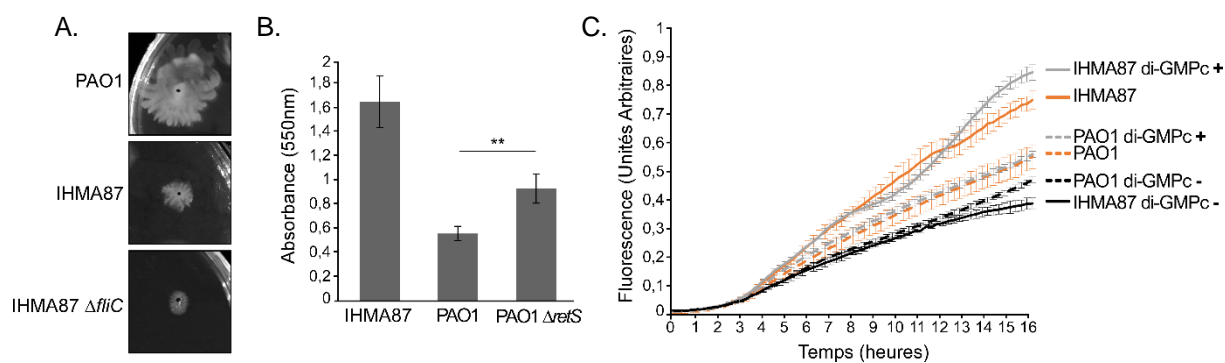


Figure 46 : IHMA87 produit plus de di-GMPc que PAO1.

A) Motilité de type *swarming* des souches IHMA87, PAO1 et IHMA87 $\Delta fliC$ (contrôle négatif), après 24h à 37°C sur gélose semi-solide. B) Formation de biofilm à l'interface air/liquide des souches IHMA87, PAO1 et PAO1 $\Delta retS$ (le phénotype hyper-biofilm de ce mutant est lié à sa production massive d'exopolysaccharides ; Bordi *et al.*, 2010 ; Kong *et al.*, 2013). Quantification de la formation de biofilm par mesure de l'absorbance du cristal violet après 6h à 37°C. C) Comparaison du niveau en di-GMPc intracellulaire chez IHMA87::pSW196, IHMA87::pSW196-*wspR** (di-GMPc +), IHMA87::pSW196-PA2133 (di-GMPc -), PAO1::pSW196, PAO1::pSW196-*wspR** (di-GMPc +) et PAO1::pSW196-PA2133 (di-GMPc -) au cours de la croissance. La fluorescence des souches contenant le vecteur pTn7-*pcdrA-gfp*(ASV)^c a été mesurée toutes les 15 minutes pendant 16h. Le graphe représente le niveau de fluorescence rapporté à la DO₆₀₀. L'induction du *pbad* du vecteur pSW196 a été réalisée par ajout de 0,025% d'arabinose. Les expériences ont été réalisées en triplicats et les barres d'erreur indiquent l'écart-type standard (** : valeur-*p* ≤ 0,01 ; T test).

b. Le di-GMPc contrôle la sécrétion d'ExlA

Du fait de l'implication du messenger secondaire dans le contrôle de la virulence bactérienne et d'une concentration intracellulaire particulièrement importante chez la souche cytotoxique IHMA87, il semblait intéressant d'étudier un rôle potentiel du di-GMPc dans la régulation d'ExlBA.

Le di-GMPc étant synthétisé et dégradé par un nombre conséquent d'enzymes chez *P. aeruginosa*, une stratégie de délétion de tous leurs gènes était difficilement envisageable pour analyser le rôle de ce messenger secondaire sur ExlBA (Introduction/Chapitre 3.2.c.ii). Nous avons préféré moduler artificiellement le niveau intracellulaire en di-GMPc chez IHMA87 à l'aide de plasmides spécifiques. Ces vecteurs permettent la synthèse soit de la diguanylate cyclase *WspR** (la mutation du résidu 242 permet d'empêcher la rétro-inhibition de la DGC par le di-GMPc ; Moscoso *et al.*, 2011) qui synthétise le di-GMPc, soit de la phosphodiesterase PA2133 qui dégrade le second messenger (Moscoso *et al.*, 2011 ; Matériel et Méthodes/Tableau 4).

Les sécrétomes des souches IHMA87 WT et « di-GMPc +/- » ont été analysés après culture en milieu LB ou après 2h30 d'infection de cellules épithéliales. La modulation du di-GMPc intracellulaire a un impact sur ExlBA puisque sa diminution a entraîné une augmentation de la quantité d'ExlA dans le sécrétome bactérien dans les deux conditions d'études (Fig. 47.A/Sécrétomes). Aucun effet n'a cependant été observé pour la souche « di-GMPc + »

synthétisant beaucoup du messenger secondaire. En fait, nous avons observé que le vecteur pSW196-*wspR** n'induisait pas d'augmentation du niveau intracellulaire en di-GMPc chez IHMA87 (Fig. 46.C). Après avoir pensé que cela pouvait dû au fait que la souche sauvage était déjà saturée en di-GMPc, nous nous sommes rendu compte que le vecteur pSW196-*wspR** n'était pas fonctionnel puisque l'augmentation en messenger secondaire n'a pas non plus été observée dans la souche PAO1::pSW196-*wspR** (Fig. 46.C). Pour tenter d'obtenir une souche produisant plus de di-GMPc, il a été entrepris de muter directement sur le génome d'IHMA87 le gène *wspF*, codant pour l'inhibiteur de WspR, afin d'induire l'activation constitutive de la diguanylate cyclase (Bantinaki *et al.*, 2007 ; Introduction/Chapitre 3.2.c.ii). Il s'agit notamment de la stratégie employée par Lin Chua *et al.* pour leur analyse du transcriptome de PAO1 en fonction du niveau intracellulaire en di-GMPc (Lin Chua *et al.*, 2017). Cependant, la souche Δ *wspF* obtenue présente un phénotype d'agrégation extrêmement développé, ce qui pose des problèmes techniques pour suivre convenablement la croissance des bactéries. Je n'ai pas encore pu étudier correctement l'effet de cette mutation sur la dynamique de sécrétion d'ExlA. Un des moyens possibles pour remédier à ce problème serait de déléter les gènes *pelF* et *pslD*, codant pour des exopolysaccharides impliqués dans l'agrégation bactérienne, chez le mutant Δ *wspF* (Almblad *et al.*, 2015). Il est à noter que la conclusion concernant l'inefficacité du pSW196-*wspR** ayant été tardive et l'obtention de la souche Δ *wspF* étant récente, les expériences présentées dans ce manuscrit ont toutes été réalisées avec la souche IHMA87::pSW196-*wspR** pour la condition « di-GMPc + ».

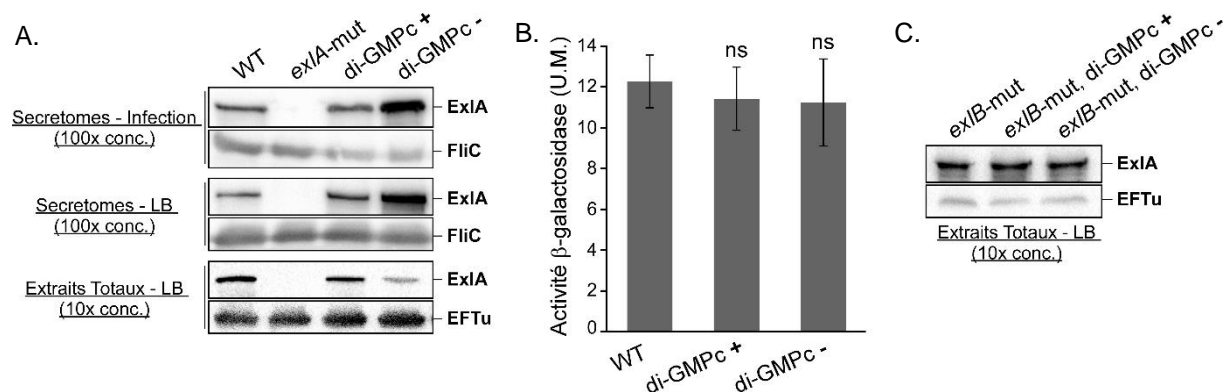


Figure 47 : Le di-GMPc affecte la sécrétion d'ExlA.

A) Analyse de la synthèse et de la sécrétion d'ExlA par les souches IHMA87::pSW196 (WT), IHMA87::pSW196-*wspR** (di-GMPc +) et IHMA87::pSW196-PA2133 (di-GMPc -) cultivées en LB jusqu'à $DO_{600}=1$ ou après 2h30 d'infection de cellules épithéliales. Les sécrétomes ont été obtenus après précipitation au DOC/TCA et l'immuno-blot réalisé avec des Ac anti-ExlA et anti-FliC ou anti-EFTu. B) Activité β -galactosidase des souches IHMA87::*exlA-lacZ* indiquées après culture en LB jusqu'à $DO_{600}=1$. L'expérience a été réalisée en triplicats et les barres d'erreur indiquent l'écart type standard (ns : non significatif, déterminé avec un T test). C) Analyse de la synthèse d'ExlA par les souches IHMA87 *exlB-mut*::pSW196, IHMA87 *exlB-mut*::pSW196-*wspR** (di-GMPc +) et IHMA87 *exlB-mut*::pSW196-PA2133 (di-GMPc -). L'immuno-blot a été réalisé à partir des extraits bactériens totaux, avec des Ac anti-ExlA et anti-EFTu. Le facteur d'élongation cytosolique EFTu et la protéine FliC ont été utilisés comme contrôle de charge.

c. Le di-GMPc module la translocation d'ExlA au travers d'ExlB

Le di-GMPc affecte donc la quantité d'ExlA sécrétée et pourrait, pour cela, agir selon 3 manières différentes : en modulant la transcription des gènes *exlBA* (1), en contrôlant la synthèse des protéines ExlBA (2) et/ou en affectant le processus de sécrétion de la toxine ExlA (3).

(1) Comme notifié précédemment, le di-GMPc est capable de contrôler l'expression de certains gènes, par exemple celle des gènes codants pour le TPS de *P. aeruginosa* CdrAB (régulation servant de base pour le système senseur *pcdrA-gfp* ; [Introduction/Chapitre 4.1](#)). L'impact potentiel du second messenger sur l'expression d'*exlBA* a donc été analysé en utilisant les souches contenant la fusion chromosomique *exlA-lacZ*, ce qui a démontré que la modulation du di-GMPc intracellulaire n'affectait pas la transcription de ces gènes ([Fig. 47.B](#)).

(2) Le di-GMPc peut également avoir un rôle de régulateur post-transcriptionnel, par exemple en liant les ARNm *via* des riboswitchs (Ramesh, 2015; Inuzuka *et al.*, 2016, 2018). Pour observer l'effet du messenger secondaire sur la synthèse d'ExlA, j'ai introduit les plasmides permettant la modulation du niveau de di-GMPc dans une souche IHMA87 mutée au niveau du gène *exlB* (« *exlB*-mut » ; [Matériel et Méthodes/Tableau 3](#)). En l'absence de synthèse d'ExlB, toutes les protéines ExlA produites sont bloquées dans les bactéries. J'ai ainsi pu vérifier par western-blot que la quantité d'ExlA était similaire quelle que soit la concentration intracellulaire en di-GMPc ([Fig. 47.C](#)). Le laboratoire ne disposant pas d'Ac anti-ExlB, je n'ai pas pu contrôler la production d'ExlB en fonction du niveau en di-GMPc, mais, la synthèse d'ExlA n'étant pas affectée, celle d'ExlB ne l'est probablement pas non plus.

(3) Finalement, le di-GMPc peut jouer un rôle sur la translocation de protéines au travers des membranes interne et externe. En effet, il inhibe, entre autres, l'activité ATPase des protéines FliI de *P. fluorescens* (appareil d'export du flagelle) et HrcN de *P. syringae* (appareil d'export du SST3) par interaction directe (Trampari *et al.*, 2015). Le di-GMPc régule aussi la sécrétion de l'adhésine CdrA dans le milieu extracellulaire par protéolyse, grâce au récepteur membranaire LapD et à la protéase périplasmique LapG ([Introduction/Chapitre 4.1](#)). En analysant les extraits totaux des bactéries IHMA87 après culture en LB, j'ai observé une proportion d'ExlA réduite chez la souche di-GMPc – ([Fig. 47.A](#), extrait total). Puisque dans cette même condition ExlA est en plus grande quantité dans le sécrétome, cela suggère que le di-GMPc affecte le processus de sécrétion de la toxine : lorsqu'il y a moins de di-GMPc dans la bactérie, la sécrétion de la toxine ExlA est augmentée.

Le di-GMPc régule donc négativement la sécrétion d'ExlA, sans affecter l'expression des gènes *exlBA* ni la synthèse des protéines.

Pour moduler ainsi l'export d'ExlA, le di-GMPc pouvait agir soit sur la translocation d'ExlA à travers la membrane interne, soit sur son export à travers la membrane externe ou encore retenir la protéine dans le périplasma.

La protéine ExlA est prédite pour être transportée dans le périplasma par le système de translocation Sec. Afin de déterminer si le di-GMPc pouvait inhiber la translocation des protéines par ce système ou induire l'accumulation d'ExlA dans le périplasma, j'ai réalisé un fractionnement cellulaire des souches « di-GMPc + » et « di-GMPc - » et analysé par western-blot la quantité de protéines ExlA et DsbA dans chaque compartiment cellulaire (Fig. 48.A). DsbA est une protéine périplasmique, dont la translocation par le système Sec dépend à la fois de SRP et de l'activité ATPase de SecA (Schierle *et al.*, 2003; Shimohata *et al.*, 2005 ; Introduction/Chapitre 2.2 ; Fig. 10.B). Pour cette expérience, j'ai utilisé le fond génétique *ΔerfA* qui permettait d'avoir une meilleure analyse grâce à la quantité plus importante d'ExlA synthétisée (l'effet de la modulation du di-GMPc étant également observable chez la souche IHMA87 *ΔerfA*, comme le montre la figure 48.A). J'ai observé que les quantités de DsbA dans le périplasma d'IHMA87 restaient constantes malgré la modulation de la concentration intracellulaire en di-GMPc (compartiment « P » ; Fig. 48.A). La voie de translocation générale Sec n'est donc pas affectée par la modulation du messenger secondaire. Ce résultat était en accord avec le fait qu'aucun rôle du di-GMPc sur la voie de sécrétion générale Sec n'ait été décrit et que les profils de sécrétion des souches « di-GMPc + » et « di-GMPc - » après coloration à l'argent étaient similaires (si le système Sec avait été affecté, la sécrétion de nombreuses protéines aurait également été modifiée ; données non montrées). De plus, aucune accumulation d'ExlA n'ayant été observée dans le périplasma quelle que soit la concentration en di-GMPc intracellulaire (compartiment « P » ; Fig. 48.A), le di-GMPc bloque probablement ExlA à la membrane externe, au niveau du transporteur ExlB.

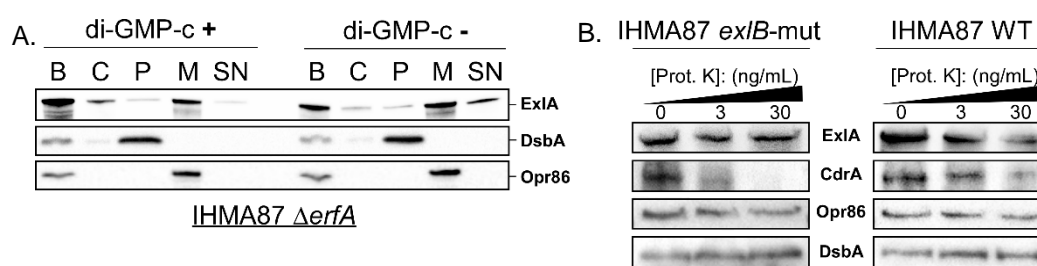


Figure 48 : Le di-GMPc bloquerait ExlA au niveau de la membrane externe.

A) Fractionnement cellulaire des souches IHMA87 *ΔerfA* contenant les plasmides pSW196-*wspR** (di-GMPc +) ou pSW196-PA2133 (di-GMPc -). L'immuno-blot a été réalisé avec des anticorps anti-ExlA, anti-DsbA et anti-Opr86. Opr86 et DsbA servent de marqueurs membranaire et périplasmique, respectivement. B : bactéries (extrait total), C : cytosol, M : membranes, P : périplasma, SN : surnageant (non précipité au DOC/TCA, d'où le faible signal en condition di-GMPc +). B) Test d'accessibilité à la protéinase K réalisé avec les souches IHMA87 WT et *exlB*-mut. Les bactéries ont été cultivées en LB jusqu'à $DO_{600}=1$. Après élimination du surnageant de culture, les bactéries ont été incubées en présence de concentrations croissantes de protéinase K. Des anticorps anti-ExlA, anti-CdrA, anti-Opr86 et anti-DsbA ont été utilisés pour l'immuno-blot. La porine Opr86 (membrane externe) et DsbA sont des contrôles négatifs tandis que CdrA est un contrôle positif de dégradation par la protéinase K.

d. ExlA est soit sécrétée soit maintenue à la surface des bactéries

Le devenir de certains TpsA, tels que les adhésines, n'est pas d'être sécrété mais de rester ancré dans la membrane des bactéries. Ainsi, puisque la dégradation du di-GMPc intracellulaire induit la sécrétion d'ExlA et qu'IHMA87 produit beaucoup de di-GMPc, il semblait possible qu'ExlA soit principalement maintenue à la membrane externe de cette souche virulente pour favoriser la toxicité bactérienne. Cette hypothèse était d'autant plus pertinente qu'elle apportait une explication au fait qu'il y ait besoin d'une proximité étroite entre bactéries et cellules eucaryotes pour observer une cytotoxicité bactérienne et que la protéine ExlA purifiée ou le surnageant de culture seul ne permettait pas d'induire une cytotoxicité. Pour confirmer l'ancrage d'ExlA à la membrane externe, un test d'accessibilité à la protéinase K a été effectué avec des bactéries IHMA87 WT et IHMA87 *exlB*-mut (Fig. 48.B). Au cours de ce test, toutes les protéines exposées à la surface bactérienne sont digérées par l'enzyme tandis que celles qui sont dans la membrane ou à l'intérieur des bactéries sont protégées. En absence d'ExlB (IHMA87 *exlB*-mut), ExlA est bloquée dans le périplasme et aucune dégradation de la protéine n'a donc été révélée en présence de protéinase K. Par contre, une dégradation d'ExlA proportionnelle à la concentration en protéase a été observée chez la souche WT, de façon similaire à celle de la protéine exposée à la surface CdrA (pour un même temps d'exposition à l'enzyme ; Fig. 48.B). La protéine ExlA est donc effectivement majoritairement ancrée à la membrane et exposée vers l'extérieur de la bactérie. La protéine est tout de même un peu relâchée par IHMA87 dans le milieu extracellulaire en LB, mais il s'agit d'une faible proportion qui nécessite en effet d'être précipitée selon un protocole particulier et concentrée 100 fois pour être visible en western-blot.

Afin de visualiser la variation de quantité d'ExlA à la membrane externe en fonction de la concentration intracellulaire en di-GMPc, j'ai récemment travaillé avec Viviana Job pour mettre au point un protocole de marquage d'ExlA par immunofluorescence grâce aux anticorps monoclonaux récemment obtenus. Pour avoir suffisamment de protéines et pouvoir observer ExlA à la surface des bactéries par microscopie, le fond génétique *ΔerfA* a été utilisé. La figure 49 montre les images que j'ai pu obtenir lors des tests préliminaires d'immunomarquage et sur lesquelles des spots rouges correspondant au marquage ExlA sont visibles uniquement au niveau de la membrane des bactéries sauvages. Maintenant que le protocole est au point, il va pouvoir être utilisé pour tester l'influence de la modulation du di-GMPc sur le marquage d'ExlA à la surface des bactéries.

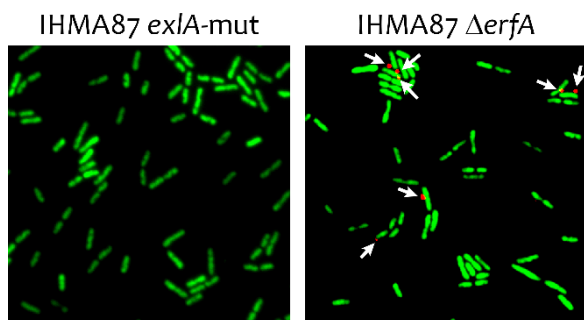


Figure 49 : Visualisation d'ExlA par immunofluorescence au microscope.

Marquage immunofluorescent d'ExlA à la membrane de bactéries IHMA87 *exlA*-mut et IHMA87 Δ *erfA* cultivées en LB jusqu'à $DO_{600}=1$. Des anticorps monoclonaux anti-ExlA et des anticorps secondaires couplés au Cy3 ont été utilisés (rouge). Les bactéries sont marquées (en vert) par le SYTO24-Green. Les flèches blanches pointent les spots correspondant au signal d'ExlA (objectif 100X).

Dans le but de confirmer l'accumulation d'ExlA à la membrane externe en présence d'une forte concentration en di-GMPc, j'ai également extrait les membranes bactériennes des souches « di-GMPc +/- » puis les ai séparées sur un gradient de sucrose. Malheureusement, la protéine ExlA étant vraiment instable, elle a été dégradée au cours de ce long protocole et je n'ai donc pas pu comparer la quantité de cette protéine dans les membranes externes par western-blot.

e. La forme active d'ExlA est ancrée à la membrane bactérienne

Dans le but de confirmer que le maintien d'ExlA à la membrane bactérienne permettait de favoriser son action sur les cellules eucaryotes, j'ai analysé l'effet de la modulation du di-GMPc intracellulaire sur la perméabilisation des membranes de cellules épithéliales par IHMA87, en suivant l'incorporation d'IP au cours de l'infection. Dans nos conditions classiques d'étude (à $MOI=10$), la modulation de la sécrétion d'ExlA par le di-GMPc n'a pas eu d'effet sur la toxicité d'IHMA87 vis-à-vis des cellules épithéliales (Fig. 50, $MOI=10$). Cependant, l'effet du di-GMPc sur la sécrétion d'ExlA pouvait ne pas influencer la toxicité bactérienne à cette multiplicité d'infection. En diminuant la MOI , il est possible d'avoir une meilleure sensibilité pour mettre en évidence des différences de toxicités. J'ai alors testé l'infection à une MOI de 1 et 0,1, ce qui a permis d'observer un retard dans la cinétique d'infection pour la souche synthétisant moins de di-GMPc, « di-GMPc - », et donc sécrétant plus ExlA (Fig. 50). Les courbes de croissance des 3 souches dans le milieu d'infection EBM2 ont été vérifiées et sont similaires (données non montrées). Ainsi, à une faible multiplicité d'infection, si IHMA87 sécrète beaucoup ExlA (« di-GMPc - »), peu d'ExlA est présent à la surface des bactéries (Fig. 47.A.) et la toxicité bactérienne est ralentie. La forme active d'ExlA, nécessaire pour induire une toxicité, n'est donc pas une protéine sécrétée mais ancrée à la membrane.

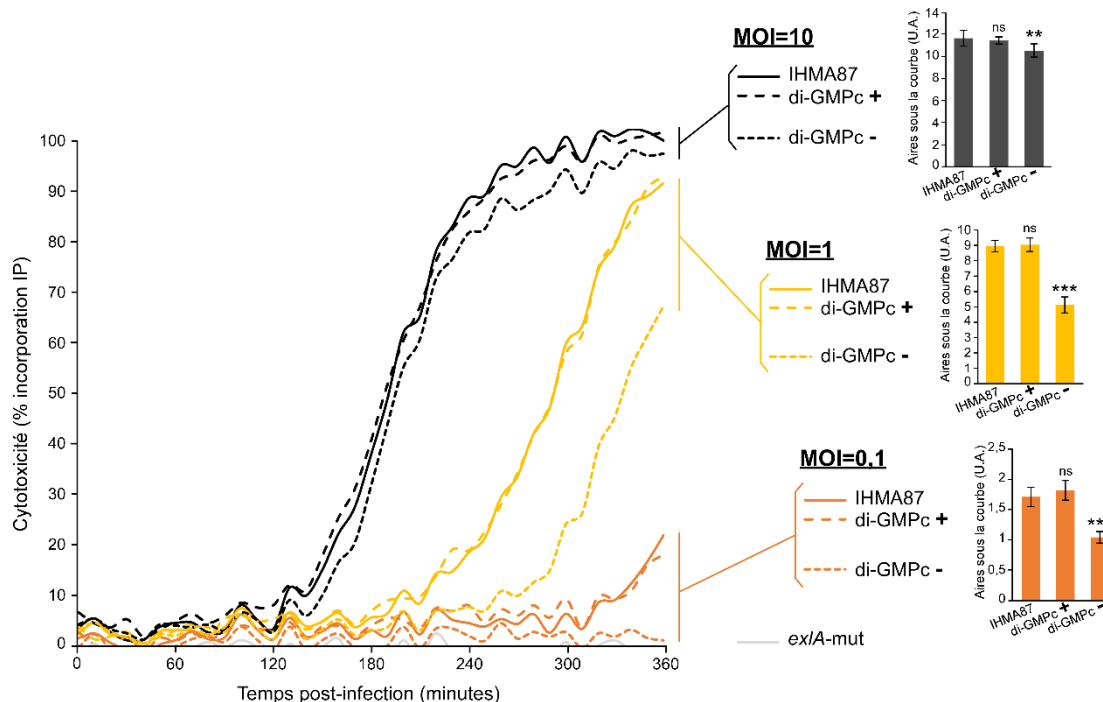


Figure 50 : A faible MOI, la modulation du niveau intracellulaire en di-GMPc impacte la cytotoxicité d'IHMA87.

Cytotoxicité ExlBA-dépendante en fonction du niveau intracellulaire en di-GMPc d'IHMA87. Suivi de l'incorporation d'IP au cours de l'infection de cellules épithéliales A549 à MOI=10/1/0,1 comme indiqué. Les graphes accompagnant la courbe sur le côté droit de la figure représentent les aires sous la courbe (entre 120 min et 300 min (MOI=10), 180 min et 360 min (MOI=1) ou 240 min et 360 min post-infection (MOI=0,1)). L'expérience a été réalisée en triplicats et les barres d'erreur indiquent l'écart-type standard. La valeur-p a été déterminée par un T test et est indiquée au-dessus des barres d'erreurs lorsque la différence avec la souche WT est significative (***: valeur-p \leq 0,001 ; ns : non significative).

f. Discussion et perspectives

Au vu de l'ensemble des résultats, il semble que la forte concentration en di-GMPc d'IHMA87 favorise sa virulence en permettant le maintien d'ExlA à la surface des bactéries, probablement au niveau de son transporteur, afin de faciliter son action sur les membranes eucaryotes (Fig. 51). Ce modèle est en accord avec le fait que le surnageant de culture seul et la protéine purifiée ne permettent pas de perméabiliser les membranes des cellules eucaryotes ou qu'une proximité étroite entre les bactéries et les cellules est nécessaire pour induire la mort de ces dernières. La forme sécrétée d'ExlA pourrait être moins active du fait de la diffusion de la protéine dans le milieu d'infection : la faible concentration locale empêcherait l'interaction avec un récepteur eucaryote.

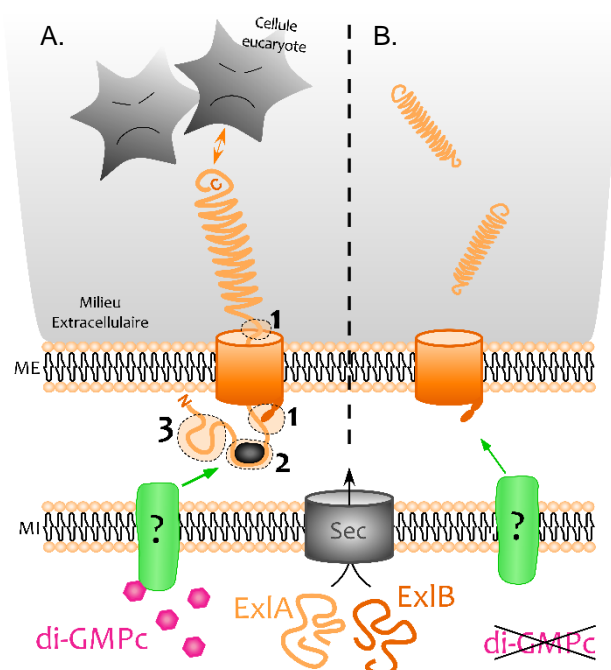


Figure 51 : Modèle possible de régulation de la sécrétion d'ExlA par le di-GMPc.

La sécrétion d'ExlA est représentée selon un mécanisme « linéaire », avec l'extrémité N-terminale maintenue au niveau d'ExlB à cause du di-GMPc, mais pourrait également être « en épingle », avec la régulation du di-GMPc qui concernerait l'extrémité C-terminale de la protéine. A) En présence de di-GMPc, ExlA est majoritairement maintenue à la membrane externe et exposée à la surface bactérienne, ce qui favorise son interaction avec les cellules eucaryotes. Les mécanismes permettant ce maintien et sa régulation restent à identifier ; cependant des hypothèses sont proposées et représentées sur ce schéma : une interaction d'ExlA avec ExlB dans le périplasma ou à la surface de la bactérie (1), une interaction d'ExlA avec un autre partenaire (2) ou encore la formation d'une structure particulière au niveau d'ExlA (3). B) Lorsque la concentration intracellulaire en di-GMPc est faible, l'exolysine est majoritairement sécrétée dans le milieu extracellulaire, ce qui limite la toxicité bactérienne.

Pour le moment, nous ne savons pas par quel mécanisme ExlA est transloquée au travers d'ExlB : selon le modèle « linéaire », où l'extrémité C-terminale de la protéine est dirigée vers le milieu extracellulaire, « en épingle », avec l'extrémité C-terminale bloquée dans le périplasma, ou encore si une interaction avec ExlB est réalisée à la surface bactérienne après translocation de la protéine (Fig. 51.A). Pour approfondir l'étude de l'effet du di-GMPc, il est nécessaire d'identifier le mécanisme d'export d'ExlA et la partie de la protéine impliquée dans son maintien à la membrane. Pour cela, l'analyse de la sécrétion d'ExlA par des mutants synthétisant une protéine ExlA tronquée au niveau de son extrémité N-terminale (sans affecter le peptide signal et le domaine TPS) ou de son extrémité C-terminale est envisagée. Des troncations plus internes de la protéine peuvent également être utilisées.

Différents mécanismes de maintien à la membrane ont été présentés pour les TPS. L'adhésine HMW1 a été décrite pour rester ancrer à la membrane dans le transporteur HMW1B grâce à la formation de ponts dissulfures à son extrémité C-terminale, à la glycosylation de la protéine et à 2 boucles de HWM1B qui doivent être exposées à la surface bactérienne (Grass *et al.*,

2003; Buscher *et al.*, 2006; Grass *et al.*, 2015). L'adhésine CdrA serait également maintenue dans son transporteur CdrB à cause d'un pont dissulfure à son extrémité C-terminale (Cooley *et al.*, 2016). Une interaction entre le domaine TPS de CdiA et le transporteur CdiB à la surface externe de la bactérie a été proposée pour décrire le processus de translocation « en épingle » de CdiA : celle-ci est maintenue ancrée ainsi à la membrane jusqu'à l'interaction avec son récepteur qui induit la translocation du domaine C-terminal « toxine » dans la membrane de la bactérie cible (Ruhe *et al.*, 2018). Enfin, Baud. *et al.* proposent qu'au cours de la translocation de l'adhésine FHA, son domaine TPS interagisse avec un feuillet β extracellulaire de FhaC pour la retenir un temps à la membrane et faciliter son repliement (Baud *et al.*, 2014). ExlA pourrait ainsi être maintenue à la membrane grâce à l'interaction avec un partenaire, comme ExlB ou une chaperonne périplasmique (comme pour les autotransporteurs), ou à une structure particulière (Fig. 51.A). Nous savons que la formation d'un pont dissulfure, correspondant à la structure bloquant CdrA dans CdrB, sur la protéine ExlA est impossible puisqu'elle ne possède qu'une seule cystéine, située au niveau du peptide signal. Dans le but d'investiguer un éventuel maintien par interaction protéique, une co-immunoprécipitation d'ExlA précédée d'un « *cross-link* » pourrait être réalisée. La spectrométrie de masse permettrait ensuite d'identifier le partenaire potentiel. En se basant sur la prédiction de structure d'ExlB, des mutations pourraient également être introduites au niveau des boucles exposées à la surface bactérienne ou au niveau des feuillets internes constituant le canal du transporteur pour analyser une éventuelle inhibition d'interaction entre ExlB et ExlA. Enfin, il serait également possible d'étudier la glycosylation d'ExlA à l'aide d'un kit d'identification de la présence de fractions glucidiques sur les protéines.

Le relargage d'ExlA dans le milieu extracellulaire, modulé par le di-GMPc, pourrait donc résulter de l'inhibition de l'interaction avec un partenaire mais également du clivage de la partie de la protéine qui la retient dans son transporteur, comme cela est décrit pour CdrA. En effet, cette adhésine est maintenue à la surface bactérienne grâce au di-GMPc qui active la neutralisation de la protéase périplasmique LapG par le récepteur membranaire LapD (Introduction/Chapitre 4.1 ; Fig. 27.A). Le système LapD/G a été découvert chez *P. fluorescens* mais des homologues/orthologues de ce système ont été retrouvés chez de nombreuses autres bactéries (Newell *et al.*, 2009, 2011; Navarro *et al.*, 2011). Chez *P. fluorescens*, le substrat de LapG est LapA, une adhésine qui favorise la formation de biofilm lorsqu'elle est maintenue à la surface bactérienne. J'ai étudié la séquence protéique d'ExlA pour comprendre si elle pouvait être un deuxième substrat de LapG, cependant l'exolysine ne contient pas le site de clivage spécifique « TAAG » de la protéase. De plus, la délétion du gène codant pour le récepteur LapD chez IHMA87 n'affecte pas la sécrétion d'ExlA comme l'a constaté Antoine Maillard, chercheur de l'équipe PBRC, avec un mutant $\Delta lapD$ que j'ai construit. Puisque nous n'avons jamais observé de différence de taille entre les protéines ExlA des extraits bactériens et celles des sécrétomes par western-blot,

un clivage de la protéine semble en effet peu probable pour expliquer le relargage d'ExlA en absence de di-GMPc. Le processus de protéolyse périplasmique de CdrA par le système LapD/LapG ne peut donc pas être transposé à ExlA.

Finalement, selon le modèle que je propose, une protéine effectrice liant le di-GMPc serait située au niveau de la membrane interne pour transmettre le signal cytoplasmique du second messenger vers le périplasme. Dans le but d'identifier des candidats, j'ai utilisé les données publiées par Römling *et al.* et mises à jour par Chou et Galperin en 2016, qui listent toutes les protéines possédant un domaine en lien avec le di-GMPc chez PAO1 (EAL, GGDEF, PilZ, HD-GYP), l'ensemble de ces protéines étant conservé chez IHMA87 et PA7 (Römling *et al.*, 2013; Chou and Galperin, 2016). Il est important de noter que des observations préliminaires ont montré que l'effet du di-GMPc sur la sécrétion d'ExlA était également visible chez une souche PAO1 exprimant *exlBA*, les protéines participant à cette régulation ne semblent donc pas spécifiques à IHMA87. J'ai ensuite utilisé l'outil HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer> ; Finn *et al.*, 2011) pour réaliser une prédiction de domaines pour les 51 protéines répertoriées, afin de ne sélectionner que celles qui possédaient des domaines transmembranaires ainsi que des domaines susceptibles de transmettre un signal, comme les domaines PAS (généralement associés à la détection de signal et aux interactions protéine-protéine) ou les domaines HAMP et CHASE (impliqués dans des fonctions de détection ou de transmission de signal). Au final, j'ai sélectionné 7 protéines possédant un domaine d'interaction avec le di-GMPc, prédites pour être transmembranaires et possédant des domaines fonctionnels intéressants pouvant laisser penser à un rôle de récepteur au di-GMPc (Annexe 3). LapD a également été identifié comme un potentiel effecteur ayant un domaine HAMP au cours de cette sélection mais a été éliminé puisque nous avons démontré une absence de lien avec la translocation d'ExlA. La suite du projet consisterait donc à muter ces candidats chez IHMA87 (ou utiliser des mutants de transposition grâce à la banque ordonnée qui est en cours de construction au sein de l'équipe PBRC) et étudier l'impact sur la sécrétion d'ExlA. Si l'un des mutants présente une modification de la sécrétion de l'exolysine, cela indiquera qu'il s'agit bien du récepteur permettant la transmission du signal jusqu'au périplasme.

Il serait également intéressant de comprendre si la forte concentration en di-GMPc d'IHMA87 est due à une forte activité de synthèse ou au contraire à un défaut de dégradation du messenger secondaire. Certaines DGC sont particulièrement décrites pour avoir un lien avec la virulence de *P. aeruginosa* ou la formation de biofilm : MorA joue un rôle dans la sécrétion de l'élastase LasB (Ravichandran *et al.*, 2015), RoeA et SadC sont connues pour avoir un rôle prépondérant dans la synthèse de di-GMPc et la formation de biofilm chez PA14 (Merritt *et al.*, 2010) et enfin WspR fait partie du système chimiosensoriel Wsp et participe à la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* (Introduction/Chapitre 3). Une mutagenèse a été initiée et l'étude d'un

rôle éventuel de ces quatre DGC dans la forte synthèse de di-GMPc chez IHMA87 sera réalisée prochainement. Pour compléter l'analyse et comprendre si ce phénotype résulte de la sur-expression d'une ou plusieurs DGC ou au contraire de la faible synthèse d'une ou plusieurs PDE, les données de transcriptomique d'IHMA87 obtenues par RNAseq vont être comparées à celles de PAO1 (obtenues lors de la même analyse) afin d'étudier les gènes codant pour ces enzymes qui sont exprimés différemment dans les deux souches.

L'analyse du rôle du di-GMPc sur la sécrétion d'ExlA et la toxicité ExlBA-dépendante chez d'autres souches de type PA7 pourrait clarifier le mécanisme de modulation de la sécrétion d'ExlA par le di-GMPc. Cela permettrait notamment de comprendre si une forte concentration intracellulaire en di-GMPc peut être liée au niveau de toxicité des souches. Enfin, ce travail met en évidence l'importance de corrélérer principalement la synthèse d'ExlA à la toxicité des souches de type PA7 alors que les études précédentes ne considéraient que la sécrétion de la toxine ExlA (Reboud *et al.*, 2016).

Chapitre 4

Etude de l'évolution des souches clonales CLJ par une approche multi-omique

Au cours de ma thèse, j'ai également eu l'opportunité de participer à un projet concernant l'étude par une approche multi-omique des souches CLJ1 et CLJ3 qui ont permis la découverte du TPS ExlBA par l'équipe PBRC. Ce travail a mené à l'écriture d'un article, publié en avril 2019 dans le journal « *Microbial Genomics* » : Insertion sequences drive the emergence of a highly adapted human pathogen. Erwin Sentausa, Pauline Basso, **Alice Berry**, Annie Adrait, Gwendoline Bellement, Yohann Couté, Stephen Lory, Sylvie Elsen* et Ina Attrée* (* co-auteurs).

Ce travail avait pour but d'expliquer, grâce à l'utilisation de différents outils omiques (génomique, transcriptomique, protéomique), certaines différences de comportement existant entre les deux souches clonales CLJ1 et CLJ3, notamment en termes de pathogénicité liée à ExlBA. Même si nous n'avons pas réussi à identifier des mécanismes de régulation expliquant cette évolution, nous avons mis en évidence la présence de nombreuses séquences d'insertion (IS) ayant conféré certains traits phénotypiques à ces souches.

Dans ce chapitre, les principaux résultats obtenus au cours de cette étude sont résumés.

a. Présentation de l'article

En 2010, des isolats de *P. aeruginosa* ont été obtenus à partir d'un patient souffrant d'une bronchopneumopathie obstructive chronique au Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble (Elsen *et al.*, 2014). Les aspirations trachéales de ce patient ont permis l'isolement de souches clonales de *P. aeruginosa* de type PA7, nommées CLJ1 et CLJ3, à 12 jours d'intervalle (Fig. 52). Malgré deux antibiothérapies, le patient est décédé 40 jours après son hospitalisation suite au dysfonctionnement de multiples organes.

Alors que CLJ1 était sensible à la plupart des antibiotiques, la souche CLJ3 présentait une résistance envers tous les principaux antimicrobiens utilisés lors des traitements du patient. Des tests de virulence effectués sur des macrophages ont indiqué une forte toxicité de la souche CLJ1. En effet, cette souche dépourvue de SST3 synthétise le système de sécrétion ExlBA, qui a été montré comme responsable de sa virulence. A l'inverse, la souche CLJ3, qui possède les gènes *exlBA* mais pour laquelle les protéines ne sont pas détectées en western-blot, était avirulente.

Une analyse par outils omiques des deux variants CLJ a alors été mise en place pour comprendre l'évolution subie chez le patient par ces souches, dont la clonalité a été démontrée par rep-PCR (Elsen *et al.*, 2014).

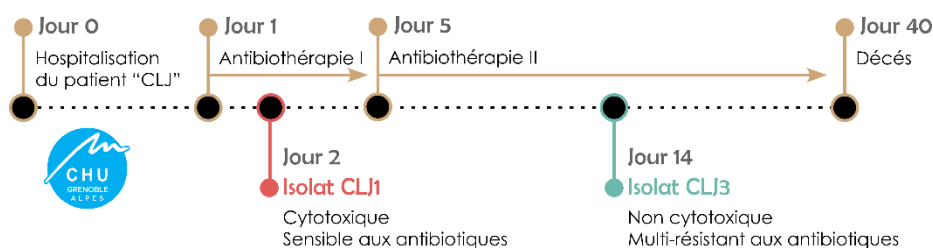


Figure 52 : Chronologie de l'hospitalisation du patient « CLJ » et du prélèvement des souches CLJ1 et CLJ3.

Les génomes des souches CLJ1 et CLJ3 ont été séquencés, assemblés et comparés à celui de PA7. Une identité nucléotidique moyenne (*Best-hits Average Nucleotide Identity*) de 99,97% a été déterminée entre les gènes conservés de CLJ1 et CLJ3, démontrant la proximité phylogénétique des deux souches. Leur génome présente les mêmes caractéristiques principales que celui de PA7, dont l'absence des gènes codant pour la machinerie et les toxines du SST3 et la présence de l'opéron *exlBA*. Le génome des souches CLJ possède 8 régions phagiques, dont 5 sont absentes ou différentes sur le génome de PA7.

L'étude génomique de CLJ1 et CLJ3 a permis d'identifier la présence de nombreuses copies d'un élément génétique mobile appartenant à la famille des séquences d'insertion ISL3 : 6 copies chez CLJ1 et 40 chez CLJ3 (Fig. 53.A). En accord avec le phénotype non motile des souches, une insertion de cet élément ISL3 a été retrouvée dans les locus de biosynthèse du T4_aP (*pilMNOPQ*) et du flagelle (*flgFGHIJKL*) des deux souches (Fig. 53.B et C). L'inactivation du flagelle apporte probablement aux souches un avantage pour ne pas être détectées par le système immunitaire de

l'hôte. L'identification d'une insertion de l'ISL3 dans les gènes codant pour la porine *oprD* et l'amidase *ampD* (responsable de la production de mucopeptides réprimant l'expression de *ampC*) chez la souche CLJ3 permet d'expliquer en partie sa multi-résistance aux antibiotiques (Fig. 53.D et E). Finalement, la recombinaison entre deux ISL3 a mené à la délétion d'un fragment chromosomique d'environ 20 kpb sur le génome de CLJ3 (Fig. 53.F). Cette région incluait notamment le gène *galU* codant pour une UDP glucose pyrophosphorylase impliquée dans la synthèse du lipide A et permettant l'ancrage du LPS à la membrane bactérienne. La troncation du LPS, qui résulte de l'absence de GalU, est considérée comme un mécanisme d'adaptation bactérien vers un mode de vie persistant et contribue au phénotype non-agglutinable de CLJ3 ainsi qu'à sa sensibilité au sérum.

Une analyse comparative entre CLJ1 et CLJ3 a également été menée par transcriptomique (RNAseq) et protéomique (spectrométrie de masse), en culture LB à $DO_{600}=1$, pour expliquer les différences phénotypiques entre ces souches. 77 gènes sont exprimés différemment chez ces deux souches, ce qui impacte également leur protéome. Il a notamment été observé une surexpression chez CLJ3 des gènes codant pour le TPS CdrAB, impliqué dans la formation de biofilm. L'expression de ces gènes étant activée par le di-GMPc, le niveau intracellulaire de CLJ1 et CLJ3 en di-GMPc a été comparé à l'aide du rapporteur *pcdrA-gfp* et une plus forte quantité du messager secondaire chez CLJ3 a été observée (Fig. 53.G). Ces deux résultats semblent indiquer un mode de vie en biofilm pour CLJ3. Les données de transcriptomique et de protéomique ont aussi montré une synthèse plus importante chez CLJ3 par rapport à CLJ1 de MipA et AmpDH3, impliquées dans la synthèse et le recyclage du peptidoglycane, ce qui peut avoir un rôle dans la multi-résistance aux antibiotiques de CLJ3. Enfin, l'analyse protéomique a montré l'absence d'OprD et une plus forte quantité de β -lactamases AmpC dans le protéome de CLJ3, confirmant l'impact négatif de la présence de l'ISL3 dans les gènes *oprD* et *ampD*. L'inactivation d'OprD et la surproduction d'AmpC sont deux mécanismes connus de résistance acquise aux antibiotiques chez *P. aeruginosa* (Introduction/Chapitre 1.2).

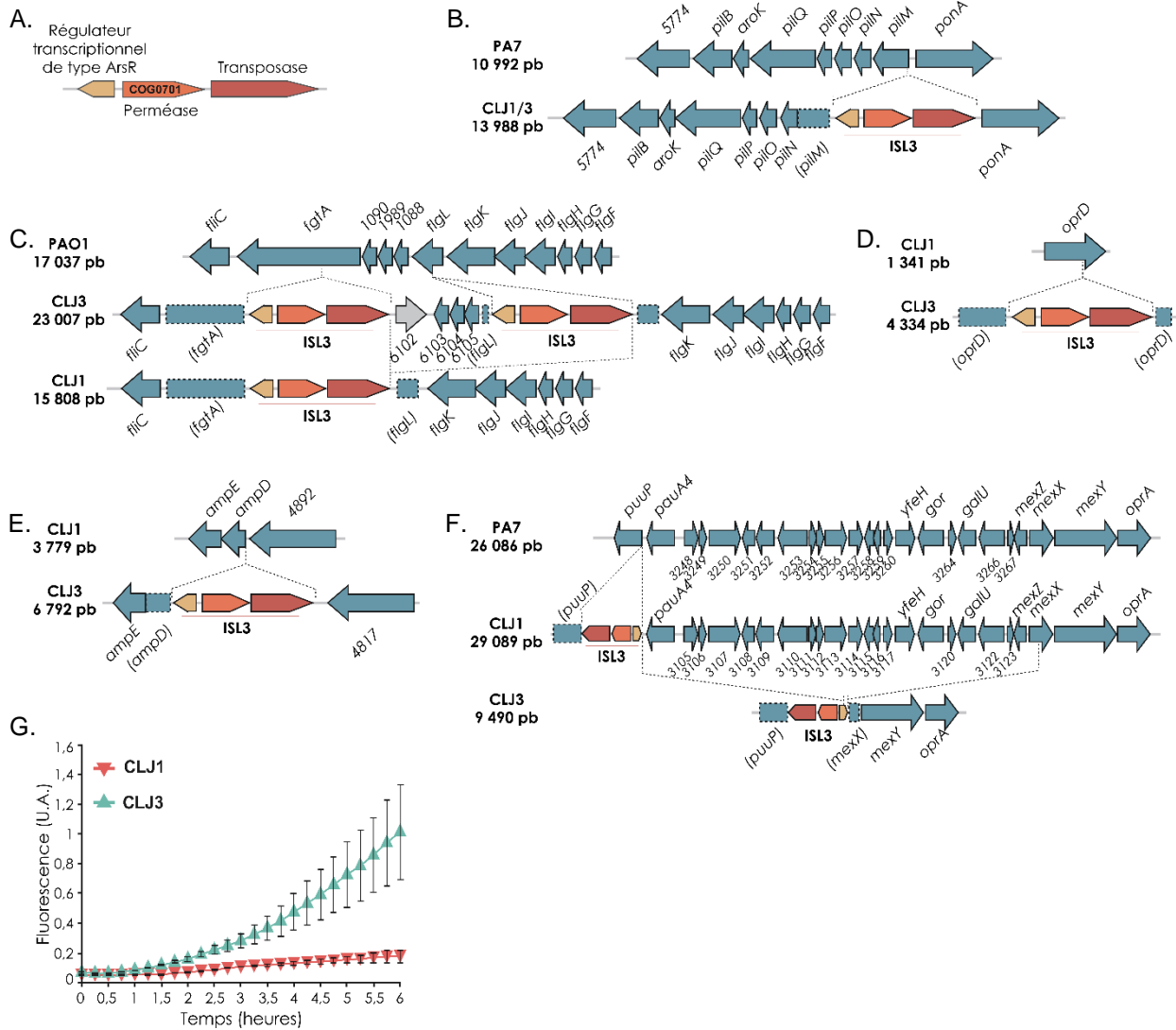


Figure 53 : Evolution chez l'hôte des souches clonales CLJ1 et CLJ3 (Sentausa *et al.*, en révision).

A) Représentation schématique de la séquence d'insertion de type ISL3. B-F) Représentation schématique des modifications génétiques causées chez CLJ1 et CLJ3 par l'insertion de l'ISL3 au niveau de l'opéron *pilMNOPQ* du T₄P (B), du locus de biosynthèse du flagelle (C), des gènes *oprD* (D) et *ampD* (E), et de la région génétique de 20 kpb absente chez CLJ3 comprenant notamment *galU* (F). G) Comparaison du niveau en di-GMPc intracellulaire entre CLJ1 et CLJ3 au cours de la croissance. La fluorescence des souches contenant le vecteur pUCP22-*pcdrA-gfp*(ASV)^c a été mesurée toutes les 15 minutes pendant 6h. Le graphique représente le niveau de fluorescence rapporté à la DO₆₀₀. L'expérience a été réalisée en triplicats et les barres d'erreur indiquent l'écart-type standard.

b. Conclusion

Ainsi, les souches CLJ ont subi une évolution chez l'hôte afin de s'adapter à leur environnement, comme cela a été décrit chez les patients atteints de mucoviscidose. Cette pathoadaptation a principalement impliqué l'acquisition et la duplication d'éléments génétiques mobiles procurant aux bactéries des avantages stratégiques pour survivre chez l'hôte ou le

coloniser. L'identification de recombinaisons génétiques différentes entre CLJ1 et CLJ3 démontre que ces deux souches ont évolué séparément à partir d'un ancêtre commun, CLJ3 ayant développé des résistances aux antibiotiques et des caractéristiques de la vie en biofilm alors que CLJ1 possède un phénotype de pathogénicité aiguë.

Il a été montré dans ce manuscrit que, chez IHMA87, le di-GMPc favorisait la toxicité ExlBA-dépendante en maintenant ExlA à la membrane bactérienne. Néanmoins, CLJ3 est une souche non virulente alors qu'elle présente un niveau plus élevé en di-GMPc que CLJ1. En effet, même si les niveaux en ARNm *exlB* et *exlA* sont similaires chez les deux souches, la protéine ExlA ne semble pas synthétisée par CLJ3. Il est donc possible qu'il existe une modulation post-transcriptionnelle de la synthèse de la protéine, expliquant l'avirulence de CLJ3. Le mécanisme contrôlant cette régulation est inconnu et n'a pas pu être identifié par l'approche multi-omique. Malheureusement, l'impossibilité de manipuler les souches CLJ nous empêche d'étudier cette régulation dans ces souches. Il sera peut être découvert lors de l'analyse d'autres souches de type PA7.

J'ai contribué à ce travail en réalisant l'analyse des niveaux intracellulaires en di-GMPc chez CLJ1 et CLJ3 et en prenant part aux analyses des données multi-omiques, à la préparation des figures ainsi qu'à l'écriture du manuscrit.

DISCUSSION GENERALE

a. Les premières découvertes dans la régulation d'ExlBA

ExlBA est un système de sécrétion de type 5 important pour la virulence des souches de *P. aeruginosa* de type PA7. Comme tous les facteurs de virulence, il est contrôlé par la bactérie grâce à la détection de signaux et à la contribution de facteurs de régulation.

Au cours de ma thèse, les premiers mécanismes de régulation du TPS ExlBA ont été caractérisés chez IHMA87 (Fig. 54). Le promoteur permettant l'expression des gènes *exlBA* a été identifié et j'ai démontré que la transcription de ces gènes était stimulée de façon directe par la voie CyaB-AMPC/Vfr. L'intérêt de cette régulation pour la bactérie pourrait être en lien avec une activation potentielle du TPS au contact de cellules eucaryotes, grâce à un signal mécanique transmis par le système Pil/Chp qui stimulerait l'activité de CyaB. L'augmentation de la transcription d'*exlBA* suite au contact d'une surface solide comme un milieu gélosé et l'observation que certaines souches ne sécrètent ExlA que *in vivo* au cours d'une infection sont des arguments qui corroborent cette hypothèse. La mise en place d'expériences permettant d'analyser la transcription d'*exlBA* après contact avec des cellules eucaryotes est donc très importante.

Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence que la sécrétion de la toxine ExlA était contrôlée par le di-GMPc, dont une forte concentration intracellulaire induit le maintien d'ExlA à la membrane externe. De plus, cette forme ancrée à la membrane serait la forme active de la toxine, qui favoriserait la toxicité bactérienne probablement par une meilleure interaction avec un récepteur. La régulation par le di-GMPc pourra être confirmée grâce à la visualisation par immunofluorescence d'une différence de quantité d'ExlA à la membrane bactérienne en fonction de la concentration intracellulaire en di-GMPc. De plus, l'analyse du mécanisme de translocation d'ExlA au travers de son transporteur et l'identification des partenaires participant au processus de contrôle par le di-GMPc permettront une meilleure compréhension de cette voie de régulation.

J'ai également observé que la synthèse d'ExlBA était activée par le régulateur post-transcriptionnel RsmA. La régulation exercée sur la synthèse d'ExlBA par RsmA est probablement dépendante de Vfr puisque RsmA contrôle positivement la production du FT. Il faut donc maintenant prouver le rôle potentiel de Vfr dans le lien de régulation existant entre RsmA et ExlBA chez IHMA87, ainsi qu'investiguer un rôle putatif du régulateur post-transcriptionnel indépendant de Vfr.

Enfin, différents signaux de régulation environnementaux ont été analysés et il a été montré que la déplétion en fer ou en calcium active l'expression d'*exlBA*. Ces deux signaux étant connus pour favoriser la virulence bactérienne, ceci semble montrer l'importance de ce TPS pour la toxicité des bactéries. De plus, RsmA modulant la synthèse de Vfr, l'activation de l'expression d'*exlBA* par ce FT doit répondre aux différents signaux modulant la voie Gac/Rsm. Par exemple, le calcium active l'HK LadS et stimule la synthèse des petits ARN RsmY et RsmZ par le TCS

GacS/GacA. Une concentration élevée en calcium induit donc la séquestration de RsmA, ce qui a un effet négatif sur la synthèse de Vfr et probablement sur l'expression d'*exlBA*. Cela met en évidence les interconnexions complexes qui existent dans la régulation de la virulence de *P. aeruginosa*.

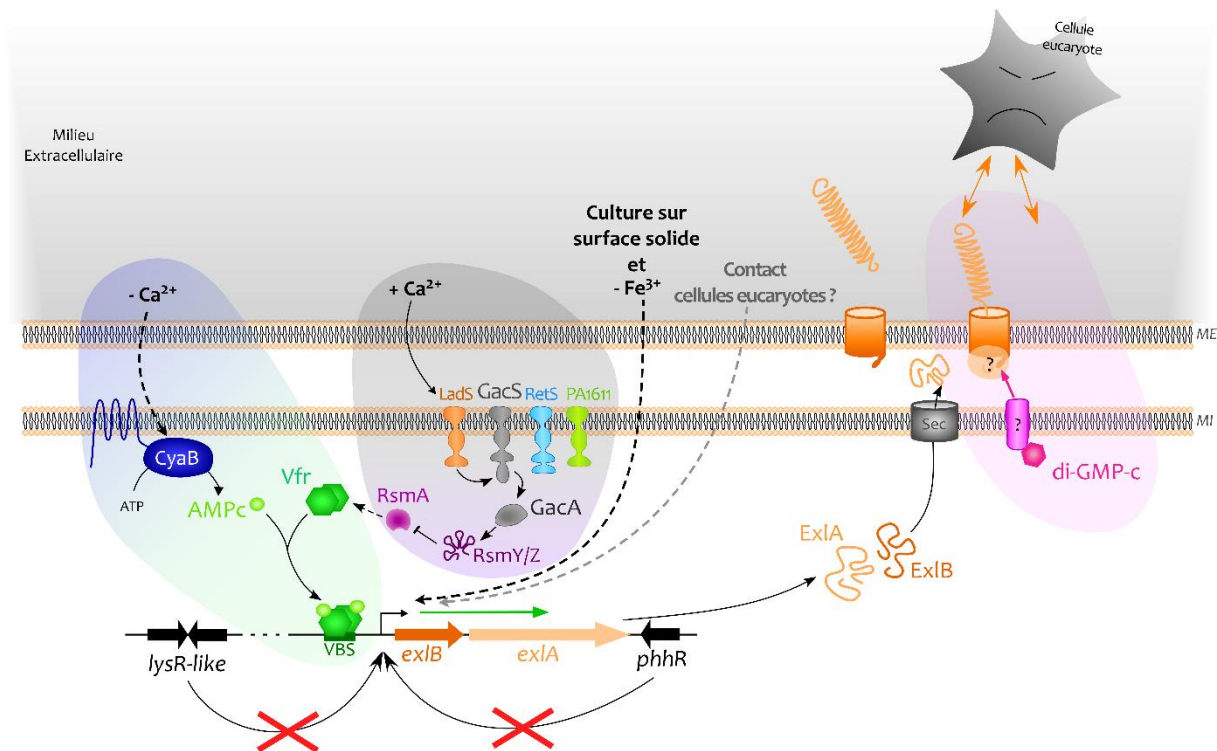


Figure 54 : Représentation des signaux et voies de régulation d'ExlBA identifiés chez IHMA87 au cours de ce travail.

Les flèches en pointillés noirs indiquent une régulation démontrée au cours de ce travail et celle en pointillés gris montre une hypothèse. L'activation de LadS par le calcium induisant une inhibition de RsmA est une régulation connue, mais dont l'effet indirect sur ExlBA n'a pas été investigué durant cette étude. En effet, l'analyse de la transcription d'*exlBA* en présence de calcium (5 mM CaCl_2) a été réalisée en LB, milieu riche probablement déjà saturé en calcium.

Le plus proche homologue d'ExlA identifié est l'hémolysine ShlA de *S. marcescens* et ces deux toxines ont beaucoup de points communs. En effet, comme nous l'avons observé pour ExlA, un surnageant de culture de bactéries sécrétant ShlA ne permet pas d'induire l'infection de cellules eucaryotes (Di Venanzio *et al.*, 2014). De plus, ShlA induit le clivage des cadhérines aux jonctions épithéliales et endothéliales par les mêmes mécanismes qu'ExlA (Reboud *et al.*, 2017b). Enfin, les signaux modulant la synthèse de ces deux toxines sont analogues et peuvent donc impliquer des mécanismes de régulation identiques. En effet, alors que l'expression d'*exlBA* est activée à 25°C (données J. Trouillon) ou par la déplétion du fer, la synthèse du TPS ShlBA est réprimée à 37°C ou en présence du métal (Introduction/Chapitre 4.2). Le système de régulation qui intègre ces deux stimuli chez *S. marcescens* est le TCS RssAB. Un homologue présentant 47% d'identité de séquence a été identifié chez *P. aeruginosa*, PmrBA, et les gènes codant ce système sont présents sur le génome d'IHMA87. Cependant, le site de liaison prédit pour le FT de ce TCS

n'a pas été identifié en amont d'*exlBA* en utilisant RSAT (McPhee *et al.*, 2006). Finalement, la fonction des messagers secondaires AMPc et di-GMPc est très peu étudiée chez *S. marcescens* et aucun rôle dans la régulation du TPS ShlBA n'a été mis en évidence jusqu'alors. Pour le moment, il n'est donc pas possible de conclure sur de potentiels régulateurs communs aux deux TPS ExlBA et ShlBA.

b. Le SST3 et ExlBA, points communs et différences

Le SST3 et ExlBA sont deux systèmes de sécrétion exclusifs de *P. aeruginosa*. Le SST3 représente le système de virulence majeur des souches classiques tandis que les souches marginales, qui ne possèdent pas ce système, sont tout de même virulentes grâce au TPS ExlBA, qui semble être le principal facteur permettant la toxicité bactérienne de ces souches.

Certains points communs entre ces deux systèmes de virulence ont été identifiés, tels que la nécessité d'une étroite proximité entre les bactéries et les cellules eucaryotes, médiée principalement par les T4_aP, pour que leurs toxines puissent agir (Sundin *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2015; Basso *et al.*, 2017a). Le SST3 et ExlBA participent également tous les deux à la dissémination des bactéries dans un modèle murin (Vance *et al.*, 2005; Bouillot *et al.*, 2017). Cependant, alors que la toxine ExlA permet aux bactéries de traverser les jonctions cellulaires épithéliale et endothéliale en induisant le clivage de la E- et VE-cadhérine, les toxines du SST3 n'en sont pas capables (Introduction/Chapitre 2.2.b et Chapitre 2.2.d; Reboud *et al.*, 2017b). Les souches classiques de *P. aeruginosa* ont donc besoin de faire intervenir un facteur supplémentaire pour traverser les barrières endothéliales, qui est l'élastase LasB sécrétée par le SST2, et utilisent les sites de division cellulaire pour transmigrer au travers de la barrière épithéliale (Golovkine *et al.*, 2014, 2016a).

La régulation du SST3 et celle d'ExlBA présentent également des similitudes. En effet, alors que l'expression d'*exlBA* est activée de façon directe par la voie AMPc/Vfr et par la chélation en calcium, la transcription des gènes codant pour les composants du SST3 est elle aussi induite par la voie AMPc/Vfr, qui active la synthèse du FT ExsA, ainsi que par la déplétion du calcium extracellulaire (Résultats/Chapitre 3.1; Frank, 1997; Marsden *et al.*, 2016). De plus, la synthèse des deux systèmes est stimulée par RsmA. Néanmoins, contrairement au SST3, ExlBA n'est pas régulé par le QS et l'effet du di-GMPc sur ces deux systèmes est opposé, puisque le messager secondaire réprime la synthèse du SST3 et active la toxicité ExlBA-dépendante (Résultats/Chapitre 2.2.a; Bleves *et al.*, 2005). De plus, la synthèse du SST3 est stimulée à 37°C alors que celle d'ExlBA l'est à 25°C (Wurtzel *et al.*, 2012).

Le SST3 et ExlBA sont donc deux systèmes exclusifs chez *P. aeruginosa*, qui participent tous deux à la virulence bactérienne mais par des effets différents et qui ne sont pas régulés de la

même manière. Ceci pourrait indiquer que ces deux systèmes de virulence ne sont pas utilisés par les bactéries pour les mêmes raisons.

Des travaux ont été initiés par l'équipe pour étudier l'évolution de *P. aeruginosa* afin de comprendre si ces deux systèmes de sécrétion ont pu coexistés au sein d'un même génome et dans quel ordre ils ont été acquis par les bactéries. Les mécanismes ayant menés à la division de *P. aeruginosa* en deux sous-populations possédant chacune soit le SST3 soit ExlBA sont en effet encore méconnus.

c. AMPc et di-GMPc, deux activateurs d'ExlBA

Les deux principaux messagers secondaires de *P. aeruginosa*, AMPc et di-GMPc, se sont révélés impliqués dans la modulation d'ExlBA.

Chez les souches classiques, ils sont connus pour avoir des rôles antagonistes : le premier favorise un mode de vie en biofilm tandis que le second stimule la virulence aiguë (Introduction/Chapitre 3.2.c ; Fig. 55.A). Cette opposition est renforcée par une balance de synthèse inversée, avec peu d'AMPc produit en présence de fortes concentrations intracellulaires en di-GMPc et *vice et versa* (Almblad *et al.*, 2015, 2019 ; Fig. 55.A et Introduction/Chapitre 3.2.d). IHMA87 est une souche qui possède une concentration intracellulaire élevée en di-GMPc et probablement une quantité limitée d'AMPc. En effet, l'activation de l'expression d'*exlBA* par la voie AMPc/Vfr est faible même en absence du répresseur ErfA (activité β -galactosidase de 420 UM chez $\Delta erfA$ et 90 UM chez $\Delta erfA \Delta vfr$). De plus, l'augmentation transcriptionnelle de *pexlBA* en réponse à la chélation du calcium extracellulaire par l'EGTA, qui active la synthèse d'AMPc par CyaB, est plus importante chez une souche qui contient moins de di-GMPc intracellulaire (données non montrées). Il y aurait donc un antagonisme de synthèse entre les deux messagers secondaires chez IHMA87, comme pour les souches classiques de *P. aeruginosa* (Fig. 55.B). Toutefois, à la différence de leurs effets opposés sur le SST3, ces messagers secondaires activent, de façon surprenante, tous les deux la virulence liée à ExlBA : la toxicité bactérienne est effectivement favorisée par une forte concentration intracellulaire en di-GMPc et par la synthèse d'AMPc par CyaB (Résultats/Chapitre 3.1 et Résultats/Chapitre 3.2 ; Fig. 55.B). Puisque ces deux messagers secondaires n'agissent pas au même niveau, le maintien d'ExlA à la membrane médié par le di-GMPc pourrait permettre de pallier la faible expression induite par le peu d'AMPc présent chez IHMA87. Cette conformation augmenterait, entre autres, la probabilité d'interaction entre ExlA et la cellule. Cela met en évidence la complexité des liens existants entre l'AMPc et le di-GMPc, qui ne sont finalement pas toujours antagonistes et peuvent coopérer.

Finalement, une forte concentration en di-GMPc est nécessaire pour favoriser la toxicité médiée par ExlBA alors qu'un faible niveau en AMPc est suffisant pour activer la pathogénicité des souches. Ceci semble indiquer que la régulation exercée par le di-GMPc est prépondérante et

qu'ExlBA pourrait être lié au mode de vie communautaire de *P. aeruginosa* associé à ce messager secondaire.

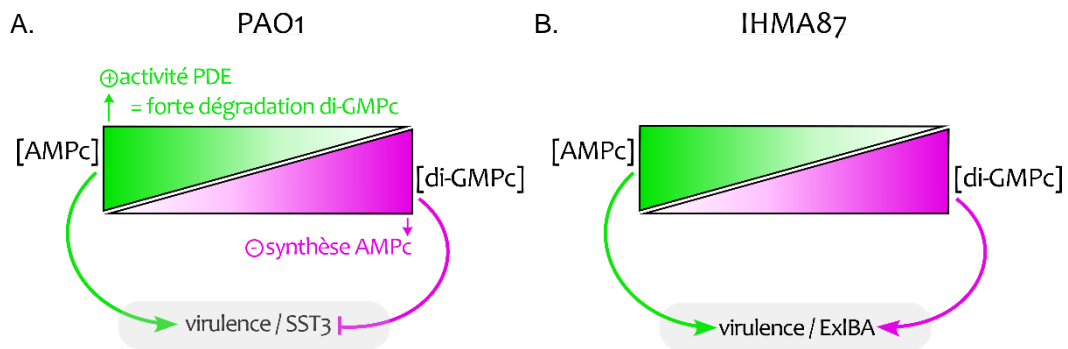


Figure 55 : Antagonisme entre l'AMPc et le di-GMPc chez PAO1 et IHMA87.

A) Chez les souches classiques de *P. aeruginosa*, comme PAO1, la synthèse des deux messagers secondaires et leur effet sur la virulence bactérienne s'opposent. B) De façon différente, alors que leur synthèse semble bien inversée, les deux messagers secondaires ont tout les deux un effet positif sur ExlBA chez IHMA87.

d. ExlBA, un système de virulence environnemental ?

Il est possible qu'ExlBA soit un facteur de virulence important pour la survie dans l'environnement. En effet, de nombreuses souches de type PA7 sont d'origine environnementale et des orthologues d'*exlBA* ont récemment été identifiés chez des espèces de *Pseudomonas* environnementales telles que *fluorescens* et *chlororaphis*, certaines étant utilisées comme agents de biocontrôle en agriculture (Basso *et al.*, 2017b et données non publiées). De plus, l'expression d'*exlBA* est environ 2 fois plus forte à une température environnementale de 25°C qu'à celle des mammifères à sang chaud, 37°C (données J. Trouillon). Un rôle d'ExlBA dans l'environnement pourrait de surcroît être en lien avec la présence du locus *exlBA* sur le génome à proximité d'un gène codant pour une pompe de résistance à l'acide fusarique, toxine du champignon phytopathogène *Fusarium*. La transcription du locus *exlBA* pourrait ainsi être stimulée par le promoteur de ce gène localisé en amont en présence de *Fusarium* afin qu'ExlBA et ce facteur de résistance coopèrent pour favoriser la colonisation et la défense bactérienne. Des souches de *P. aeruginosa* ont d'ailleurs été identifiées comme agents de biocontrôle de *F. oxysporum* (Shafique *et al.*, 2015; Fatima and Anjum, 2017; Islam *et al.*, 2018).

L'expression des gènes *exlBA* a toujours été très faible dans nos conditions d'études (culture *in vitro* en milieu LB et infection de cellules épithéliales) et les signaux activateurs identifiés n'induisent une augmentation de la transcription des gènes que d'un facteur 2. Il est donc possible qu'en plus de la faible conservation des boîtes promotrices, de l'inhibition par le répresseur ErfA et d'une activation par Vfr restreinte par le niveau intracellulaire limité en AMPc, la faible transcription des gènes *exlBA* soit due au fait que les conditions optimales d'expression n'aient pas encore été identifiées. Dorénavant, pour pouvoir approfondir les mécanismes de

régulation d'ExlBA, il faut donc envisager d'analyser la régulation de la virulence des souches de type PA7 chez des hôtes environnementaux (plantes, champignons, amibes, etc.).

De plus, il est important d'élargir l'étude de la régulation d'ExlBA à plusieurs souches de type PA7 afin de vérifier la conservation de cette régulation.

e. Conclusion

La poursuite des différents travaux initiés au cours de ma thèse permettra d'approfondir la régulation d'ExlBA pour mieux comprendre la pathogénicité des souches de type PA7.

Les analyses menées pour définir les effets d'ExlBA sur des hôtes environnementaux pourraient contribuer à déterminer des conditions plus optimales pour l'expression d'*exlBA* et aider à identifier de nouveaux régulateurs et/ou d'autres promoteurs modulant la transcription des gènes. La détermination de la prévalence environnementale des souches de *Pseudomonas* possédant un TPS ExlBA est également importante afin d'identifier l'émergence d'un éventuel risque de contamination humaine, notamment du fait de leur utilisation en agriculture.

De plus, une étude est en cours au laboratoire pour mettre en place un test de détection des souches de *P. aeruginosa* de type PA7 pour déterminer également leur prévalence en milieu hospitalier. En effet, la découverte d'ExlBA dans la souche CLJ1 associée à une pneumonie hémorragique et l'identification d'isolats cliniques synthétisant ce système de virulence montrent que les souches de type PA7 peuvent être pathogènes pour l'Homme. En fonction des résultats de l'étude, le développement d'une stratégie pour contrer la toxicité dépendante d'ExlBA sera alors envisagé et pourra notamment cibler la régulation de ce TPS.

MATERIEL
ET
METHODES

Chapitre 1

Microbiologie et Biologie Moléculaire

1. Souches, plasmides et oligonucléotides

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés au cours des expériences décrites dans ce manuscrit sont présentés dans les **tableaux 3** et **4**. Les oligonucléotides ayant servis pour les constructions plasmidiques, l'amplification par qPCR et le retard sur gel sont listés dans le **tableau 5**.

Tableau 3 : Liste des souches bactériennes utilisées dans cette étude.

Souches	Génotype	Référence
<i>P. aeruginosa</i>		
CLJ1	Isolat clinique (infection respiratoire)	(Elsen <i>et al.</i> , 2014)
CLJ3	Isolat clinique (infection respiratoire)	(Elsen <i>et al.</i> , 2014)
CLJ1::miniCTX- <i>lacZ</i>	CLJ1 contenant le miniCTX- <i>lacZ</i> intégré au site <i>attB</i> (Tc ^R)	Cette étude
CLJ1::miniCTX-prom4- <i>exlB-lacZ</i>	CLJ1 contenant le miniCTX-prom4- <i>exlB-lacZ</i> intégré au site <i>attB</i> (Tc ^R)	Cette étude
IHMA879472 (IHMA87)	Isolat clinique (infection urinaire ; référencée AZPAE15042 sur pseudomonas.com)	(Kos <i>et al.</i> , 2015)
IHMA87 <i>exlA-mut</i>	IHMA87 avec pEXG2 inséré dans le gène <i>exlA</i> (Gm ^R)	(Basso <i>et al.</i> , 2017a)

IHMA87 <i>exlB-mut</i>	IHMA87 avec une cassette de résistance à la Gm insérée dans le gène <i>exlB</i> (le promoteur est dans le même sens de transcription que le gène <i>exlA</i> pour permettre son expression)	Laboratoire
IHMA87 Δ <i>erfA</i>	IHMA87 délétée de <i>erfA</i>	J. Trouillon
IHMA87 Δ <i>lysR-like</i>	IHMA87 délétée de <i>RS13145</i> et <i>RS13150</i>	Cette étude
IHMA87 Δ <i>phhR</i>	IHMA87 délétée de <i>phhR</i>	Cette étude
IHMA87 Δ <i>lasR</i>	IHMA87 délétée de <i>lasR</i>	Cette étude
IHMA87 Δ <i>pqsR</i>	IHMA87 délétée de <i>pqsR</i>	Cette étude
IHMA87 Δ <i>rhIR</i>	IHMA87 délétée de <i>rhIR</i>	Cette étude
IHMA87 Δ <i>rsmA</i>	IHMA87 délétée de <i>rsmA</i>	Cette étude
IHMA87 Δ <i>pilA</i>	IHMA87 délétée de <i>pilA</i>	(Basso <i>et al.</i> , 2017a)
IHMA87 Δ <i>vfr</i>	IHMA87 délétée de <i>vfr</i>	Cette étude (Berry <i>et al.</i> , 2018)
IHMA87 Δ <i>vfr::vfr</i>	IHMA87 Δ <i>vfr</i> complétée avec le miniCTX-comp- <i>vfr</i> intégré au site <i>attB</i> (Tc ^R)	Cette étude (Berry <i>et al.</i> , 2018)
IHMA87 VBM	IHMA87 possédant une mutation dans le site de fixation de Vfr situé au niveau du promoteur <i>pexlBA</i>	Cette étude (Berry <i>et al.</i> , 2018)
IHMA87 Δ <i>cyaA</i>	IHMA87 délétée de <i>cyaA</i>	Cette étude (Berry <i>et al.</i> , 2018)
IHMA87 Δ <i>cyaA::cyaA</i>	IHMA87 Δ <i>cyaA</i> complétée avec le miniCTX- <i>cyaA</i> intégré au site <i>attB</i> (Tc ^R)	Cette étude (Berry <i>et al.</i> , 2018)
IHMA87 Δ <i>cyaB</i>	IHMA87 délétée de <i>cyaB</i>	Cette étude (Berry <i>et al.</i> , 2018)
IHMA87 Δ <i>cyaB::cyaB</i>	IHMA87 Δ <i>cyaB</i> complétée avec le miniCTX- <i>cyaB</i> intégré au site <i>attB</i> (Tc ^R)	Cette étude (Berry <i>et al.</i> , 2018)
IHMA87 Δ <i>cyaA</i> Δ <i>cyaB</i>	IHMA87 délétée de <i>cyaA</i> et <i>cyaB</i>	Cette étude (Berry <i>et al.</i> , 2018)
IHMA87 Δ <i>fliC</i>	IHMA87 délétée de <i>fliC</i>	Cette étude
IHMA87 <i>RS13155::</i> Ω	IHMA87 avec l'interposon omega inséré dans <i>RS13155</i> (Sm ^R , Spc ^R)	Cette étude
IHMA87 <i>RS13160::</i> Ω	IHMA87 avec l'interposon omega inséré dans <i>RS13160</i> (Sm ^R , Spc ^R)	Cette étude
IHMA87::miniCTX- <i>lacZ</i>	IHMA87 contenant le plasmide miniCTX- <i>lacZ</i> intégré au site <i>attB</i> (Tc ^R)	Cette étude
IHMA87::miniCTX- <i>gfp</i>	IHMA87 contenant le plasmide miniCTX- <i>gfp</i> intégré au site <i>attB</i> (Tc ^R)	Cette étude
IHMA87::miniCTX-pX2- <i>gfp</i>	IHMA87 contenant le plasmide miniCTX-pX2- <i>gfp</i> intégré au site <i>attB</i> (Tc ^R)	Laboratoire
IHMA87::miniCTX-prom4- <i>exlB-lacZ</i>	IHMA87 contenant le plasmide miniCTX-prom4- <i>exlB-lacZ</i> intégré au site <i>attB</i> (Tc ^R)	Cette étude
IHMA87::miniCTX-prom2- <i>exlBA-gfp</i>	IHMA87 contenant le plasmide miniCTX-prom2- <i>exlBA-gfp</i> intégré au site <i>attB</i> (Tc ^R)	Cette étude

IHMA87::pSW196	IHMA87 contenant le plasmide pSW196 intégré au site <i>attB</i> (Tc ^R)	Cette étude
IHMA87::pSW196- <i>wspR</i> *	IHMA87 contenant le plasmide pSW196- <i>wspR</i> * intégré au site <i>attB</i> (Tc ^R)	Cette étude
IHMA87::pSW196-PA2133	IHMA87 contenant le plasmide pSW196-PA2133 intégré au site <i>attB</i> (Tc ^R)	Cette étude
IHMA87 <i>exlB-mut</i> ::pSW196	IHMA87 <i>exlB-mut</i> contenant le plasmide pSW196 intégré au site <i>attB</i> (Tc ^R)	Cette étude
IHMA87 <i>exlB-mut</i> ::pSW196- <i>wspR</i> *	IHMA87 <i>exlB-mut</i> contenant le plasmide pSW196- <i>wspR</i> * intégré au site <i>attB</i> (Tc ^R)	Cette étude
IHMA87 <i>exlB-mut</i> ::pSW196-PA2133	IHMA87 <i>exlB-mut</i> contenant le plasmide pSW196-PA2133 intégré au site <i>attB</i> (Tc ^R)	Cette étude
IHMA87 <i>exlA</i> :: <i>lacZ</i>	IHMA87 contenant <i>lacZ</i> inséré dans le gène <i>exlA</i> (fusion <i>exlA-lacZ</i>)	J. Trouillon (Berry <i>et al.</i> , 2018)
IHMA87 <i>RS13155</i> :: Ω <i>exlA</i> :: <i>lacZ</i>	IHMA87:: <i>RS13155</i> Ω contenant <i>lacZ</i> inséré dans le gène <i>exlA</i> (Sm ^R , Spc ^R)	Cette étude
IHMA87 <i>RS13160</i> :: Ω <i>exlA</i> :: <i>lacZ</i>	IHMA87:: <i>RS13160</i> Ω contenant <i>lacZ</i> inséré dans le gène <i>exlA</i> (Sm ^R , Spc ^R)	Cette étude
IHMA87:: <i>exlA-lacZ</i> « -35 » mut	IHMA87:: <i>exlA-lacZ</i> mutée au niveau de la boîte promotrice « -35 » putative de <i>pexlBA</i>	Cette étude
IHMA87:: <i>exlA-lacZ</i> « -10 » mut	IHMA87:: <i>exlA-lacZ</i> mutée au niveau de la boîte promotrice « -10 » putative de <i>pexlBA</i>	Cette étude
IHMA87:: <i>exlA-lacZ</i> « -35 » mut bis	IHMA87:: <i>exlA-lacZ</i> mutée au niveau de la boîte promotrice « -35 » de <i>pexlBA</i>	Cette étude
IHMA87:: <i>exlA-lacZ</i> « -10 » mut bis	IHMA87:: <i>exlA-lacZ</i> mutée au niveau de la boîte promotrice « -10 » de <i>pexlBA</i>	Cette étude
IHMA87 Δ <i>pqsR</i> <i>exlA</i> :: <i>lacZ</i>	IHMA87 Δ <i>pqsR</i> contenant <i>lacZ</i> inséré dans le gène <i>exlA</i>	Cette étude
IHMA87 Δ <i>rhlR</i> <i>exlA</i> :: <i>lacZ</i>	IHMA87 Δ <i>rhlR</i> contenant <i>lacZ</i> inséré dans le gène <i>exlA</i>	Cette étude
IHMA87 Δ <i>vfr</i> <i>exlA</i> :: <i>lacZ</i>	IHMA87 Δ <i>vfr</i> contenant <i>lacZ</i> inséré dans le gène <i>exlA</i>	Cette étude (Berry <i>et al.</i> , 2018)
IHMA87 Δ <i>vfr</i> :: <i>vfr</i> <i>exlA</i> :: <i>lacZ</i>	IHMA87 Δ <i>vfr</i> :: <i>vfr</i> contenant <i>lacZ</i> inséré dans le gène <i>exlA</i> (Tc ^R)	Cette étude (Berry <i>et al.</i> , 2018)
IHMA87 VBM <i>exlA</i> :: <i>lacZ</i>	IHMA87 VBM contenant <i>lacZ</i> inséré dans le gène <i>exlA</i>	Cette étude (Berry <i>et al.</i> , 2018)
IHMA87 Δ <i>cyaA</i> <i>exlA</i> :: <i>lacZ</i>	IHMA87 Δ <i>cyaA</i> contenant <i>lacZ</i> inséré dans le gène <i>exlA</i>	Cette étude (Berry <i>et al.</i> , 2018)
IHMA87 Δ <i>cyaA</i> :: <i>cyaA</i> <i>exlA</i> :: <i>lacZ</i>	IHMA87 Δ <i>cyaA</i> :: <i>cyaA</i> contenant <i>lacZ</i> inséré dans le gène <i>exlA</i> (Tc ^R)	Cette étude (Berry <i>et al.</i> , 2018)
IHMA87 Δ <i>cyaB</i> <i>exlA</i> :: <i>lacZ</i>	IHMA87 Δ <i>cyaB</i> contenant <i>lacZ</i> inséré dans le gène <i>exlA</i>	Cette étude (Berry <i>et al.</i> , 2018)
IHMA87 Δ <i>cyaB</i> :: <i>cyaB</i> <i>exlA</i> :: <i>lacZ</i>	IHMA87 Δ <i>cyaB</i> :: <i>cyaB</i> contenant <i>lacZ</i> inséré dans le gène <i>exlA</i> (Tc ^R)	Cette étude (Berry <i>et al.</i> , 2018)

IHMA87 Δ <i>cyaA</i> Δ <i>cyaB</i> <i>exlA::lacZ</i>	IHMA87 Δ <i>cyaA</i> Δ <i>cyaB</i> contenant <i>lacZ</i> inséré dans le gène <i>exlA</i>	Cette étude (Berry <i>et al.</i> , 2018)
IHMA87::pSW196 <i>exlA::lacZ</i>	IHMA87::pSW196 contenant <i>lacZ</i> inséré dans le gène <i>exlA</i> (Tc ^R)	Cette étude
IHMA87::pSW196- <i>wspR</i> * <i>exlA::lacZ</i>	IHMA87::pSW196- <i>wspR</i> * contenant <i>lacZ</i> inséré dans le gène <i>exlA</i> (Tc ^R)	Cette étude
IHMA87::pSW196-PA2133 <i>exlA::lacZ</i>	IHMA87::pSW196-PA2133 contenant <i>lacZ</i> inséré dans le gène <i>exlA</i> (Tc ^R)	Cette étude
IHMA87 Δ <i>rsmA</i> <i>exlA::lacZ</i>	IHMA87 Δ <i>rsmA</i> contenant <i>lacZ</i> inséré dans le gène <i>exlA</i>	Cette étude
IHMA87::pTn7- <i>pcdrA</i> - <i>gfp</i> (ASV) ^c	IHMA87 contenant le vecteur pTn7- <i>pcdrA</i> - <i>gfp</i> (ASV) ^c intégré au site <i>attTn7</i> (Gm ^R)	Cette étude
PA7	Souche sauvage (infection non respiratoire)	(Roy <i>et al.</i> , 2010)
PA7::miniCTX	PA7 contenant le plasmide miniCTX1 intégré au site <i>attB</i> (Tc ^R)	Cette étude (Berry <i>et al.</i> , 2018)
PA7::miniCTX- <i>vfr</i>	PA7 contenant le plasmide miniCTX-comp- <i>vfr</i> intégré au site <i>attB</i> (Tc ^R)	Cette étude (Berry <i>et al.</i> , 2018)
PAO1	Souche sauvage	(Stover <i>et al.</i> , 2000)
PAO1 Δ <i>retS</i>	PAO1 délétée de <i>retS</i>	(Mougous <i>et al.</i> , 2006)
PAO1::pTn7- <i>pcdrA</i> - <i>gfp</i> (ASV) ^c	PAO1 contenant le vecteur pTn7- <i>pcdrA</i> - <i>gfp</i> (ASV) ^c intégré au site <i>attTn7</i> (Gm ^R)	Cette étude
<i>E. coli</i>		
Top10	Bactéries compétentes	Invitrogen
BL21 Star(DE3)	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>gal dcm rne131</i> (DE3)	Invitrogen

Tableau 4 : Liste des plasmides construits et utilisés dans cette étude.

Plasmides	Propriétés et Construction	Référence
pCR-Blunt II-TOPO	Vecteur de clonage commercial (Kn ^R)	Invitrogen
pRK2013	Plasmide "helper" portant les propriétés conjugatives (Kn ^R)	(Figurski and Helinski, 1979)
pRK600	Plasmide "helper" portant les propriétés conjugatives (Cm ^R)	(Kessler <i>et al.</i> , 1992)
pUX-BF13	Plasmide "helper" codant pour la transposase Tn7 (Amp ^R)	(Bao <i>et al.</i> , 1991)
pEXG2	Vecteur suicide pour échange allélique (<i>sacB</i> , Gm ^R)	(Rietsch <i>et al.</i> , 2005)
miniCTX1	Plasmide intégratif (site spécifique <i>attB</i> , Tc ^R)	(Hoang <i>et al.</i> , 2000)
miniCTX- <i>lacZ</i>	Plasmide intégratif pour fusion transcriptionnelle <i>lacZ</i> (site spécifique <i>attB</i> , Tc ^R)	(Becher and Schweizer, 2000)
miniCTX- <i>gfp</i>	Plasmide intégratif pour fusion transcriptionnelle <i>gfp</i> (site spécifique <i>attB</i> , Tc ^R)	(Hoang <i>et al.</i> , 2000)
miniCTX-pX2- <i>gfp</i>	Plasmide intégratif contenant une fusion du promoteur constitutive pX2 avec le gène <i>gfp</i> (site spécifique <i>attB</i> , Tc ^R)	Laboratoire

pSW196	Plasmide intégratif avec un promoteur <i>pbad</i> inductible à l'arabinose (site spécifique <i>attB</i> , Tc ^R)	(Baynham <i>et al.</i> , 2006)
miniCTX-prom4_exlB-lacZ	Plasmide miniCTX contenant la fusion transcriptionnelle <i>prom4_exlB-lacZ</i> . Fragment PCR de 3748 pb (<i>prom-4639-F/prom-4641-R</i> ; voir Fig. 1.B) cloné dans pCR-Blunt II-TOPO et sous-cloné dans miniCTX- <i>lacZ</i> <i>XhoI/XmaI</i> (Tc ^R)	Cette étude
miniCTX-prom2_exlBA-gfp	Plasmide miniCTX contenant la fusion transcriptionnelle <i>prom2_exlBA-gfp</i> . Fragment PCR de 2831 pb (IHMA-BA- <i>prom-F/R</i> ; voir Fig. 1.B) cloné dans pCR-Blunt II-TOPO (<i>pTOPO-prom2_exlBA-lacZ</i>) et sous-cloné dans miniCTX- <i>gfp</i> <i>XhoI/HindIII</i> (Tc ^R)	Cette étude
pEXG2-exlBA-lacZ	Plasmide contenant la fusion <i>exlA-lacZ</i> permettant l'intégration de <i>lacZ</i> après le 3 ^e codon du gène <i>exlA</i> (Gm ^R)	J. Trouillon (Berry <i>et al.</i> , 2018)
pEXG2-RS13155Ω	pEXG2 contenant l'interposon Ω dans le gène <i>RS13155</i> . Fragment PCR de 835 pb (<i>omega-RS13155-F/R</i>) cloné dans pCR-Blunt II-TOPO, insertion d'un interposon Ω au site <i>NruI</i> et sous-clonage dans pEXG2 <i>XmaI</i> (Gm ^R , Sm ^R , Spc ^R)	Cette étude
pEXG2-RS13160Ω	pEXG2 contenant l'interposon Ω dans le gène <i>RS13160</i> . Fragment PCR de 780 pb (<i>omega-RS13160-F/R</i>) cloné dans pCR-Blunt II-TOPO, insertion d'un interposon Ω au site <i>StuI</i> et sous-clonage dans pEXG2 <i>XmaI</i> (Gm ^R , Sm ^R , Spc ^R)	Cette étude
pEXG2-mut-35	pEXG2 contenant un fragment pour la mutation de la boîte promotrice -35 de <i>pexlBA</i> . Fragments PCR de 510 et 590 pb (<i>Mut-pexlBA-sF1/Mut-pexlBA1-35-sR1</i> et <i>Mut-pexlBA1-35-sF2/Mut-pexlBA-sR2</i>) clonés dans pEXG2 <i>SmaI</i> par SLIC (Gm ^R)	Cette étude
pEXG2-mut-10	pEXG2 contenant un fragment pour la mutation de la boîte promotrice -10 de <i>pexlBA</i> . Fragments PCR de 537 et 561 pb (<i>Mut-pexlBA-sF1/Mut-pexlBA1-10-sR1</i> et <i>Mut-pexlBA1-10-sF2/Mut-pexlBA-sR2</i>) clonés dans pEXG2 <i>SmaI</i> par SLIC (Gm ^R)	Cette étude
pEXG2-mut-35_bis	pEXG2 contenant un fragment pour la mutation de la boîte promotrice -35 de <i>pexlBA</i> . Fragments PCR de 515 et 583 pb (<i>Mut-pexlBA-sF1/Mut-pexlBA1-new35-sR1</i> et <i>Mut-pexlBA1-new35-sF2/Mut-pexlBA-sR2</i>) clonés dans pEXG2 <i>SmaI</i> par SLIC (Gm ^R)	Cette étude
pEXG2-mut-10_bis	pEXG2 contenant un fragment pour la mutation de la boîte promotrice -10 de <i>pexlBA</i> . Fragments PCR de 539 et 565 pb (<i>Mut-pexlBA-sF1/Mut-pexlBA1-new10-sR1</i> et <i>Mut-pexlBA1-new10-sF2/Mut-pexlBA-sR2</i>) clonés dans pEXG2 <i>SmaI</i> par SLIC (Gm ^R)	Cette étude
pEXG2-mut-lysR	pEXG2 contenant le fragment pour la délétion de <i>phhR</i> . Fragment SOE-PCR de 804 pb (<i>SOE-lysR-F1/R1</i> et <i>SOE-lysR-F2/R2</i>) cloné dans pCR-Blunt II-TOPO et sous-cloné dans pEXG2 <i>HindIII/XhoI</i> (Gm ^R)	Cette étude
pEXG2-mut-phhR	pEXG2 contenant le fragment pour la délétion de <i>phhR</i> . Fragment SOE-PCR de 780 pb (<i>SOE-phhR-F1/R1</i> et <i>SOE-phhR-F2/R2</i>) cloné dans pCR-Blunt II-TOPO et sous-cloné dans pEXG2 <i>HindIII/XhoI</i> (Gm ^R)	Cette étude
pEXG2-mut-lasR	pEXG2 contenant le fragment pour la délétion de <i>lasR</i> . Fragment SOE-PCR de 789 pb (<i>IHMA-mut-lasR-F1/R1</i> et <i>IHMA-mut-lasR-F2/R2</i>) cloné dans pCR-Blunt II-TOPO et sous-cloné dans pEXG2 <i>EcoRI/HindIII</i> (Gm ^R)	Cette étude

pEXG2-mut-pqsR	pEXG2 contenant le fragment pour la délétion de <i>pqsR</i> . Fragment SOE-PCR de 735 pb (IHMA-mut-pqsR-F1/R1 et IHMA-mut-pqsR-F2/R2) cloné dans pCR-Blunt II-TOPO et sous-cloné dans pEXG2 <i>EcoRI/HindIII</i> (Gm ^R)	Cette étude
pEXG2-mut-rhlR	pEXG2 contenant le fragment pour la délétion de <i>rhlR</i> . Fragment SOE-PCR de 871 pb (IHMA-mut-rhlR-F1/R1 et IHMA-mut-rhlR-F2-2/R2-2) cloné dans pCR-Blunt II-TOPO et sous-cloné dans pEXG2 <i>BamHI/HindIII</i> (Gm ^R)	Cette étude
pEXG2-mut-rsmA	pEXG2 contenant le fragment pour la délétion de <i>rsmA</i> . Fragment SOE-PCR de 846 pb (IHMA-mut-rsmA-F1/R1 et IHMA-mut-rsmA-F2/R2) cloné dans pCR-Blunt II-TOPO et sous-cloné dans pEXG2 <i>XmaI</i> (Gm ^R)	Cette étude
pEXG2-mut-vfr	pEXG2 contenant le fragment pour la délétion de <i>vfr</i> . Fragment SOE-PCR de 873 pb (IHMA-mut-vfr-F1/R1 et IHMA-mut-vfr-F2/R2) cloné dans pCR-Blunt II-TOPO et sous-cloné dans pEXG2 <i>PstI/BamHI</i> (Gm ^R)	Cette étude
pEXG2-VBM	pEXG2 contenant le fragment pour la mutation du site de liaison de Vfr sur <i>pexlBA</i> . Fragment SOE-PCR de 751 pb (<i>vfr</i> -binding-F1/R1 et <i>vfr</i> -binding-F2/R2) cloné dans pCR-Blunt II-TOPO et sous-cloné dans pEXG2 <i>BamHI/XhoI</i> (Gm ^R)	Cette étude
pEXG2-mut-cyaA	pEXG2 contenant le fragment pour la délétion de <i>cyaA</i> . Fragment SOE-PCR de 884 pb (IHMA-mut-cyaA-F1/R1 et IHMA-mut-cyaA-F2/R2) cloné dans pCR-Blunt II-TOPO et sous-cloné dans pEXG2 <i>XbaI/XhoI</i> (Gm ^R)	Cette étude
pEXG2-mut-cyaB	pEXG2 contenant le fragment pour la délétion de <i>cyaB</i> . Fragment SOE-PCR de 850 pb (IHMA-mut-cyaB-F1/R1 et IHMA-mut-cyaB-F2/R2) cloné dans pCR-Blunt II-TOPO et sous-cloné dans pEXG2 <i>XbaI/XhoI</i> (Gm ^R)	Cette étude
pEXG2-mut-fliC	pEXG2 contenant le fragment pour la délétion de <i>fliC</i> . Fragment SOE-PCR de 822 pb (IHMA-mut-fliC-F1/R1 et IHMA-mut-fliC-F2/R2) cloné dans pCR-Blunt II-TOPO et sous-cloné dans pEXG2 <i>EcoRI/XbaI</i> (Gm ^R)	Cette étude
miniCTX-comp-vfr	miniCTX contenant le gène <i>vfr</i> . Fragment PCR de 1220 pb (IHMA-comp-vfr-F/R) cloné dans pCR-Blunt II-TOPO et sous-cloné dans pEXG2 <i>BamHI/HindIII</i> (Tc ^R)	Cette étude
miniCTX-cyaA	miniCTX contenant le gène <i>cyaA</i> . Fragment PCR de 3385 pb (IHMA-comp-cyaA-sF/sR) cloné dans miniCTX1 <i>SmaI</i> par SLIC (Tc ^R)	Cette étude
miniCTX-cyaB	miniCTX contenant le gène <i>cyaB</i> . Fragment PCR de 1995 pb (IHMA-comp-cyaB-sF/sR) cloné dans miniCTX1 <i>SmaI</i> par SLIC (Tc ^R)	Cette étude
pBBR1MCS4-R246A-wspR*	Vecteur répliquatif pBBR1MCS4 contenant le gène <i>wspR</i> * avec la mutation R246A (Amp ^R)	(Moscoso <i>et al.</i> , 2011)
pBBR1MCS4-PA2133	Vecteur répliquatif pBBR1MCS4 contenant le gène <i>PA2133</i> (Amp ^R)	(Moscoso <i>et al.</i> , 2011)
pSW196-wspR*	pSW196 contenant le fragment de 1380 pb <i>XbaI/SacI</i> du pBBR1MCS4-R246A-wspR* (Tc ^R)	Cette étude
pSW196-PA2133	pSW196 contenant le fragment de 1140 pb <i>XbaI/SacI</i> du pBBR1MCS4-PA2133 (Tc ^R)	Cette étude
pET15BVP	Vecteur d'expression inductible pour la production de protéines avec un tag His ₆ N-terminal chez <i>P. aeruginosa</i> (Amp ^R)	(Arora <i>et al.</i> , 1997)

pET15BVP-purif-Vfr	Vecteur d'expression pET15BVP pour la sur-production de Vfr. Fragment de 658 pb (purif-vfr-NdeI-R/purif-vfr-BamHI-F) cloné dans le pCR-Blunt II-TOPO et sous-cloné dans le pET15BVP <i>NdeI</i> / <i>BamHI</i> (Amp ^R)	Cette étude (Berry <i>et al.</i> , 2018)
pTn7- <i>pcdrA</i> - <i>gfp</i> (ASV) ^c	Vecteur pBK-miniTn7 permettant de délivrer le transposon Tn7 contenant la fusion <i>pcdrA-gfp</i> (ASV), codant pour une protéine GFP instable (site spécifique <i>att</i> Tn7, Amp ^R , Gm ^R)	(Rybtke <i>et al.</i> , 2012)
pUCP22- <i>pcdrA</i> - <i>gfp</i> (ASV) ^c	Vecteur répliatif pUCP22 contenant la fusion <i>pcdrA-gfp</i> (ASV), codant pour une protéine GFP instable (Amp ^R , Gm ^R)	(Rybtke <i>et al.</i> , 2012)

Tableau 5 : Liste des oligonucléotides utilisés dans cette étude.

Oligonucléotides	Séquence (5' -> 3')	Utilisation
Prom 4639-F	GGCTCGAGGGTAGGTCTCGCAATATTGCG	Fusion
Prom-4641-R	CCCGGGGCGGGCGGAGCGATGATTCG	<i>prom4_exlB</i>
IHMA- <i>exlBA</i> -Prom F	CCCTCGAGCTATATGTGCGCAGCATCACCGAA	Fusion
IHMA- <i>exlBA</i> -Prom R	CCAAGCTTTCTAGACTGTTGAGCAGTTGCGGCGT	<i>prom2_exlBA</i>
Omega-4639-F	GGCCCGGGATCCTCTGCACCGGCAC	Insertion d' Ω dans <i>RS13155</i> (<i>PSPA7_4639</i>)
Omega-4639-R	GGCCCGGGATTTCGGCGAGGTCTGA	
Omega-4640-F	GGCCCGGGTACAAGTTCTTGTCTTGACCG	Insertion d' Ω dans <i>RS13160</i> (<i>PSPA7_4640</i>)
Omega-4640-R	GGCCCGGGACCTCACCCGTTTGTACATC	
Mut- <i>pexlBA</i> -sF1	GGTCGACTCTAGAGGATCCCCTGGTGATGGCGGCTGGCACC	
Mut- <i>pexlBA</i> -sR2	ACCGAATTCGAGCTCGAGCCCCGACGTAGCCGGCATCGACAT	
Mut- <i>pexlBA1</i> -10-sR1	GCATGCCGCGAGACCTCACCCGTTTGTTA	
Mut- <i>pexlBA1</i> -10-sF2	CGGGTGAGGTCTGCGGCATGCCTACGCAAGACACAAAGTTTACATA	
Mut- <i>pexlBA1</i> -35-sR1	GTCGACATCCGAGTAAAGAAATTGACCG	
Mut- <i>pexlBA1</i> -35-sF2	TTTCTTTACTCGGATGTCGACAACGGGTGAGGTCTGCGACTAA	
Mut- <i>pexlBA1</i> -new10-sR1	GTCGACGTGCGAGACCTCACCCGTTTG	Mutagenèse <i>pexlBA</i>
Mut- <i>pexlBA1</i> -new10-sF2	GGTGAGGTCTGCGACGTCGACACGCAAGACACAAAGTTTACATAAC	
Mut- <i>pexlBA1</i> -new35-sR1	GCATGCCATCCGAGTAAAGAAATTGACCG	
Mut- <i>pexlBA1</i> -new35-sF2	TTCTTTACTCGGATGTCGACGCGGGTGAGGTCTGCGACTAA	
F1-SOE- <i>lysR</i>	CCCGGAATGCCAGTGCCAGAGCG	Délétion
R1-SOE- <i>lysR</i>	CTTCCAGCGCCTTGATCCGC	<i>RS13145</i> et
F2-SOE- <i>lysR</i>	GCGGATCAAGGCGCTGGAAGTAGGCGGTGCTCAGGTCCAG	<i>RS13150</i>
R2-SOE- <i>lysR</i>	CCCGGGCTGGGAATGAACGCGAGG	
F1-SOE- <i>phhR</i>	CCCGGGTGCCGCAAGGACTACCGC	
R1-SOE- <i>phhR</i>	TCCGCGAGCATCCGAGCAGC	Délétion <i>phhR</i>
F2-SOE- <i>phhR</i>	GCTGCTCGGATGCTCGCGGACGCCACTTCGCCGCGATTG	
R2-SOE- <i>phhR</i>	CCCGGGCTTGTGGCCGAGGGTCT	
IHMA-Mut- <i>lasR</i> -F1	CCGAATTCGTCGTGAGACTGTGACCGGGT	
IHMA-Mut- <i>lasR</i> -R1	TCATTCCAATTTCCACTTGAGCG	Délétion <i>lasR</i>
IHMA-Mut- <i>lasR</i> -F2	CTCAAGTGGGAAATTTGGAATGATTTCGAACATCCGGTGAACAAGC	
IHMA-Mut- <i>lasR</i> -R2	CCACTAGTAAGCTTCGACGGGAAAGCCAGGAAACT	
IHMA-Mut2- <i>pqsR</i> -F1	CCGAATTCGTCGAATTTACGAGCAATATGA	
IHMA-Mut2- <i>pqsR</i> -R1	CTCCTCGACGAAATAGTGCGGTCAAATAGGCATCCCTTTGTCCTTTTA	Délétion <i>pqsR</i>
IHMA-Mut2- <i>pqsR</i> -F2	TGACCGCACTATTTTCGTGAGGAG	

IHMA-Mut2-pqsR-R2	<u>CCAAGCTTCGGCAACTGGGCCTGCAGTT</u>	
IHMA-Mut-rhlR-F1	<u>CCGGATCCGCAGGTGCTGCTGCCTTG</u>	
IHMA-Mut-rhlR-R1	GTCGTTCTCATTGCAGTAAGC	Délétion <i>rhlR</i>
IHMA-Mut- rhlR-F2-2	GCTTACTGCAATGAGGAACGACTGATTTCGACGCGCCGAACAAGACC	
IHMA-Mut- rhlR-R2-2	<u>CCAAGCTTAGCCGCAGATGCCTTCCGCGC</u>	
Mut-RsmA-F1	<u>CCCGGAAGCCATCGCGCACACCAAC</u>	
Mut RsmA-R1	CCGGTGTACGGCGACTTCTCACATTCCTTTCTCCTCACGCGAA	Délétion <i>rsmA</i>
Mut-RsmA-F2	GAAGTCGCCGTACACCGGGAG	
Mut-RsmA-R2	<u>CCCGGGAGGATTCGAACCTCCGACC</u>	
Mut-vfr-F1	<u>CTGCAGCGCCAGCTTAGCACAGGGC</u>	
Mut-vfr-R1	GGCGACGCGTCCGGTGACTCAGCGGCCGTGCTGCTCCTCG	Délétion <i>vfr</i>
Mut-vfr-F2	GTCACCGGACGCGTCGCC	
Mut-vfr-R2	<u>GGATCCTCTCAACCGGGCCGACGTGG</u>	
Vfr-binding-F1	<u>GGATCCTACGGCATGCATCTCGATGTC</u>	Mutagenèse
Vfr-binding-R1	GCCTCTAGACTGATTCACGAAAGTTTGGCG	site de liaison
Vfr-binding-F2	CTTTCGTGAATCAGTCTAGAGGCGTTTCTTCGTCCAGTCAGCAAC	de Vfr sur
Vfr-binding-R2	<u>CTCGAGGCAATTGGCGTTGGCGTTCCCT</u>	<i>pexlBA</i>
IHMA-Mut-cyaA-F1	<u>CCTCTAGACCGACGCTGTTCCCTAGTCC</u>	
IHMA-Mut-cyaA-R1	CTGTCCGTTTCATGGGCGTCC	Délétion <i>cyaA</i>
IHMA-Mut-cyaA-F2	GGACGCCATGAACCGACAGCAGGCGCTGCTGGAGCAATGA	
IHMA-Mut-cyaA-R2	<u>GGCTCGAGATGCCTTCTGTGCCCTGCTG</u>	
IHMA-Mut-cyaB-F1	<u>CCTCTAGAGTGCTCTTCCACGCGCTGGC</u>	
IHMA-Mut-cyaB-R1	GAGGGTGGGCTTCATGCGCT	Délétion <i>cyaB</i>
IHMA-Mut-cyaB-F2	AGCGCATGAAGCCCACCTCTACGTGAGCACGAACTGCC	
IHMA-Mut-cyaB-R2	<u>GGCTCGAGCCTGGTGATGCTCGAAGCC</u>	
IHMA-Mut-fliC-F1	<u>GGGAATTTCGCGGGTGAAGAACCGTTTCC</u>	
IHMA-Mut-fliC-R1	TCAGGCCATCTTGATGCCCTCCAA	Délétion <i>fliC</i>
IHMA-Mut-fliC-F2	TTGGAGGGCATCAAGATGGCCTGAGGCCAATGACACCGTCCG	
IHMA-Mut-fliC-R2	<u>CCTCTAGACGTCGCTACCTCTCAATGAGATAC</u>	
IHMA-Comp-vfr-F	<u>CCGGATCCCGCCTCGAGGAAGGCCTCGCAGC</u>	Complémentati
IHMA-Comp-vfr-R	<u>CCAAGCTTCTGACTGATCCGCGCTGTCTGA</u>	on <i>vfr</i>
Comp-cyaA-sF	GATATCGAATTCCTGCAGCCCGCCGAACACCTGCTCGAGC	Complémentati
Comp-cyaA-sR	CTCTAGAAGTGTGGATCCCCGATAGCCATGGATTACGTCCCT	on <i>cyaA</i>
IHMA-Comp-cyaB-sF	GATATCGAATTCCTGCAGCCCTTTCGCGGAGTTCTACCCCTAT	Complémentati
IHMA-Comp-cyaB-sR	CTCTAGAAGTGTGGATCCCCGAGCAATCCTGGCGGGCCTC	on <i>cyaB</i>
Purif-vfr-NdeI-F	<u>GGCATATGGTAGCTATTACCCACACACCCA</u>	Surproduction
Purif-vfr-BamHI-R	<u>GGGGATCCTTCAGCGGGTGCCGAAGACCA</u>	de Vfr
rpoD-F3	CTGTTTCATGCCGATCAAGCTG	RT-qPCR
rpoD-R3	AACGCTGTCGACCCACTTCTC	(gène de
uvrD-up	CATATCCTGGTGGACGAGTTCC	référence)
uvrD-down	CGCTGAAGTGTGGATGTTCTC	
exlB-F	CCTATGGCTACTGGACCTACA	
exlB-R	AGGTAGCTGTCGACATCCTTG	RT-qPCR
exlA-F	CGCTGAAGGACAAGCTGGAA	
exlA-R	CATTACGGTGCATGCCGTTT	
5'Cy5- <i>pexlBA</i> _EMSA_F	CCAGTCGCGACACGCCAAACTTTCGTGAATCAGTTCACAGGCGTTTCTT CGTCCAGTAG	
<i>pexlBA</i> _EMSA_F	CCAGTCGCGACACGCCAAACTTTCGTGAATCAGTTCACAGGCGTTTCTT CGTCCAGTCAG	EMSA
<i>pexlBA</i> _EMSA-R	CTGACTGGACGAAGAAACGCCTGTGAACTGATTACAGAAAGTTTGGCG TGTCGCGACTGG	
5'Cy5- <i>pexlBA</i> _mut_EMSEA_F	CTGACTGGACGAAGAAACGCCTGTGAACTGATTACAGAAAGTTTGGCG TGTCGCGACTGG	

<i>pexlBA_mut_EMSA_F</i>	CCAGTCGCGACACGCCAAACTTTTCGTGAATCAGTCTAGAGGCGTTTCTT CGTCCAGTCAG
<i>pexlBA_mut_EMSA-R</i>	CTGACTGGACGAAGAAACGCCTCTAGACTGATTCACGAAAGTTTGGCG TGTCGCGACTGG

2. Conditions de culture

a. Conservation des souches

Les souches d'*E. coli* sont stockées à -80°C en milieu LB contenant 40% de glycérol (Nunc Cryotubes, Sigma Aldrich). La conservation des souches de *P. aeruginosa* est réalisée à -80°C dans des tubes contenant des billes et un milieu de cryoconservation, inoculés à partir de culture sur milieu solide (PROTECT Microorganism Preservation System, Technical service consultant Limited, UK).

b. Conditions générales

Les cultures bactériennes liquides sont effectuées en milieu Lysogeny Broth (LB, Difco) sous agitation à 300 rpm en aérobiose et à 37°C. La durée d'incubation varie selon les expériences. Les précultures sont réalisées sur la nuit (15-16h) en milieu LB. Les cultures sur milieu solide LB agar sont incubées à 37°C, entre 15h et 24h. La croissance bactérienne d'une culture liquide est estimée par la mesure de la densité optique à 600 nm (pour *P. aeruginosa* : $DO_{600}=1$ équivaut à 6.10^8 bactéries/mL).

Des antibiotiques sont ajoutés aux milieux, quand nécessaire, aux concentrations suivantes :

- Pour *P. aeruginosa* : 75 µg/mL gentamicine (Gm), 75 µg/mL tétracycline (Tc), irgasan 25 µg/mL (Irg)
- Pour *E. coli* : 25 µg/mL kanamycine (Kn), 10 µg/mL Tc, 50 µg/mL Gm, 10 µg/mL chloramphénicol (Cm), 100 µg/mL streptomycine (Sm)

Quand du L-arabinose est nécessaire pour induire le promoteur *pbad* des vecteurs pSW196, il est ajouté à 0,025% dans les cultures à $DO_{600}=0,1$.

Toutes les manipulations de *P. aeruginosa* ont été réalisées en laboratoire L2 sous PSM de classe II (Poste de Sécurité Microbiologique).

c. Conditions de tests de l'expression d'*ex/BA*

i. Effet du calcium

Les cultures de la nuit sont relancées en LB à $DO_{600}=0,1$. Quand elles atteignent une $DO_{600}=0,5$, 5 mM de $CaCl_2$ ou 20 mM $MgCl_2$ et 5 mM EGTA pH 8 sont ajoutés. La croissance des bactéries est poursuivie pendant 1h20, jusqu'à une DO_{600} d'environ 1,3-1,5.

ii. Effet du fer

Les cultures de la nuit sont relancées en LB à $DO_{600}=0,1$ en LB supplémenté ou non avec 300 μ M de chélateur du fer 2,2'-dipyridyl (Sigma). La croissance des bactéries est poursuivie jusqu'à une DO_{600} de 1.

iii. Effet du phosphate

Les cultures de la nuit sont relancées en LB à $DO_{600}=0,1$ en milieu minimum M9 (100 mM HEPES, 8,6 mM NaCl, 20 mM NH_4Cl , 1 mM $MgSO_4$, 1 mM $CaCl_2$, 0,05mM $FeCl_3$, 0,5% acides casaminés, 0,2% glucose, pH=7,2) supplémenté avec 0,12 mM Na_2HPO_4 et 0,22 mM KH_2PO_4 (faible [Pi]) ou 12 mM Na_2HPO_4 et 22 mM KH_2PO_4 (forte [Pi]). La croissance des bactéries est poursuivie jusqu'à une DO_{600} de 1.

3. Réaction de polymérisation en chaîne

La technique de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permet d'amplifier de l'ADN rapidement et spécifiquement, à l'aide de deux amorces oligonucléotidiques complémentaires aux extrémités de la séquence à amplifier. Il s'agit d'une répétition de cycles de synthèse comprenant la dénaturation de l'ADN chromosomique double brin, l'hybridation des amorces sur leur séquence complémentaire et l'élongation des amorces par une ADN polymérase thermostable. La réaction est effectuée dans un thermocycleur.

Les PCR sont réalisées avec des matrices ADN provenant de cultures liquides diluées au 1/10 ou d'une colonie bactérienne dissoute dans 100 μ L d'eau stérile. Les bactéries sont lysées par chauffage 10 min à 100°C. Le mélange de réaction est préparé dans un volume total de 20 μ L avec 0,5 à 1 μ L de matrice ADN, 0,1 μ M d'oligonucléotides F et R, 0,2 mM de chaque dNTP, du tampon de réaction et de l'ADN polymérase (Phusion, NEB, ou Advantage GC, Clontech) comme indiqué par le fabricant. Le kit Phusion est utilisé pour amplifier avec une haute précision l'ADN pour la construction des plasmides. Pour les vérifications, le kit Advantage GC est utilisé.

La SOE-PCR (*Splicing by Overlap Extension-PCR*) est une technique de PCR qui permet de fusionner deux fragments d'ADN (Fig. 55 ; Horton *et al.*, 1990). Chaque fragment est tout d'abord amplifié séparément lors d'une première étape de PCR avec les couples d'amorces F1/R1 et F2/R2. Une deuxième réaction de PCR est effectuée avec le couple d'amorces F1/R2 pour fusionner les deux fragments d'ADN, grâce à la présence de séquences complémentaires sur les amorces R1 et F2. Lors de la construction d'un plasmide, le fragment PCR ainsi obtenu est cloné dans le vecteur de clonage pCR-Blunt II-TOPO puis sous-cloné par digestion enzymatique et ligation dans le vecteur final (pEXG2, miniCTX) grâce à la présence de sites de restriction à chaque extrémité du fragment (Fig. 55).

4. Technique de SLIC (*Sequence and Ligation-Independent Cloning*)

La SLIC est une technique de clonage qui permet d'assembler plusieurs fragments d'ADN en une seule réaction sans avoir recours à des sites de restriction (Fig. 56 ; Li and Elledge, 2007). Les fragments d'ADN amplifiés par PCR et le vecteur linéarisé sont mélangés en présence de T4 DNA polymérase qui, par son activité exonucléase 3'→5', va générer des extrémités 5' sortantes. Les extrémités des fragments et du vecteur étant homologues (sur environ 20 nt), l'assemblage du complexe est ensuite effectué par hybridation des ADN simple-brin.

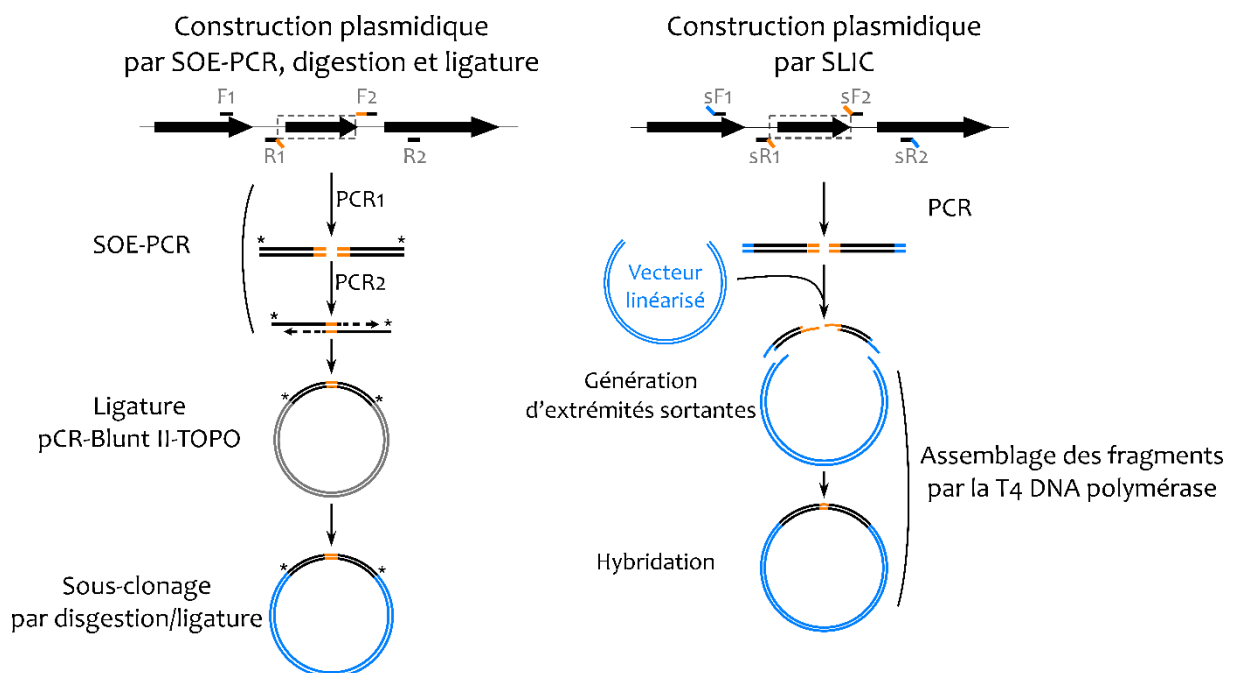


Figure 56 : Présentation des deux techniques utilisées pour la construction de plasmides.

(s)F : oligo forward, (s)R : oligo reverse, *=site de restriction

Le mélange de réaction contient, dans un volume total de 10 μ L, 30 fmol de vecteur linéarisé, 60 à 120 fmol d'insert (ratio 1:2 à 1:4), 1 μ L de NEBuffer 2.1 10X, et 0,2 μ L de T4 DNA Polymerase 3000U/ml (NEB). La réaction est effectuée à 22°C pendant 2,5 min puis stoppée 10 min sur la glace.

Bien que la plupart des plasmides utilisés dans cette étude aient été construits avec une stratégie basée sur la digestion par enzyme de restriction et la ligation, la SLIC, étant moins contraignante, est devenue la technique de clonage courante au laboratoire.

5. Construction des plasmides

Pour déléter une région génique du génome de *P. aeruginosa*, les régions flanquantes en amont et en aval des séquences à déléter sont fusionnées par SOE-PCR en utilisant les paires d'oligonucléotides appropriées (Tableau 5) puis sous-clonées du pCR-Blunt II-TOPO dans le vecteur suicide pEXG2, comme indiqué dans le tableau 4. Pour la construction des vecteurs permettant de muter les boîtes promotrices de *pexlBA*, les mutations étaient sur les oligonucléotides sR1 et sF2 (Tableau 5) et ont apporté un site de restriction afin de faciliter la sélection du génotype muté. Les fragments d'intérêts ont été clonés dans le pEXG2 par SLIC (Tableau 4).

Pour compléter les mutants de délétion, la séquence de chaque gène sauvage est amplifiée par PCR puis sous-clonée dans le vecteur intégratif miniCTX1 par digestion enzymatique ou insérée directement dans les vecteurs intégratifs miniCTX1 ou pSW196 par SLIC, comme indiqué dans le tableau 4. La séquence des gènes clonés dans le miniCTX1 comprend aussi leur promoteur spécifique, tandis que les gènes clonés dans le pSW196 sont sous le contrôle du promoteur inductible à l'arabinose *pbad*.

Les fusions transcriptionnelles *prom4_exlB-lacZ* et *prom2_exlBA-gfp* ont été construites par amplification de la séquence par PCR, ligation dans le pCR-Blunt II-TOPO puis sous-clonage dans le vecteur intégratif miniCTX-*lacZ* ou miniCTX-*gfp* par digestion enzymatique (Tableau 5).

Pour la surproduction de Vfr chez *E. coli*, le gène *vfr* d'IHMA87 a été amplifié par PCR puis sous-cloné dans le plasmide de surproduction pET15BVP par digestion enzymatique et ligation.

Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage.

6. Transformation par choc thermique d'*E. coli*

Pour introduire un plasmide dans *E. coli*, des bactéries Top10 ou BL21Star(DE3) compétentes sont transformées par choc thermique. 2,4 µL de plasmide (mélange de ligature ou produits de SLIC) sont ajoutés à 50 µL de bactéries et incubés 15 min sur la glace. Après un choc thermique 30 sec à 42°C puis 2 min sur glace, les bactéries sont reprises dans 450 µL de milieu S.O.C. (*Super Optimal broth with Catabolite repression*) puis incubées à 37°C pendant 1h avec une agitation à 200 rpm. Les clones transformants sont sélectionnés sur gélose LB contenant l'antibiotique adéquat.

7. Conjugaison de *P. aeruginosa*

La conjugaison permet le transfert de plasmides mobilisables dans *P. aeruginosa* à partir d'une souche « donneuse » d'*E. coli* (Fig. 57 ; Sana *et al.*, 2014). Les fonctions de transfert sont portées soit sur le chromosome de la souche d'*E. coli* soit sur un plasmide. Dans le cas d'une conjugaison tri-parentale (3 souches), la souche « donneuse » et le vecteur d'intérêt ne possèdent pas les fonctions de transfert, une souche d'*E. coli* « helper » qui contient un plasmide « helper » portant ces fonctions est donc nécessaire pour la conjugaison vers la souche « receveuse ». Lorsque l'intégration d'une séquence d'intérêt sur le chromosome de *P. aeruginosa* nécessite une enzyme spécifique non codée par le vecteur d'intérêt, une troisième souche d'*E. coli* qui porte un plasmide codant pour cette enzyme est utilisée (conjugaison tétra-parentale).

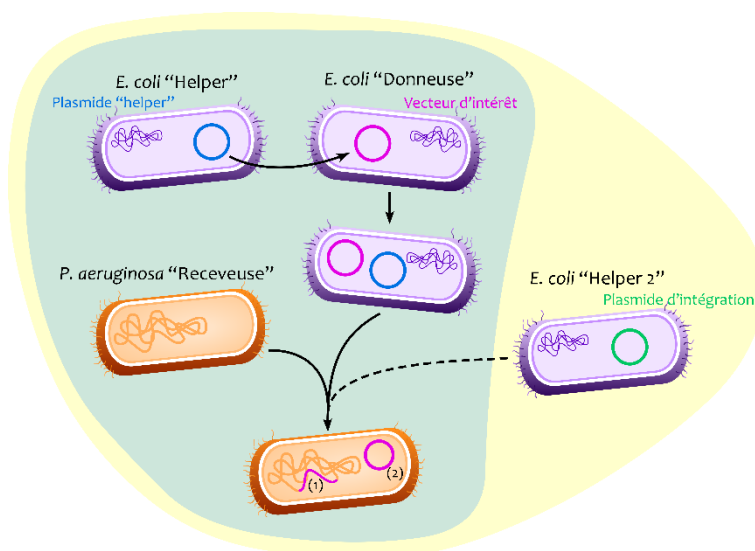


Figure 57 : Principe de la conjugaison bactérienne.

Transfert d'un vecteur chez *P. aeruginosa* par conjugaison tri-parentale (fond bleu) ou tétra-parentale (fond jaune). Le vecteur d'intérêt peut être suicide (1), l'ADN sera intégré sur le chromosome de *P. aeruginosa*, ou réplcatif (2).

Un protocole spécifique a été optimisé pour la conjugaison des souches de type PA7. Malgré cela, l'efficacité de conjugaison d'IHMA87 reste faible.

Pour les conjugaisons tri-parentales, les plasmides « helper » pRK2013 ou pRK600 sont utilisés. A partir de cultures sur boîte, les 3 souches bactériennes (*E. coli* « donneuse », *E. coli* « helper », *P. aeruginosa* « receveuse ») sont reprises en LB à $DO_{600}=1$. A noter, la souche portant le plasmide pRK600 est cultivée sur la nuit en milieu liquide et diluée à $DO_{600}=1$ en LB. 600 μ L de chacune des souches d'*E. coli* sont centrifugés, repris dans 20 μ L de LB puis déposés en goutte à la surface d'une gélose LB sèche. La boîte est incubée 2h à 37°C et la suspension de *P. aeruginosa* 2h à 42°C. 300 μ L de cette suspension sont centrifugés, repris dans 20 μ L de LB et disposés à la surface de la goutte séchée d'*E. coli*. La boîte est ré-incubée 6h à 37°C. La goutte est reprise dans 150 μ L de LB et la suspension étalée sur gélose LB contenant de l'irgasan pour contre-sélectionner *E. coli* et l'antibiotique adéquat pour sélectionner les transconjugants. Pour la conjugaison tétra-parentale, les plasmides « helper » pRK600 et pUX-BF13 sont utilisés. Le protocole appliqué est le même que pour la conjugaison tri-parentale, en mélangeant 300 μ L des trois souches d'*E. coli*.

Le vecteur suicide pEXG2, les vecteurs intégratifs miniCTX et pSW196 et le vecteur réplicatif pUCP22-*pcdrA-gfp*(ASV)^c sont transférés dans *P. aeruginosa* par conjugaison tri-parentale. Le vecteur suicide pTn7-*pcdrA-gfp*(ASV)^c ne code pas pour la transposase nécessaire à l'intégration du transposon et est donc transféré par conjugaison tétra-parentale.

Il est à noter qu'après intégration des vecteurs miniCTX et pSW196 sur le génome bactérien, le squelette du vecteur est normalement éliminé grâce à la présence de deux sites de recombinaison FRT et de la recombinase FLP codée par le plasmide pFLP2 (Hoang *et al.*, 1998). Seulement, ce plasmide est généralement transféré dans les bactéries par transformation bactérienne mais la transformation d'ADN plasmidique chez IHMA87 ne fonctionne pas, quelque soit la méthode employée. La conjugaison du plasmide pFLP2 chez IHMA87 a été tentée mais n'a également pas été efficiente. De ce fait, tous les vecteurs miniCTX et pSW196 utilisés au cours de l'étude sont entièrement intégrés sur le génome d'IHMA87, ce qui peut expliquer les artefacts observés notamment lors du dosage des activités β -galactosidase avec la fusion *lacZ*.

La délétion d'une séquence génomique est réalisée par échange allélique entre le plasmide suicide pEXG2, contenant les régions flanquantes à la séquence à déléter, et le génome. Après conjugaison, les co-intégrats dans lesquels le plasmide pEXG2 a été intégré par recombinaison homologue sont sélectionnés sur Gm puis sont repiqués sur gélose LB sans NaCl contenant 10% (p/v) de saccharose afin de sélectionner la perte du plasmide. En effet, le gène *sacB* présent sur le plasmide pEXG2 code pour une lévane-saccharase qui convertit le saccharose en lévane, un produit toxique qui induit la mort des bactéries. Seules celles qui ont perdu le plasmide suite à une seconde recombinaison homologue peuvent se développer sur ce milieu. La sensibilité à l'antibiotique des souches « saccharose résistantes » est ensuite vérifiée et une PCR est réalisée pour valider le génotype mutant.

8. Transformation par électroporation de *P. aeruginosa*

Le plasmide pUCP22-*pcdrA-gfp*(ASV)^c a été transformé dans les souches CLJ1 et CLJ3 par électroporation. Les bactéries sont rendue compétentes par un traitement au saccharose d'après le protocole de Choi et Schweizer (Choi and Schweizer, 2006). 3 mL de culture de la nuit sont centrifugé 2 min à 16000 g puis le culot est repris dans 250 µL de saccharose 300 mM (à température ambiante). La suspension est centrifugée puis le culot repris dans 250 µL de saccharose 300 mM. Après une dernière centrifugation, les bactéries sont resuspendues dans 100 µL de saccharose 300 mM. 100 ng d'ADN plasmidique (volume de 10 µL maximum) sont mélangés délicatement à 100 µL de bactéries compétentes dans une cuve à électroporation de 2 mm. L'électroporation est réalisée à 25 µF, 200 Ω, 2,5 kV. Immédiatement après, 1 mL de LB est ajouté et la suspension incubée 1h à 37°C, 200 rpm. Les clones transformants sont sélectionnés sur gélose LB Cb100.

9. RT-qPCR

La RT-qPCR (*Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction*) permet d'analyser le niveau en ARNm cible dans un échantillon (Freeman *et al.*, 1999).

a. Extraction des ARN

Les ARN totaux sont extraits à partir de culture bactérienne à $DO_{600}=1$ soit par extraction au phénol chaud et précipitation à l'éthanol soit en utilisant le kit TRIzol Plus RNA Purification (Invitrogen). L'ADN résiduel est ensuite éliminé avec la DNase I Amplification Grade (Invitrogen). La pureté et l'intégrité des ARN sont vérifiées sur gel d'agarose et les concentrations en ARN sont déterminées au NanoVue.

i. Extraction au phénol chaud

200 µL de solution de lyse 8X (320 mM acétate de sodium, 8% SDS, 16 mM EDTA) sont mélangés à 1600 µL de solution d'acide-phénol (Ambion) et pré-incubés à 65°C. 4 mL de culture bactérienne sont centrifugés 5 min à 8000 rpm, le culot est repris dans 1400 µL de LB qui sont ensuite mélangés à la solution lyse/acide-phénol. Cette solution est chauffée pendant 10 min à 65°C, en vortexant 5 à 10 sec toutes les minutes. Après centrifugation 15 min à 12000 g (4°C), la phase supérieure est transférée dans 1400 µL de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (Invitrogen). Après 5 min de centrifugation à 12 000g (4°C), la phase supérieure est de nouveau

transférée dans 1300 μL de phénol-chloroforme-alcool isoamylique. Après 5 min de centrifugation à 12000 g (4°C), la phase supérieure est ajoutée à 1 mL de chloroforme froid pour éliminer les résidus de phénol. L'échantillon est centrifugé 5 min à 12000 g puis la phase supérieure est placée dans 3 fois son volume en éthanol 100%. Après une nuit à -80°C puis décongélation sur la glace, les échantillons sont centrifugés 10 min et les culots lavés avec 500 μL d'alcool 70% (sans RNase). Les ARN sont repris dans 30 μL d'eau sans RNase.

ii. Extraction avec un kit

2 mL de culture bactérienne sont centrifugés 10 min à 8000 rpm (4°C) et le culot est repris dans 1 mL de TRIzol (Invitrogen). 200 μL de chloroforme sont ajoutés aux échantillons qui sont ensuite centrifugés 15 min à 12000 g (4°C). La phase supérieure est transférée dans un volume équivalent d'éthanol 70% (sans RNase). Les ARN totaux sont ensuite extraits sur colonne selon les indications du fabricant et resuspendus dans 30 μL .

b. Transcription inverse

Les ADN complémentaires des ARN sont synthétisés par transcription inverse en utilisant le kit SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). La rétrotranscription est réalisée dans un volume final de 20 μL , à partir de 2,5 à 3 μg d'ARN et pendant 50 min à 50°C, en présence d'hexamères aléatoires. La réaction est arrêtée par chauffage des échantillons à 85°C pendant 5 min. Des échantillons témoins sont réalisés dans les mêmes conditions en remplaçant l'enzyme par le même volume d'eau pour avoir un contrôle sans traitement à la reverse transcriptase (non RT) qui permet de différencier la fluorescence du bruit de fond provoqué par une contamination en ADN génomique et celle liée spécifiquement à l'amplification des ADNc. Les ARN résiduels sont éliminés par traitement avec la RNase H 20 min à 37°C.

c. PCR quantitative

L'amplification quantitative par PCR des ADNc est réalisée en utilisant l'appareil CFX96 Real-Time (Biorad). La quantification est basée sur la détection des molécules fluorescentes SYBR. 2 μL d'ADNc sont incubés avec 5 μL de Gotaq master mix 2X (Promega) et le couple d'amorces spécifiques à une concentration finale de 125 nM, dans un volume réactionnel de 10 μL . Les paramètres du programme d'amplification sont les suivants : une étape d'activation de la Taq polymérase 2 min à 95°C, 40 cycles de 15 sec à 95°C/45 sec à 60°C et une courbe de fusion de 65°C à 95°C par incréments de 0,5°C toutes les 5 sec pour vérifier la spécificité des amorces. Une gamme de dilution en série d'ADNc de la souche IHMA87 est réalisée pour établir les droites étalons. Le niveau en ARNm de l'échantillon est estimé grâce à la détermination du Cq (*quantification cycle*), qui correspond au nombre minimal de cycles nécessaires pour détecter un signal fluorescent

exponentiel dans l'échantillon (qui augmente donc de façon linéaire en échelle logarithmique). Plus le nombre d'ARNm cibles est important dans l'échantillon au départ, plus le Cq sera faible. L'analyse des résultats est réalisée à l'aide du logiciel CFX manager (Biorad) et l'expression relative des ARNm d'intérêt est calculée à l'aide de la méthode Pffafl en normalisant par rapport aux valeurs Cq des ARN référence UvrD (hélicase II) ou RpoD (σ^{70}). Les amorces ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer3Plus (amplicon *uvrD* : 160 pb, amplicon *rpoD* : 167 pb, amplicon *exlB* : 200 pb, amplicon *exlA* : 84 pb). Les expériences ont été réalisées en duplicat, avec 3 réplicats biologiques pour chaque souche.

10. Motilité

Pour chaque test, l'inoculum correspond à des bactéries provenant d'une culture de la nuit à 37°C sur gélose LB et est ensemencé à l'aide de cure-dents stériles.

Le test de motilité *swarming* analyse le mouvement des bactéries à la surface d'un milieu gélosé semi-solide. Les bactéries sont inoculées au milieu d'une gélose M8 (8,5 mM NaCl, 42,3 mM Na₂HPO₄, 22 mM KH₂PO₄, 0,5% agar, 1 mM MgSO₄, 0,2% glucose, 0,1 mM CaCl₂, 0,5% acides casaminés, 0,5% agar) et incubées 24h à 37°C. Le diamètre de *swarming* correspondant à la zone couverte par les prolongements visibles autour du point d'inoculation est mesuré.

L'analyse de la motilité *twitching* mesure la capacité des bactéries à se propager sous un milieu gélosé solide. Les bactéries sont inoculées à l'interface plastique/agar d'une gélose 1% agar contenant 10 g/L de tryptone, 5 g/L d'extrait de levure et 10 g/L de NaCl, et incubées 48h à 37°C. Après retrait de la gélose, la zone de *twitching* étendue autour du point d'inoculation est colorée avec du Bleu de Coomassie 0,1% pendant 10 min et le diamètre de *twitching* est mesuré après rinçage.

11. Analyse de la formation de biofilm à l'interface air-liquide

Dans le but de mesurer la formation de biofilm à l'interface air-liquide, un marquage au cristal violet selon le protocole publié par Vallet *et al.* en 2001 a été utilisé (Vallet *et al.*, 2001). Les bactéries sont diluées à DO₆₀₀=0,2 dans 1 mL de milieu M63 supplémenté avec 0,2% glucose, 0,5% acides casaminés et 1 mM MgSO₄, dans une plaque 24 puits Thermofisher puis incubées à 30°C sans agitation pendant 6h. Les cellules adhérentes sont colorées avec une goutte de cristal violet 0,1% pendant 10mn. Après deux lavages à l'eau stérile et séchage de la plaque, le cristal violet est

dissout dans 400µL d'éthanol 95%. 600 µL d'eau sont ajoutés et l'absorbance est mesurée à 570nm.

12. Dosage de l'activité β-galactosidase

Le dosage de l'activité β-galactosidase est effectué selon la méthode originale publiée dans *Experiments in molecular genetics* par Jeffrey H. Miller en 1972 (Miller, 1972). 20 µL de SDS 0,1% et 20 µL de chloroforme sont ajoutés à 500 µL de culture bactérienne (à DO₆₀₀ souhaitée) puis les échantillons sont vortexés pendant 1 min pour perméabiliser les bactéries. Un volume de 100 à 200µL de suspension est prélevé et ajusté à 1 mL avec du tampon Z (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM β-mercaptoethanol, pH 7) puis pré-incubé 10 min à 28°C. La réaction est initiée par l'ajout de 200 µL d'ONPG (ortho-nitrophényl-β-galactopyranoside) à 4 mg/mL et stoppée avec 500 µL de Na₂CO₃ 1 M. Les débris cellulaires sont sédimentés par centrifugation à 13 000 rpm pendant 10 min puis l'absorbance à 420 nm est lue avec un spectrophotomètre. Les activités sont exprimées en Unités de Miller d'après la formule suivante : $(1000 \times DO_{420}) / (t_{\text{réaction}(\text{min})} \times V_{(\text{ml})} \times DO_{600})$, où V est le volume de bactéries, t le temps de réaction et DO₆₀₀ la densité optique de la culture bactérienne. Les expériences ont été réalisées au minimum deux fois, avec des triplicats biologiques.

13. Mesure de la fluorescence par cytométrie en flux

Pour mesurer la fluorescence GFP par cytométrie en flux, 120 µL de culture à DO₆₀₀=1 sont centrifugés 5 min à 6000 rpm. Le culot est resuspendu dans 400 µL de tampon PBS puis l'analyse de la fluorescence émise par les bactéries des échantillons est réalisée avec le cytomètre en flux FACS Calibur (BD Biosciences).

L'échantillon IHMA87::miniCTX-pX2-gfp, qui synthétise constitutivement la GFP, a été analysé le premier pour identifier la population bactérienne et la sous-population positive pour la fluorescence GFP. La fluorescence des autres échantillons a ensuite été mesurée en conservant les mêmes paramètres.

14. Mesure de la fluorescence au fluoroskan

Afin d'estimer le niveau intracellulaire en di-GMPc chez les bactéries, la fusion rapportrice *p_{cdrA}-gfp* est utilisée. L'analyse est réalisée par mesure de la fluorescence GFP émise par les bactéries avec le lecteur Fluoroskan Ascent CF (Labsystems). Des bactéries à $DO_{600}=0,05$ sont ensemencées dans une plaque 96 puits noire à fond transparent (Greiner) à raison de 100 μ L par puit. La fluorescence est mesurée (longueur d'onde d'excitation à 485 nm et d'émission à 527 nm) toutes les 15 min pendant 6 à 18h, avec une incubation à 37°C et 60 rpm. En parallèle, la croissance bactérienne à 37°C et 60 rpm est suivie par lecture de la densité optique à 585 nm avec le lecteur de plaque Multiskan Ascent (Labsystems). Pour cela, une autre plaque 96 puits, transparente, est ensemencée de façon identique. Le niveau intracellulaire en di-GMPc correspond à la fluorescence normalisée par rapport à la DO_{585} .

15. Marquage immunofluorescent d'ExlA

Pour réaliser le marquage immunofluorescent d'ExlA à la surface des bactéries, celles-ci sont cultivées en LB jusqu'à $DO_{600}=1$ puis 4 mL de culture sont fixés sur la nuit à 4°C avec 4% de PFA/125 mM HEPES pH 7,4. Après une centrifugation 15 min à 3000 rpm, les bactéries sont lavées avec 1 mL de PBS deux fois. Le culot est ensuite repris dans 50 μ L de BS (*blocking solution*, 0,5 % BSA-PBS) et incubé 30 min à température ambiante. Après centrifugation 1 min à 8000 rpm, les bactéries sont resuspendues dans 50 μ L de BS contenant les anticorps monoclonaux anti-ExlA dilués 1/500^e (Tableau 7) et incubées 30 min à température ambiante. Après 3 lavages, les bactéries sont incubées avec 50 μ L de BS contenant des anticorps anti-souris couplés au fluorophore Cy3 dilués au 1/1000^e et du SYTO24-Green dilué au 1/2500^e. Après 3 lavages, les bactéries sont finalement resuspendues dans 50 μ L de BS.

5 à 10 μ L de bactéries marquées sont déposés dans un compartiment d'une lame Lab-Tek et un carré d'agar 1,5% est déposé dessus. Le marquage est observé au microscope Olympus IX71 contrôlé par le système Olympus CellR et le logiciel Xcellence Olympus, en utilisant un objectif à huile 100X.

16. Analyses statistiques

Il est à noter que tous les tests statistiques de cette étude ont été réalisés avec un T-test de Student bilatérale. La significativité est représentée par une étoile (*) lorsque la valeur-*p* est

inférieure ou égale à 0,05, deux étoiles (**) si la valeur- p est inférieure ou égale à 0,01 et trois étoiles (***) quand elle est inférieure ou égale à 0,001.

Chapitre 2

Biologie Cellulaire

1. Test de cytotoxicité bactérienne

La cytotoxicité bactérienne induite par ExlA est étudiée sur la lignée cellulaire épithéliale de carcinome de poumon A549, qui est cultivée en milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Difco) supplémenté par 10% de SVF (Sérum de Veau Fétal, Gibco) à 37°C avec 5% de CO₂.

Deux techniques différentes permettent d'analyser la perméabilisation membranaire par les bactéries : la mesure du relargage de la LDH (lactate déshydrogénase) dans le surnageant d'infection ou la mesure de l'incorporation d'iodure de propidium (IP) dans les cellules épithéliales.

a. Mesure du relargage de LDH

La veille de l'infection, les cellules A549 sont déposées dans une plaque de culture cellulaire 48 puits (Falcon), à raison de $8 \cdot 10^4$ cellules/puit en RPMI + 10% SVF.

1h avant l'infection, le milieu RPMI est remplacé par du milieu EBM2 non supplémenté (Endothelial-Basal-Medium-2, LONZA). Les cellules sont infectées avec des bactéries à $DO_{600}=1$ et à une MOI (*Multiplicity of infection*) de 10 pendant 4h30. La cytotoxicité est estimée en mesurant l'activité de l'enzyme cytosolique LDH relarguée dans le milieu par les cellules mortes suite à la perméabilisation de leur membrane, grâce au kit Cytoxicity LDH detection kit (Roche). 30 μ L de surnageant d'infection sont prélevés pour chaque puit et disposés dans une nouvelle plaque 96

puits. 100 μ L de solution du kit de dosage sont ajoutés dans chaque puit contenant le surnageant d'infection et la plaque incubée quelques minutes à l'obscurité. L'absorbance à 492 nm est ensuite lue avec un lecteur de plaque Multiskan Ascent (Labsystems). Le témoin négatif correspond à la mesure de l'activité LDH du surnageant de cellules non infectées et le contrôle positif est obtenu après lyse totale des cellules par l'addition de TritonX-100 1% final en fin d'infection. Le degré de cytotoxicité est calculé en déterminant le pourcentage de cytotoxicité par rapport au contrôle positif. Les expériences ont été réalisées au minimum en triplicat biologique.

b. Mesure de l'incorporation d'IP

Environ 48h avant l'infection, $1,25 \cdot 10^4$ cellules sont déposées dans chaque puit d'une plaque de culture cellulaire 96 puits noire (Greiner) en RPMI + 10% SVF.

2h avant l'infection, le milieu RPMI est remplacé par du milieu EBM2 supplémenté en SVF et comprenant 0,5 μ g/mL d'IP. L'infection est réalisée à une MOI de 10 (sauf exception à 1 et 0,1 pour l'analyse de l'effet de la modulation du di-GMPc sur la toxicité bactérienne) avec des bactéries à $DO_{600}=1$. L'IP est un intercalant de l'ADN, dont le signal de fluorescence augmente considérablement après liaison à l'ADN, qui permet de marquer les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire. L'incorporation d'IP dans les noyaux des cellules épithéliales est mesurée grâce au suivi de la fluorescence avec le lecteur Fluoroskan Ascent CF (Labsystems). Les paramètres utilisés sont les suivants : température d'incubation à 37°C, longueur d'onde d'excitation à 544 nm et d'émission à 590 nm, et acquisition toutes les 15 minutes pendant 6h. La cytotoxicité est estimée en fonction du pourcentage de fluorescence, en considérant que le puit présentant la plus forte fluorescence correspond à 100%. La fluorescence des puits non infectés est soustraite à celle des puits infectés. L'aire sous la courbe est calculée pour chaque courbe afin de faciliter la représentation comparative et l'analyse statistique (Fig. 58). Les expériences ont été réalisées au minimum en triplicat biologique.

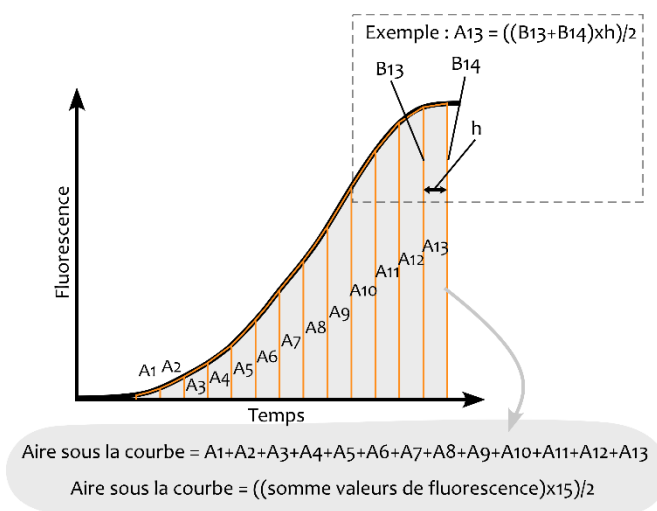


Figure 58 : Détermination de l'aire sous la courbe.

L'aire sous la courbe est calculée selon le calcul d'aire d'un trapèze : $A = ((B+b) \times h) / 2$, où B et b correspondent aux valeurs de fluorescence et h à l'intervalle de temps de 15 min entre chaque mesure. L'aire sous la courbe est la somme des aires des trapèzes formant cette courbe

Chapitre 3

Biochimie

1. Production et Purification de la protéine His₆-Vfr

Pour surproduire la protéine His₆-Vfr, les bactéries *E. coli* BL21Star(DE3) contenant le plasmide pET15BVP-purif-*vfr* sont cultivées dans 100 mL de LB supplémenté en Amp à 37°C et l'expression de *vfr* est induite à DO₆₀₀=0,6 par 1 mM d'IPTG. Après 3h de culture, les bactéries sont centrifugées puis reprises dans 25 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8 en présence d'inhibiteurs de protéases (Roche). Les bactéries sont broyées au Microfluidizer M110-P (Microfluidics) et, après une centrifugation de 30 min à 30000 rpm (4°C), la fraction soluble est chargée sur une colonne de nickel 1 mL (Protino Ni-NTA, Macherey-Nagel) en utilisant le système ÄKTA purifier (GE Healthcare). Après lavages par des concentrations croissantes en imidazole (20, 40, 60 mM), les protéines sont ensuite éluées par 200 mM d'imidazole. Les échantillons correspondants aux pics de fractions protéiques sont analysés par SDS-PAGE et les fractions avec Vfr sont mélangées et dialysées contre un tampon contenant 50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 50 mM NaCl, 2 mM dithiothreitol, 2 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5% Tween-20, pH 7 (Fuchs *et al.*, 2010a).

2. Retard sur gel

Les sondes fluorescentes Cy5-*pexlBA*, *pexlBA*, Cy5-*pexlBA*-mut et *pexlBA*-mut sont obtenues en mélangeant les paires d'oligonucléotides 5'Cy5-*pexlBA*_EMSA_F et *pexlBA*_EMSA_R, *pexlBA*_EMSA_F et *pexlBA*_EMSA_R, 5'Cy5-*pexlBA*_mut_EMMA_F et *pexlBA*_mut_EMMA_R ou *pexlBA*_mut_EMMA_F et *pexlBA*_mut_EMMA_R à une concentration finale de 1 μ M dans un tampon contenant 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl et 1 mM EDTA (Tableau 5). Le mélange réactionnel est chauffé 5 min à 10°C dans un bain marie puis laissé refroidir sur la nuit (le système de chauffage est éteint et le mélange laissé dans le bain-marie). Les sondes fluorescentes sont protégées de la lumière en enrobant les tubes de papier aluminium.

Pour analyser l'interaction entre la protéine His₆-Vfr et *pexlBA*, 0,5 nM de sondes sont incubés 5 min à 25°C dans un tampon de liaison (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 5% glycerol, 100 μ g/mL sérum-albumine bovine, 1 mM EDTA, pH 7,5) contenant 25 ng/ μ L poly(dI-dC) et, quand nécessaire, 20 μ M d'AMPc (Sigma-Aldrich). 2 μ L de protéine Vfr sont ensuite ajoutés à différentes concentrations dans un volume final de 20 μ L et la réaction est incubée 15 min à 25°C. Pour le test de compétition, les sondes non marquées sont ajoutées en excès par rapport aux sondes marquées (200x). Les échantillons sont déposés sur un gel de polyacrylamide 5% TBE (89 mM Tris, 89mM Borate, 2mM EDTA) natif de 1 mm d'épaisseur, pré-migré à 4°C pendant 30 min. Les sondes libres sont séparées des complexes protéine-sonde par migration à 100V, 4°C avec du tampon TBE 0,5X froid pendant environ 1h (à l'obscurité). Le gel est révélé par mesure de la fluorescence en utilisant l'appareil Chemidoc MP (Biorad). Les expériences de retard sur gel ont été reproduites au minimum 2 fois, et les gels représentatifs sont présentés dans ce manuscrit.

3. Préparation des échantillons protéiques

a. Extraits bactériens totaux

Afin d'analyser la quantité d'ExlA dans les bactéries, les extraits bactériens totaux sont obtenus par centrifugation de cultures bactériennes 10 min à 6000 g puis élimination du surnageant. Le culot est repris dans 1/10^e de volume de tampon de charge Laemmli (1X : 6,25mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS (p/v), 5% β -mercaptoéthanol (v/v), 10% glycérol (v/v), 0,005% bleu de bromophénol (p/v)).

b. Extraits cytosoliques

La synthèse de Vfr et RsmA a été analysée à partir de 30 mL de culture bactérienne à DO₆₀₀=1. Après centrifugation 10 min à 6000 g, le culot obtenu est repris dans 600 μ L de tampon

IMAC10 (25 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8) en présence d'inhibiteurs de protéases (Roche). Les bactéries sont lysées par sonication (3x150 joules, Amp40%, sonde de 2 mm, sur glace fondante). Les débris cellulaires insolubles sont ensuite culottés par centrifugation 30 min à 22000 g (4°C). Le surnageant, correspondant à la fraction soluble, est récupéré et du tampon de charge Laemmli 4X est ajouté.

c. Sécrétomes

Un protocole particulier de précipitation de protéines a été mis en place afin de visualiser la protéine ExlA présente en très faible quantité dans les surnageants de culture ou d'infection par Western-blot.

Les surnageants (entre 1 et 10 mL) sont collectés en centrifugeant les cultures bactériennes ayant atteint une $DO_{600}=1$ ou le milieu de culture de cellules épithéliales après 2h d'infection. Les protéines sont précipitées à 4°C par l'ajout de 0,02% de DOC (déoxycholate de sodium) puis de 10% de TCA (acide trichloroacétique) 30 min après. La solution est incubée à 4°C de 2h à une nuit. Les protéines sont culottées par centrifugation à 15000 g pendant 15 min (4°C) puis resuspendues dans du tampon de charge Laemmli pour concentrer l'échantillon 100 fois (1/100^e du volume initial de surnageant).

A noter que l'analyse d'ExlA dans le surnageant de culture du mutant IHMA87 $\Delta erfA$, qui synthétise beaucoup de protéines ExlA, ne nécessite pas de précipitation. Après centrifugation des cultures bactériennes, les surnageants sont directement prélevés et mélangés au tampon de charge Laemmli.

4. Fractionnement cellulaire

Pour visualiser la présence de protéines dans les différents compartiments cellulaires, 30 mL de culture bactérienne sont centrifugés 15 min à 600 rpm (4°C) puis le culot repris dans 1 mL de tampon M (20 mM Tris-HCl, 200 mM MgCl₂, pH 8, inhibiteurs de protéase) supplémenté par 0,5 mg/mL de lysozyme et incubé 30 min à 4°C en rotation. Après 15 min de centrifugation à 11000 rpm (4°C), 150 μ L de surnageant, qui correspond à la fraction périplasmique, sont prélevés. Le culot, contenant les sphéroplastes, est lavé avec du tampon B (20 mM Tris-HCl, 20% saccharose, pH 8, inhibiteurs de protéase) puis centrifugé 15 min à 11000 rpm (4°C). Le culot est repris dans 1 mL de tampon M et les éléments sont lysés par sonication (5 min : 10 sec ON/10 sec OFF, amplitude à 40%, 4°C). Les débris sont culottés 15 min à 6000 rpm (4°C). Le surnageant est centrifugé 10 min à 6000 rpm (4°C) puis ultra-centrifugé 45 min à 200000 g (4°C) pour séparer le cytosol et les membranes. 150 μ L de surnageant sont prélevés et correspondent à la fraction cytosolique. Après lavage du culot avec du tampon A (20 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, pH 8,

inhibiteurs de protéase), il est repris dans 500 μ L de tampon B puis légèrement soniqué. Cette dernière fraction correspond aux membranes totales.

5. Test d'accessibilité à la protéinase K

Le test d'accessibilité à la protéinase K utilisé a été adapté de la méthode publiée par Faure *et al.* en 2014 (Faure *et al.*, 2014). 2 mL de culture bactérienne à $DO_{600}=1$ sont centrifugés 10 min à 8000 rpm. Les bactéries sont resuspendues dans 1 mL de tampon 20 mM Tris HCl, 10 mM $MgCl_2$, pH 8. Les protéines extracellulaires sont soumises à la digestion par ajout de protéinase K à une concentration finale de 3 ou 30 ng/mL. Après 5 min de réaction sur la glace, les bactéries sont sédimentées par centrifugation 5 min à 2375 g. Le culot est immédiatement resuspendu dans 100 μ L de tampon de charge Laemmli et les échantillons sont dénaturés 10 min à 100°C.

Un échantillon contrôle est traité de façon identique mais en absence de protéinase K pour pouvoir évaluer la spécificité de la réaction.

6. Séparation des protéines par SDS-PAGE et immunodétection

Les échantillons protéiques sont séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 8% (pour ExlA) ou 15% (pour Vfr) en présence de SDS (dodécylsulfate de sodium ; [Tableau 6](#)) ou sur un gel pré-coulé avec un gradient de polyacrylamide 4-20% (Mini-PROTEAN TGX, Biorad ; pour RsmA, les tests d'accessibilité à la protéinase K et le fractionnement cellulaire), dans du tampon de migration Laemmli (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycine, 0,1% SDS, pH 8,3). Tous les échantillons sont auparavant dénaturés par chauffage 10 min à 100°C. Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (Polyfluorure de vinylidène) 0.2 μ m (Amersham) préalablement activée quelques minutes dans l'éthanol 100% puis rincée dans du tampon de transfert (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 0,1% SDS, 20% éthanol, pH 8,3). Le transfert est effectué pendant 1h30 dans une cuve de transfert Invitrogen Nove XCell SureLoc Mini-Cell à 120 mA.

Après lavage en tampon PBS 1X-0,1% Tween 20 (PBS-T), la membrane est incubée pendant 45 min dans du tampon de blocage PBS-T-5% lait (p/v) pour saturer les sites aspécifiques. Après lavages en PBS-T, la membrane est incubée 1h avec l'anticorps primaire, avant d'être à nouveau lavée en PBS-T puis incubée avec l'anticorps secondaire conjugué à l'HRP (*Horseradish peroxidase*) ([Tableau 7](#) ; pour ExlA, un mélange d'un anticorps anti-extrémité C-terminale et un anticorps anti-ExlA délétée de son extrémité C-terminale a été utilisé). Après un

lavage final, la révélation est effectuée par réaction de chimioluminescence en utilisant le kit Luminata Classico Western HRP substrate (Millipore) et l'appareil Chemidoc MP (Biorad). Le poids moléculaire des bandes est déterminé spécifiquement grâce à la migration de marqueurs de poids moléculaires connus (Pre-Stained Protein Ladder Plus, Euromedex). Toutes les étapes d'incubation sont réalisées à température ambiante et sous légère agitation.

	8% (séparation)	15% (séparation)	Concentration
H ₂ O	4,6 mL	2,3 mL	3,4 mL
30% Acrylamide/bis-acrylamide (37,5 :1)	2,7 mL	5 mL	850 µL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 (séparation) ou 6,8 (concentration)	2,5 mL	2,5 mL	625 µL
SDS 10%	100 µL	100 µL	50 µL
APS 10%	100 µL	100 µL	50 µL
TEMED	8 µL	8 µL	5 µL

Tableau 6 : Composition des SDS-PAGE 8 et 15% utilisés au cours de cette étude.

Protéine cible	Taille (kDa)	Dilution Ac	Ac secondaire	Référence
CdrA (polyclonal)	220	2000 ^e	Anti-lapin 50000	M. Parsek, Washington - Etats-Unis (Borlee <i>et al.</i> , 2010)
ExlA (polyclonal)	170	1000 ^e (chaque Ac)	Anti-lapin 50000	(Basso <i>et al.</i> , 2017a; Berry <i>et al.</i> , 2018)
ExlA (monoclonal)	170	500 ^e	Anti-souris 50000	Laboratoire (Basso <i>et al.</i> , 2017a; Berry <i>et al.</i> , 2018)
Opr86 (polyclonal)		2000 ^e	Anti-lapin 50000	(Sall <i>et al.</i> , 2014)
EFTu (monoclonal)	43	20000 ^e	Anti-souris 50000	Hycult Biotech
FliC (polyclonal)	39	1000 ^e	Anti-lapin 50000	(Berry <i>et al.</i> , 2018)
Vfr (polyclonal)	24	25000 ^e	Anti-lapin 50000	K. Forest, Madison - Etats-Unis
DsbA (polyclonal)	23	20000 ^e	Anti-lapin 50000	R. Voulhoux, Marseille - France
RsmA (polyclonal)	7	10000 ^e	Anti-lapin 50000	S. Lory, Boston - Etats-Unis

Tableau 7 : Liste des anticorps utilisés dans cette étude.

Tous les anticorps ont servi pour les western-blots, sauf l'anticorps monoclonal anti-ExlA qui a été utilisé pour le marquage immunofluorescent.

ANNEXES

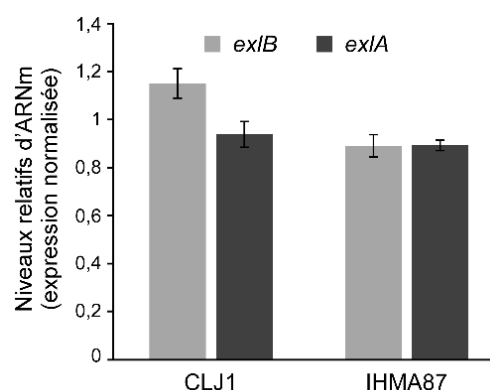
1. Figure et Tableaux

Etude	Nombre de génomes	Critères de génome « cœur »	Nombre de groupes	Nombre de souches de type PA7 (groupes 3 et 5)
Stewart et al., 2014	55	Présent sur 100% des souches	3	2
Freschi et al., 2015	389	Présent sur 100% des souches	3	13
Vincent et al., 2017	1394	Présent sur 95% des souches	3	Non renseigné
Freschi et al., 2019	1311	Présent sur 100% des souches	5	14 (Gr. 3) + 7 (Gr. 5)

Annexe 1 : Tableau comparatif des principales informations concernant les études référençant les différents groupes de *P. aeruginosa*.

Annexe 2 : Les souches CLJ1 et IHMA87 ont les mêmes niveaux en ARNm ExlB et ExlA.

Niveaux relatifs en ARNm ExlB et ExlA des souches CLJ1 et IHMA87 cultivées en LB jusqu'à $DO_{600}=1$. Les expériences ont été réalisées en triplicats et les barres d'erreur l'erreur type sur la moyenne.



PA01	PA7	IHMA87	Domaines		Identité	Prédiction HMMER	
			di-GMPc	Autres		Espèce	Fonction
PA1181 YegE	PSPA7_4198	RS08045	EAL-GGDEF	PAS, MASE	48%	<i>Ralstonia pickettii</i>	DGC
PA2072	PSPA7_3211	RS15740	EAL-GGDEF	CHASE	52%	<i>Pseudomonas sp. HMSC08G10</i>	Histidine Kinase
					51%	<i>Pseudomonas japonica</i>	Protéine à domaines GGDEF/EAL/sensoriel
PA5442	PSPA7_6232	RS16610	EAL-GGDEF	PAS	68%	<i>Pseudomonas</i>	Protéine à domaines GGDEF/EAL/sensoriel
PA0861 RbdA	PSPA7_4658	RS13240	EAL-GGDEF	PAS	68%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Protéine à domaines GGDEF/EAL/sensoriel
PA0847	PSPA7_4673	RS13310	GGDEF	CHASE, HAMP, PAS	56%	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	Protéine à domaines GGDEF/sensoriel
PA0575	PSPA7_0717	RS09000	EAL-GGDEF	PAS, SBP	68%	<i>Pseudomonas resinovorans</i>	Protéine à domaines GGDEF/EAL/sensoriel
PA0285	PSPA7_0376	RS06515	EAL-GGDEF	PAS	66%	<i>Pseudomonas</i>	Protéine à domaines GGDEF/EAL/sensoriel

Annexe 3 : Liste des 7 protéines susceptibles d'être des effecteurs membranaires du di-GMPc.

La nomenclature utilisée est celle de la database pseudomonas.com. Les domaines di-GMPc ont été identifiés par Chou et Galperin (2016) et les domaines autres par le logiciel HMMER. Ce logiciel a également donné une prédiction de fonction basée sur l'identité de la séquence protéique avec celles de protéines à fonction connue.

2. Posters

Annexe 4 : Poster présenté à la Journée Annuelle des Doctorants – Juin 2017 (Grenoble)

cAMP and Vfr control Exolysin expression and cytotoxicity of PA7-like *Pseudomonas aeruginosa*

Alice Berry¹, Julian Trouillon¹, Kook Han², Mylène Robert-Genthon¹, Michel Ragno¹, Stephen Lory², Ina Attrée¹ and Sylvie Elsen¹

¹Biology of Cancer and Infection, U1036 INSERM, CEA, University of Grenoble Alpes, ERL5261 CNRS, Grenoble, France.

²Department of Microbiology and Immunobiology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA.

Contact: alice.berry@cea.fr

Introduction

P. aeruginosa is a major human opportunistic pathogen which is highly resistant to antibiotics and a frequent cause of nosocomial infections. The difficulties to control *P. aeruginosa* infections rely on its high adaptability to environment and nutrients, and its numerous virulence factors that are regulated by complex regulatory networks.

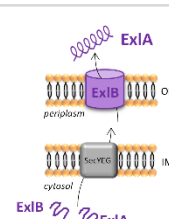
Outliers PA7-like strains devoid of the *P. aeruginosa* major virulence factor, the Type 3 Secretion System, have developed a virulence mechanism based on a Type 5 Secretion System: this T5SS named ExlBA leads to eukaryotic cell membrane disruption inducing cell death. It is encoded by two contiguous genes, *exlB* and *exlA*, predicted to form an operon.

The aim of my PhD is to understand the regulation of this newly identified virulence factor.

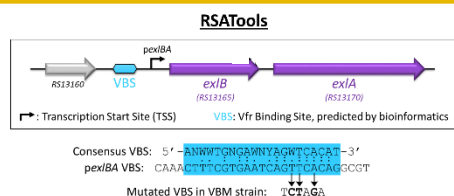
Bioinformatics analysis of the *exlBA* region identified a putative Vfr binding site (VBS) centered at - 87 bases upstream from the transcriptional start site of *exlBA*, identified by 5' RACE PCR.

In this study, we investigated the role of the transcriptional regulator Vfr in ExlBA regulation.

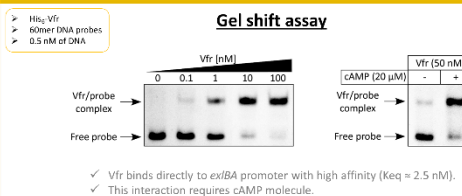
For this, we mainly worked on IHMA87 strain, a cytotoxic urinary tract isolate that is our lab PA7-like strain model.



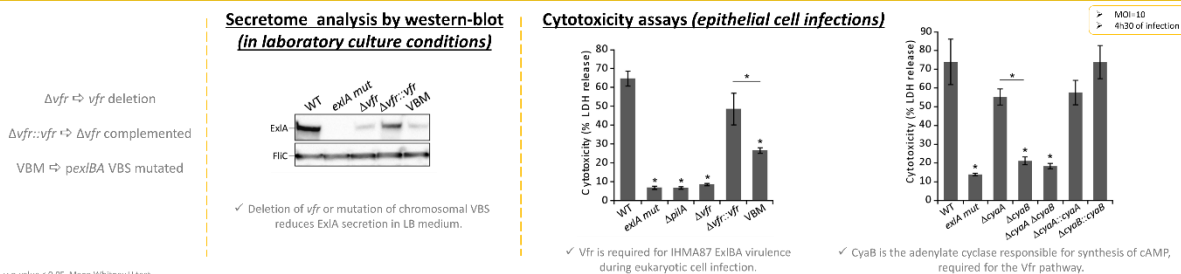
A putative Vfr binding site upstream of *exlBA*.



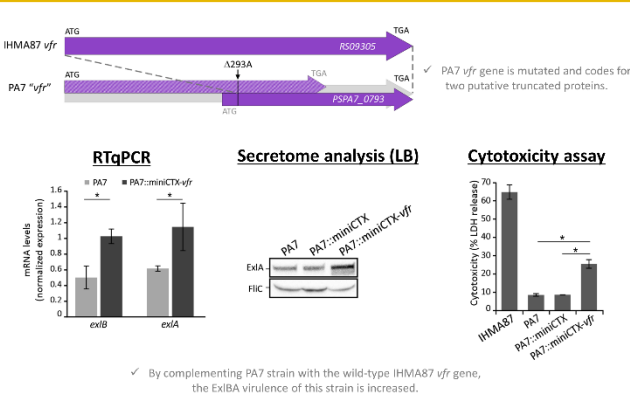
Vfr interacts with *exlBA* promoter.



Vfr regulates positively *exlBA* genes expression to activate ExlA-dependent cytotoxicity of IHMA87 strain.

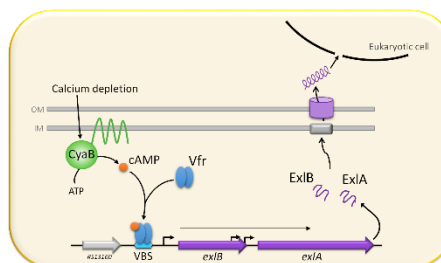


A natural mutation of *vfr* gene in the reference strain PA7 explains its reduced cytotoxicity.



Conclusion

We established that **CyaB-cAMP/Vfr pathway**, known to regulate acute virulence factors in classical *P. aeruginosa* strains, controls **virulence of PA7-like strains through direct transcriptional regulation of *exlBA***.



In prospects, some promising putative ExlBA regulators:

- cdiGMP, the key second messenger
- PqsR, a Quorum Sensing transcription factor
- RsmA, a post-transcriptional regulator (RNA binding protein)

Annexe 5 : Poster présenté lors du congrès « International Conference on Pseudomonas » - Septembre 2017 (Liverpool, Angleterre)

cAMP and Vfr control Exolysin expression and cytotoxicity of PA7-like *Pseudomonas aeruginosa*

Alice Berry,¹ Julian Trouillon,¹ Kook Han,² Mylène Robert-Genthon,¹ Michel Ragno,¹ Stephen Lory,² Ina Attrée¹ and Sylvie Elsen¹

¹Biology of Cancer and Infection, U1036 INSERM, CEA, University of Grenoble Alpes, ERL5261 CNRS, Grenoble, France.

²Department of Microbiology and Immunobiology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA.

Contact: alice.berry@cea.fr

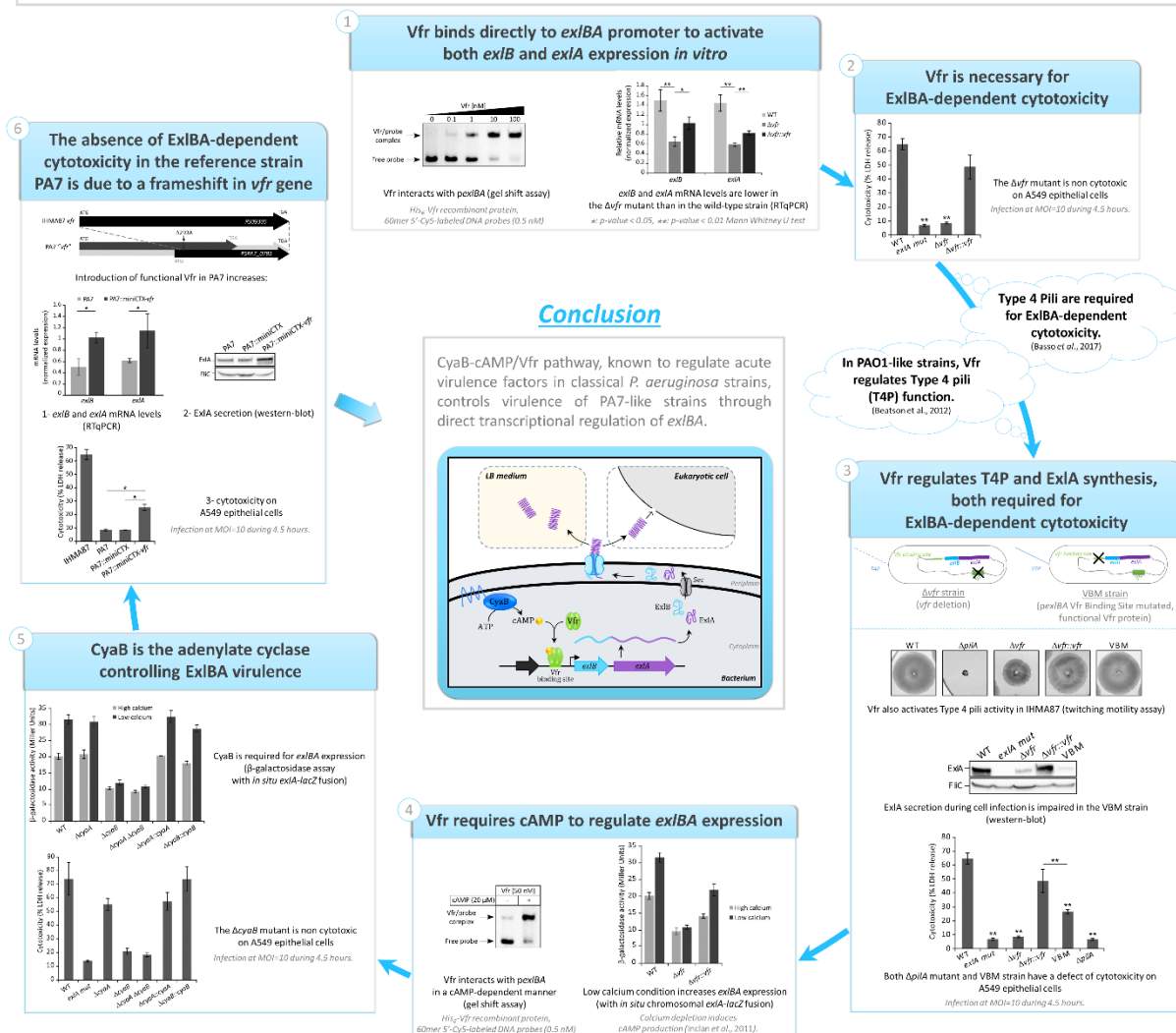
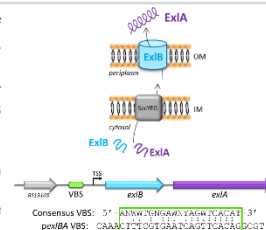
Introduction

Pseudomonas aeruginosa, a major human opportunistic pathogen, is highly resistant to antibiotics and a frequent cause of nosocomial infections. The difficulties to control *P. aeruginosa* infections rely on its high adaptability to environment and nutrients, and its numerous virulence factors that are controlled by complex regulatory networks.

PA7-like taxonomic outliers lack the Type 3 Secretion System (T3SS) and employ the T5SS composed by ExlB and ExlA, for eukaryotic cell membrane disruption leading to cell death (Elsen *et al.*, 2014). ExlB and ExlA are encoded by two contiguous genes predicted to form an operon (pseudomonas.com; Winsor *et al.*, 2016).

Bioinformatics analysis (RSAT) of the *exlBA* region identified a putative Vfr binding site (VBS) centered at -87 bases upstream from the transcriptional start site (TSS) of *exlBA*, identified by 5'RACE PCR.

In this study, we investigated the role of the transcriptional regulator Vfr in ExlBA regulation of the cytotoxic urinary tract isolate IHMA87.



Ragno M, Chen S, Reboulet E, Golovkine G, Bouillet S, Huber P, Lory S, Faehy E, Attrée I, (2017) Pseudomonas aeruginosa Type 5 Secretion System and Type III Pilus Cooperate to Induce Host Cell Lysis.

Beaton SA, Whitehead CB, Sargenti JL, Lemaire RC, Mattick JS. (2012) Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in Pseudomonas aeruginosa.

Elsen S, Huber P, Bouillet S, Couste Y, Fournier P, Dubois Y, Timat JF, Maurin M, Attrée I. (2014) A type 5 secretion negative clinical strain of Pseudomonas aeruginosa employs a two-partner secreted exolysin to reduce hemorrhagic pneumonia.

Infante Y, Haseby M, Fager IN. (2011) First *exlA* and *exlB* cAMP synthesis in Pseudomonas aeruginosa.

Winsor GL, Grifflato EJ, Lory S, Dalton BK, Shuy JK, Brinkman FS. (2016) Enhanced annotations and features for comparing thousands of Pseudomonas genomes in the Pseudomonas genome database.

3. Communications Orales

Annexe 6 : Présentation au « GRREMI » (Groupe Régional de Recherche en Microbiologie des Infections) – Décembre 2017 (Villeurbanne).

cAMP and Vfr control Exolysin expression and cytotoxicity of PA7-like *Pseudomonas aeruginosa*

Alice Berry,¹ Kook Han,² Julian Trouillon,¹ Mylène Robert-Genthon,¹ Michel Ragno,¹ Stephen Lory,² Ina Attrée¹ and Sylvie Elsen¹

¹Biology of Cancer and Infection, U1036 INSERM, CEA, University of Grenoble Alpes, ERL5261 CNRS, Grenoble, France.

²Department of Microbiology and Immunobiology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA.

Pseudomonas aeruginosa PA7 clonal outliers lack the Type 3 Secretion System (T3SS) and employ T5SS ExlB-ExlA for host cell membrane disruption and virulence. Here we investigated the regulation of ExlB-ExlA expression.

Bioinformatics analysis of the region upstream of the *exlBA* transcriptional start site identified a putative binding site for the Virulence Factor Regulator, Vfr referred to as the Vfr Binding Site, VBS. The specific binding of Vfr to VBS in the *exlBA* promoter was assessed by EMSA. The effect of *vfr* deletion and chromosomal mutation of VBS on *exlB* and *exlA* expression was investigated by RT-qPCR and β -galactosidase activity using a *lacZ* reporter construct. The impact of Vfr on ExlA secretion and bacterial toxicity towards epithelial cells was investigated by western-blot and LDH release assay.

In our studies, we demonstrated that Vfr binds directly to *exlBA* promoter with high affinity and this interaction requires cAMP molecule. We provided evidence that deletion of *vfr* or mutation of chromosomal VBS reduced *exlBA* expression and that Vfr controls ExlA and Type 4 Pili synthesis, both being required for cytotoxicity. The main provider of cAMP, both in laboratory culture conditions or upon host cell infection, is the adenylate cyclase, CyaB. Finally, we discovered that the *vfr* gene in the reference strain PA7 is mutated, explaining strain's reduced cytotoxicity.

In conclusion, we established that CyaB-cAMP/Vfr pathway, known to regulate acute virulence factors in classical *P. aeruginosa* strains, controls virulence of PA7-like strains through direct transcriptional regulation of *exlBA* encoding the pore-forming toxin, Exolysin.

Annexe 7 : Présentation au Séminaire Jeune Chercheur de l'Institut – Octobre 2018 (Grenoble).**Regulation of ExlBA,
a major virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa* outliers strains**

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen responsible for nosocomial diseases and ranked as a priority for the development of new treatment by the World Health Organization. Its most aggressive virulence factor, associated with severe infections, is the Type III Secretion System (T3SS). However, *P. aeruginosa* taxonomic outliers lack this system and employ the novel T5SS ExlBA for host cell membrane disruption and virulence, through the pore-forming activity of the toxin ExlA.

Our work aims to investigate the regulation of the new virulence factor ExlBA. We first established that cAMP/Vfr pathway controls virulence of *exlBA*+ strains. We provided evidence that, upon interaction with the secondary messenger cAMP, Vfr binds directly to *exlBA* promoter with high affinity to activate gene transcription. Furthermore, we discovered that c-di-GMP inhibits ExlA secretion, to modulate strain toxicity, by a mechanism we are currently studying.

4. Articles

Annexe 8 : Article présentant la régulation d'*exlBA* par l'AMPc et Vfr, publié en Juin 2018 dans le journal « Journal of Bacteriology ».



cAMP and Vfr Control Exolysin Expression and Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* Taxonomic Outliers

Alice Berry,^a Kook Han,^b Julian Trouillon,^a Mylène Robert-Genthon,^a Michel Ragno,^a Stephen Lory,^b Ina Attrée,^a Sylvie Elsen^a

^aBiology of Cancer and Infection, U1036 INSERM, CEA, University of Grenoble Alpes, ERL5261 CNRS, Grenoble, France

^bDepartment of Microbiology and Immunobiology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

ABSTRACT The two-partner secretion system ExlBA, expressed by strains of *Pseudomonas aeruginosa* belonging to the PA7 group, induces hemorrhage in lungs due to disruption of host cellular membranes. Here we demonstrate that the *exlBA* genes are controlled by a pathway consisting of cAMP and the virulence factor regulator (Vfr). Upon interaction with cAMP, Vfr binds directly to the *exlBA* promoter with high affinity (equilibrium binding constant [K_{eq}] of ≈ 2.5 nM). The *exlB* and *exlA* expression was diminished in the Vfr-negative mutant and upregulated with increased intracellular cAMP levels. The Vfr binding sequence in the *exlBA* promoter was mutated *in situ*, resulting in reduced cytotoxicity of the mutant, showing that Vfr is required for the *exlBA* expression during intoxication of epithelial cells. Vfr also regulates function of type 4 pili previously shown to facilitate ExlA activity on epithelial cells, which indicates that the cAMP/Vfr pathway coordinates these two factors needed for full cytotoxicity. As in most *P. aeruginosa* strains, the adenylate cyclase CyaB is the main provider of cAMP for Vfr regulation during both *in vitro* growth and eukaryotic cell infection. We discovered that the absence of functional Vfr in the reference strain PA7 is caused by a frameshift in the gene and accounts for its reduced cytotoxicity, revealing the conservation of ExlBA control by the CyaB-cAMP/Vfr pathway in *P. aeruginosa* taxonomic outliers.

IMPORTANCE The human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* provokes severe acute and chronic human infections associated with defined sets of virulence factors. The main virulence determinant of *P. aeruginosa* taxonomic outliers is exolysin, a membrane-disrupting pore-forming toxin belonging to the two-partner secretion system ExlBA. In this work, we demonstrate that the conserved CyaB-cAMP/Vfr pathway controls cytotoxicity of outlier clinical strains through direct transcriptional activation of the *exlBA* operon. Therefore, despite the fact that the type III secretion system and exolysin are mutually exclusive in classical and outlier strains, respectively, these two major virulence determinants share similarities in their mechanisms of regulation.

KEYWORDS *Pseudomonas aeruginosa*, Vfr, cAMP, gene regulation, TPS, exolysin, PA7 group, virulence, cyclic AMP

Bacterial virulence factors are tightly regulated by complex regulatory networks integrating multiple stimuli to ensure their synthesis only when required (1). *Pseudomonas aeruginosa*, a major inhabitant of various environmental reservoirs, is also an important human opportunistic pathogen and, consequently, a frequently used model for studying virulence gene regulation. Its exceptional regulatory complexity was suggested from the 6.3-Mb genome of the reference strain PAO1, containing 5,570 genes with roughly 12% of them devoted to regulation (2–4). Additionally, more than

Received 6 March 2018 Accepted 4 April 2018

Accepted manuscript posted online 9 April 2018

Citation Berry A, Han K, Trouillon J, Robert-Genthon M, Ragno M, Lory S, Attrée I, Elsen S. 2018. cAMP and Vfr control exolysin expression and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* taxonomic outliers. *J Bacteriol* 200:e00135-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00135-18>.

Editor George O'Toole, Geisel School of Medicine at Dartmouth

Copyright © 2018 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Sylvie Elsen, sylvie.elsen@cea.fr.

500 putative noncoding RNAs carrying potential regulatory functions were found in different strains (5–7) further increasing the complexity of regulatory networks used by this versatile microorganism. Quorum sensing (QS [with four interconnected systems: Las, Rhl, PQS, and IQS]), the two-component regulatory systems (comprising around 60 of both histidine kinases and response regulators and 3 Hpt proteins), the Gac/Rsm system (with regulatory RNAs RsmY and RsmZ negatively controlling the activity of the posttranscriptional regulator RsmA), and the 2 second messengers (cyclic AMP [cAMP] and cyclic di-GMP [c-di-GMP]) (1, 8–10) are among the well-characterized networks controlling virulence. These regulatory pathways govern the reciprocal expression of the virulence factors, depending on the *P. aeruginosa* “lifestyle.” During planktonic growth, the bacteria express factors involved in acute virulence, such as pili, flagella, and toxins, and most of these factors are under the positive control of QS and cAMP, an allosteric activator of the virulence factor regulator, Vfr (11). In contrast, other factors like exopolysaccharides and adhesins are synthesized under growth in a structured and multicellular community called “biofilm.” A high c-di-GMP level is commonly associated with this mode of life in several pathogenic bacteria, even if only a few direct targets have been identified up to now (12, 13). These regulatory circuits were mainly studied in most common laboratory strains (PAO1, PAK, and PA14), and they are encoded within their core genome. However, there are some strain variations that have been reported, such as strains with point mutations or deletions in key regulatory genes affecting their virulence. For instance, the defective genes *mexS* in PAK, *ladS* in PA14, and *gacS* in cystic fibrosis (CF) isolate CHA are responsible for overexpression of genes encoding the type 3 secretion system (T3SS), the major virulence factor of *P. aeruginosa* (14–16).

The existence of *P. aeruginosa* taxonomic outliers with the fully sequenced PA7 strain as the representative was recently reported (17–22). They constitute one of the three major groups of *P. aeruginosa* strains defined from phylogenetic analysis of core genome sequences (23). The PA7 strain exhibits low sequence identity of its core genome to the “classical” strains PAO1 (group 1) and PA14 (group 2) (95% instead of the >99% usually found) and possesses numerous specific regions of genome plasticity (RGPs) encoding notably a third specific type 2 secretion system, Txc (17, 24). An unexpected but important feature of PA7 is the absence of the *toxA* gene, as well as the absence of the determinants for the entire T3SS apparatus and all T3SS-exported toxins (17). While characterizing the PA7-like strain CLJ1, isolated from a patient suffering from chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and hemorrhagic pneumonia, we discovered a new type 5 secretion system (T5SS) responsible for this strain’s pathogenicity. This T5SS is composed of two proteins—ExlB and ExlA. ExlB is the outer membrane protein that facilitates the secretion of the pore-forming protein exolysin (ExlA) responsible for membrane permeabilization and cell death (19, 21, 25). Since 2010, approximately 30 additional PA7-like strains have been reported in publications, and some of these were studied in more detail. We analyzed the phenotypes of the majority of *exlA*⁺ PA7-like strains and their ability to produce ExlA. Interestingly, different levels of ExlA secretion were observed among these strains leading to variations in the extent of cytotoxicity and pathogenicity in mice (21). This observation strongly suggested that ExlB and ExlA synthesis is controlled by as yet unidentified regulatory pathways.

With this objective in mind, we undertook to analyze the regulation of *exlBA* expression in strain IHMA879472 (IHMA87), a PA7-like strain isolated recently from a urinary infection. This strain is able to secrete ExlA, exhibits high ExlA-dependent cytotoxicity on different eukaryotic cell lines, and can be genetically manipulated (21, 25). We found that *exlBA* is under the control of cAMP and its cognate receptor Vfr, which regulate the expression of acute virulence factors in the classical *P. aeruginosa* strains. We further demonstrate that the absence of a functional Vfr in PA7 accounts for its reduced cytotoxicity.

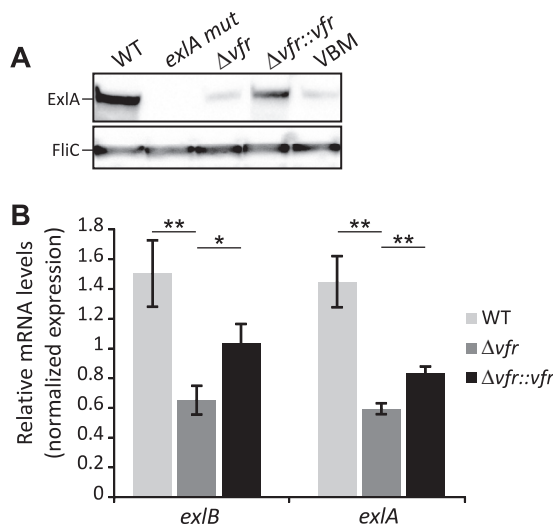


FIG 2 Vfr regulates ExlA secretion and *exlBA* expression. (A) The secretion of ExlA by the indicated strains grown in LB medium. The VBM strain carries a mutation in the VBS present in the *exlBA* promoter. Immunoblots of 100-fold-concentrated secretomes revealing the ExlA protein and FliC, used as a loading control. (B) RT-qPCR analysis of *exlB* and *exlA* relative expression in the wild-type (WT), the *vfr* mutant, and complemented strains grown in LB medium. The *rpoD* gene was used as a reference. The experiments were performed in triplicate, and the error bars indicate the standard errors of the means. The *P* value was determined using the Mann-Whitney U test and is indicated by * ($P < 0.05$) or ** ($P < 0.01$) when the difference between the mutant strain and the wild-type or complemented strains is statistically supported.

restored upon complementation (Fig. 2B; see Fig. S2 in the supplemental material). These results verify that Vfr is required for *exlBA* expression.

Vfr binds in vitro directly to *exlBA* promoter. To test the ability of Vfr to directly interact with the *exlBA* promoter (*exlBAp*), we performed electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) using recombinant His-tagged Vfr protein. Figure 3A illustrates that Vfr binds with a high affinity to the 60-mer Cy5-labeled *exlBAp* fragment encompassing the putative binding site of Vfr, as revealed by the apparent equilibrium binding constant

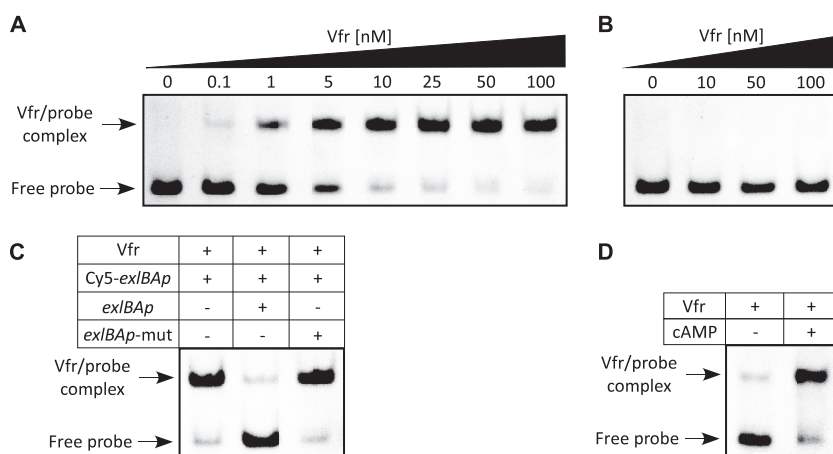


FIG 3 Vfr binds specifically to *exlBA* promoter in a cAMP-dependent manner. (A and B) The recombinant His₆-Vfr protein was incubated with 0.5 nM Cy5-labeled *exlBAp* probe (A) or the mutated *exlBAp*-mut probe (B) for 15 min before electrophoresis. Arrows indicate the positions of unbound free probes and Vfr-promoter probe complexes. The concentrations of Vfr used in the assay are also shown above each gel. (C) His₆-Vfr (50 nM) was incubated with 0.5 nM Cy5-*exlBAp* probe, and where indicated, a 200-fold excess of unlabeled wild-type or mutated probe was added to the reaction mixture prior to incubation. (D) His₆-Vfr (50 nM) was incubated with Cy5-*exlBAp* probe (0.5 nM) in the presence or absence of 20 μM cAMP in the binding buffer, as indicated. Note that in panels A, B, and C, cAMP (20 μM) was provided in the binding assay.

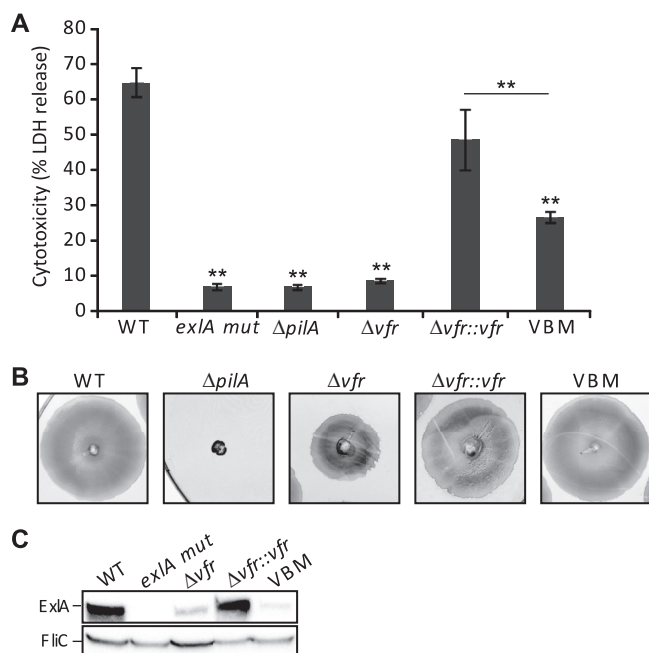


FIG 4 Vfr controls synthesis of TFP and ExlBA, and both are required for cytotoxicity. (A) ExlA-dependent cytotoxicity on A549 epithelial cells of the wild type (WT), various mutants, and the complemented strains. Cytotoxicity was measured after 4.5 h of incubation with the bacteria added at an MOI of 10. The experiments were performed in triplicate, and the bars indicate the standard deviations. The *P* value ($P < 0.01$) was determined using a Mann-Whitney U test and is indicated by ** when the difference between the WT strain and each mutant is statistically supported. (B) Twitching ability of the indicated strains after 48 h at 37°C. The twitching area was visualized following staining of the plates with Coomassie blue. (C) Analysis of ExlA secreted by the different strains after a 2-h infection of A549 cell monolayers. Proteins from cell culture medium were TCA precipitated and used in an immunoblot analysis with anti-ExlA and anti-FliC antibody probes. FliC was used as a loading control.

(K_{eq}) of approximately 2.5 nM. The binding specificity was demonstrated by observing that the electrophoretic mobility of a fragment (Cy5-*exlBAp mut*) with mutation (in boldface) in three conserved bases in the consensus (CTTTCGTAATCAGT**CTAGA**) (Fig. 1C) was not altered by Vfr, even at a high protein concentration (Fig. 3B). Moreover, Vfr binding to Cy5-*exlBAp* could be outcompeted with unlabeled probe containing the wild-type binding site but not with probe containing the mutated sequence (Fig. 3C). This clearly shows that the sequence present in *exlBA* promoter is a true Vfr binding site (VBS).

Inactivation of *vfr* affects both type 4 pilus function and ExlBA-dependent cytotoxicity. As ExlA leads to permeabilization of epithelial cell membranes and cell death (19, 25), we directly measured the impact of the *vfr* deletion on the cytotoxicity of the ExlA-producing strain IHMA87. The absence of Vfr strongly reduced the cytotoxicity of this strain toward A549 epithelial cells to a level similar to that observed with an ExlA-deficient strain (IHMA87 *exlA mut*). Additionally, the phenotype was restored to an almost wild-type level in the complemented strain (Fig. 4A).

Vfr is a global regulator and was shown to modulate the expression of several virulence factors in the PAO1- and PA14-like strains. For instance, Vfr regulates directly the transcription of the *fimS-algR* locus, with AlgR activating the expression of *fimU pilVWXYZ_{1,2E}*, whose products are required for type 4 pilus (TFP) synthesis (32–34). The VBS identified in the *fimS* promoter of PAO1 (31) is also present in the one of IHMA87 (28; www.pseudomonas.com), suggesting that the TFP regulation is conserved. The twitching motility that relies on TFP was impaired in IHMA87 Δvfr , although to a lesser extent than when the major TFP subunit PilA was absent (IHMA87 $\Delta pilA$). Introduction of a copy of *vfr* corrected the motility defect of the mutant strain (Fig. 4B).

The Vfr-dependent regulation of TFP is significant, because ExlA cytotoxicity is facilitated by functional TFP (25) (Fig. 4A). To distinguish the effect of Vfr on TFP from

the one on ExlBA during eukaryotic cell infection, we introduced the mutations in the VBS directly on the *exlBA* promoter in the chromosome by replacing the original VBS with the 3-base-mutated sequence (Fig. 1C) shown not to interact with Vfr in the EMSA (Fig. 3B and C). In this VBS-mutated strain (VBM), the ExlA secretion was reduced to a level similar to that found in the *vfr* mutant in both liquid medium (LB) (Fig. 2A) and during eukaryotic cell infection (Fig. 4C). This further confirms the direct regulation of *exlBA* expression by the transcriptional regulator. The VBM strain displayed a cytotoxic phenotype on epithelial cells intermediate between those observed for the wild-type strain and the Δvfr strain (Fig. 4A). Therefore, both the TFP and ExlBA are regulated by Vfr, and Vfr-dependent activation of *exlBA* expression during cell infection is required for full cytotoxicity.

***exlBA* expression requires cAMP.** Vfr controls gene expression in response to levels of the second messenger cAMP, as binding of the allosteric cAMP molecule increases its DNA-binding activity to target promoters (31, 35–37). However, Vfr regulation of the QS regulator-encoding *lasR* gene is cAMP independent (36). Using the EMSA, we have demonstrated that cAMP is required for *in vitro* binding of Vfr to the *exlBA* promoter, as the recombinant His₆-Vfr shifted the fluorescent probe only in the presence of the cyclic nucleotide (Fig. 3D). In *P. aeruginosa*, the cAMP levels can be modulated by calcium concentrations (38) and EGTA-induced calcium depletion of the medium has been shown to increase intracellular cAMP levels (33). We assessed the effect of different cAMP levels on *exlBA* expression *in vivo* by introducing the *lacZ* gene into *exlA* in the *vfr* mutant, its complemented version, and the strain with mutated VBS (VBM), creating transcriptional reporters, and then comparing their activities to that of the IHMA87 *exlA::lacZ* strain. When the calcium chelator EGTA was added to the medium, we observed increased β -galactosidase activity in the wild-type strain (Fig. 5A). This effect was abolished in the *vfr* mutant, in which *exlBA* expression was decreased and became “blind” to EGTA addition, but was restored in the complemented strain. As expected, the β -galactosidase activities in the latter strain were lower because of the reduced amount of Vfr in the complemented strain compared to the wild-type strain (Fig. S2). Moreover, the VBM mutant carrying mutation of the VBS in *exlBA* promoter exhibited *exlBA* expression similar to that seen in the *vfr* mutant (Fig. 5A). These data further confirmed that the expression of *exlBA* *in vivo* requires both Vfr and cAMP since cAMP is needed to promote Vfr binding.

CyaB is the adenylate cyclase controlling ExlA activity. Production and degradation of intracellular cAMP are tightly controlled by adenylate cyclases (ACs) and phosphodiesterases (PDEs) to ensure homeostasis. In PAO1, three ACs have been identified: CyaA, the cytosolic class I AC; CyaB, the membrane-bound class III AC; and ExoY, the exotoxin secreted by the T3SS and active only in eukaryotic cells (reviewed in reference 39). Examination of the IHMA87 genome identified *cyaA* and *cyaB* genes, while it lacked *exoY*. This is in accordance with the previously noted absence of the genes for the T3SS and the effectors—a distinctive feature of the PA7-like strains (17, 22).

To address which AC provides to Vfr the cAMP molecule required for *exlBA* expression, we created individual deletions in *cyaA* and *cyaB* in the IHMA87 background and combined the two mutations in a single strain. We then created the *exlA-lacZ* transcriptional fusion in the mutants and assessed the effect of the *cya* mutations on *exlA-lacZ* expression. Only the absence of *cyaB* impaired the activation of *exlBA* expression under the conditions of calcium limitation (Fig. 5A). Moreover, inactivation of both *cya* genes did not reduce further the promoter activity and reintroduction of the *cyaB* copy restored the wild-type phenotype of IHMA87 $\Delta cyaB$.

We also examined the ExlA-dependent cytotoxicity on epithelial A549 cells of the different mutants to determine which AC might affect the cAMP/Vfr pathway during host cell infection. As shown in Fig. 5B, solely the absence of *cyaB* affected strongly the cytotoxicity of IHMA87 to levels similar to that observed with IHMA87 Δvfr . Inactivation of both genes did not further decrease cytotoxicity, and introduction of a copy of the

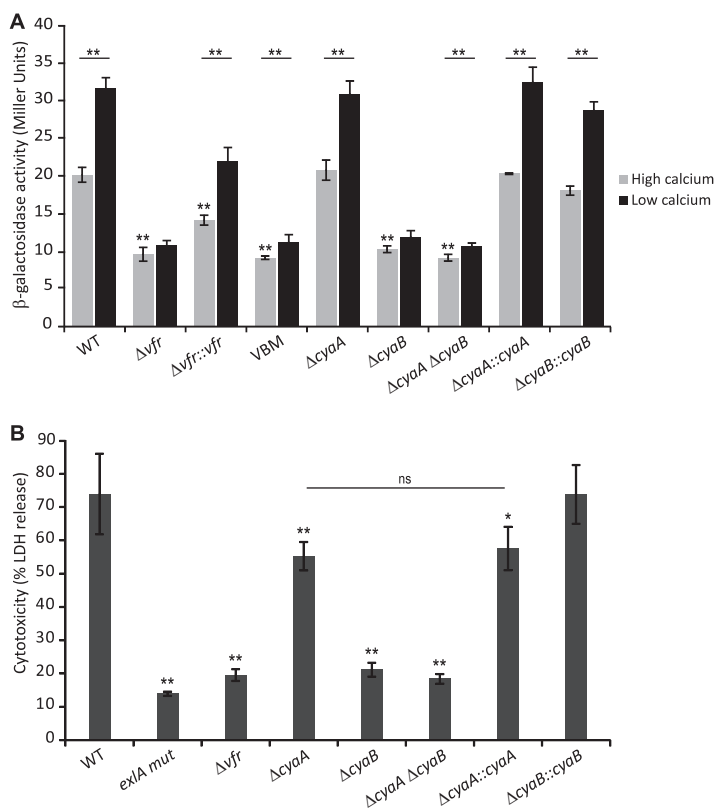


FIG 5 Vfr controls *exlBA* expression in a cAMP-dependent manner. (A) β -Galactosidase activities of the indicated wild-type (WT), mutant, and complemented strains carrying a chromosomal *exlA-lacZ* transcriptional fusion. Strains were grown in LB medium supplemented with CaCl_2 (high-calcium condition) or EGTA- MgCl_2 (low-calcium condition) at 37°C to an OD_{600} of 1.5. (B) ExlA-dependent cytotoxicity on A549 epithelial cells of the indicated wild-type (WT), *vfr*, *cyaA*, and/or *cyaB* mutant, and corresponding complemented strains measured after 4.5 h of infection (MOI of 10). The experiments were performed in triplicate, and the error bars indicate the standard deviations. The *P* value was determined using Mann-Whitney U test and is indicated above the error bars by * ($P < 0.05$) or ** ($P < 0.01$) when the difference from the wild-type strain is statistically supported. In panel A, the asterisks above the horizontal line compare each strain under the two different growth conditions. Please note that in panel B, while the $\Delta cyaA$ mutant seems slightly less cytotoxic than the wild-type strain, its phenotype is not complemented (ns, not supported by statistics) and is probably due to genetic manipulation.

cyaB gene into the IHMA87 $\Delta cyaB$ strain reversed the cytotoxicity to wild-type levels (Fig. 5B). Therefore, in IHMA87 the expression of *exlBA* relies on the secondary messenger cAMP produced by CyaB, when grown under laboratory conditions and during the interaction with mammalian cells.

The absence of ExlBA-dependent cytotoxicity in PA7 is due to a frameshift in the *vfr* gene. We recently analyzed several phenotypes of PA7-like strains, including cytotoxicity on various cell types and different types of motility (21). Compared to the ExlA-producing strains IHMA87 and CLJ1 (19), the reference PA7 strain secreted negligible amounts of ExlA *in vitro*, was poorly cytotoxic toward eukaryotic cells, and was devoid of TFP-dependent twitching motility (21). All these traits being consistent with the phenotypes of the IHMA87 Δvfr mutant, we wondered whether Vfr synthesis or function was affected in PA7. We first assessed the amount of Vfr in the PA7 strain by immunoblotting and then extended our analysis to all the PA7-like strains from our collection (21). We observed different Vfr levels in cells grown in calcium limiting medium. For example, we detected large amounts in CLJ1 and IHMA87 and smaller amounts in PA70 and IHMA567230, and the protein was absent from PA7 (Fig. 6A).

The comparison of the *vfr* gene in PA7 (28; www.pseudomonas.com) to that of IHMA87 revealed the absence of the adenine 293, resulting in a frameshift that creates two putative overlapping ORFs. The first one encodes a 161-amino-acid (aa)-long

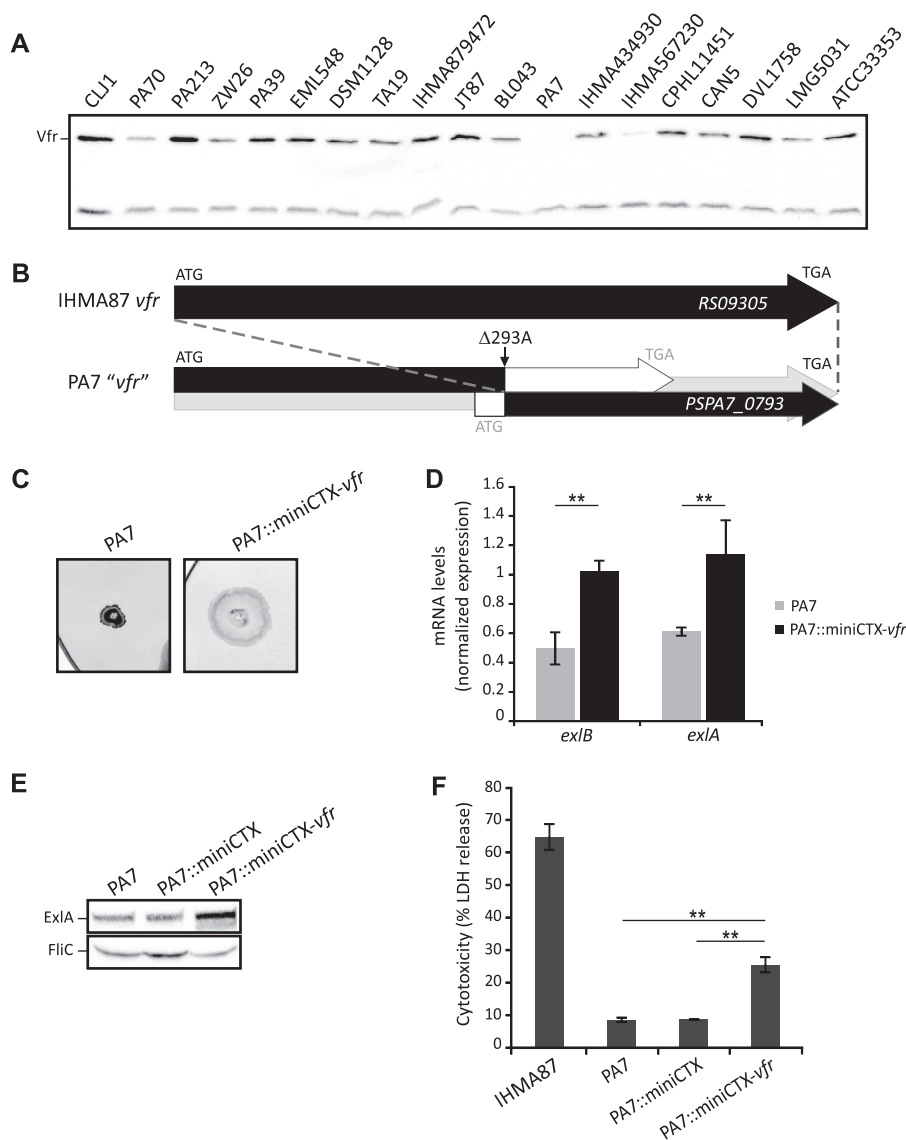


FIG 6 Natural mutation in *vfr* of *P. aeruginosa* PA7 impacts TFP synthesis and ExlA-dependent virulence. (A) Immunoblot of the cytosolic fraction of the different PA7-like strains analyzed in reference 21. The upper band corresponds to Vfr, while the lower band is a contaminant used as a loading control. (B) The *PSPA7_0793* gene is shorter than the corresponding *RS09305* gene of IHMA87 (AZPAE15042) (28; www.pseudomonas.com). Deletion of the adenine at 293 creates a frameshift that leads to two putative ORFs, as shown in the box. The 3' ORF corresponds to the annotation "*vfr*." (C) Twitching abilities of PA7 and PA7 containing the miniCTX-*vfr* plasmid integrated into the *att* chromosomal site strains. To visualize the twitching area, after 48 h of incubation at 37°C, the plates were stained with Coomassie blue. (D) Complementation of PA7 with *vfr* impacts mRNA levels of *exlB* and *exlA* genes, as assessed by RT-qPCR. The relative mRNA quantity of the PA7 strain compared to the PA7::miniCTX-*vfr* strain is shown. The experiments were performed in triplicate, and the error bars indicate the standard errors of the means. The Mann-Whitney U test was used to calculate the *P* values (**, *P* < 0.01). (E) Immunoblot analysis of ExlA secreted by the different PA7 strains grown in LB. FliC is used as a loading control. (F) ExlA-dependent cytotoxicity on A549 epithelial cells of IHMA87, PA7, and PA7 containing in the chromosome either the empty miniCTX1 plasmid or the miniCTX-*vfr* plasmid. Cytotoxicity was measured after 4.5 h of infection at an MOI of 10. The experiments were performed in triplicate, and the error bars indicate the standard deviations. The *P* value (*P* < 0.01), determined using Mann-Whitney U test, is indicated by ** when the difference between the PA7 strains is statistically supported.

protein consisting of N-terminal 98 aa identical to Vfr, and the other, annotated as *vfr* (*PSPA7_0793*), encodes a putative 118-aa-long protein translated from a wrong-start codon corresponding to the 116-aa C-terminal portion of Vfr (Fig. 6B). The base deletion in the PA7 *vfr* gene was confirmed by PCR amplification and resequencing.

In order to examine whether the phenotypes of PA7 were due to *vfr* inactivation or additional mutations, we introduced one copy of intact *vfr* into the PA7 chromosome and verified the production of Vfr in this complemented strain (Fig. S2). The PA7::miniCTX-*vfr* strain exhibited an increased ability to twitch (Fig. 6C) and higher *exlA* and *exlB* mRNA levels compared to the wild-type PA7 (Fig. 6D), thus producing higher ExlA secretion (Fig. 6E). The introduction of functional *vfr* in PA7 also led to the creation of a strain with increased cytotoxicity toward the A549 cells (Fig. 6F), demonstrating the effect of *vfr* expression on PA7 virulence. These results clearly show that the presence of a functional Vfr regulator is required for full cytotoxicity of PA7-like strains as seen in the other strains of this clade.

DISCUSSION

Since its discovery in 1994 (37), Vfr has emerged as an important global regulator of *P. aeruginosa* virulence. This transcriptional factor, which belongs to the cAMP receptor protein (CRP) family, affects directly or indirectly the expression of more than 200 genes, controlled either positively or negatively (33, 40). The virulence traits positively regulated by Vfr include the TFP, QS, exotoxin A, T2SS, and T3SS, among others. However, when overproduced, the Vfr protein can also impact negatively flagellar biosynthesis by inhibiting the synthesis of the major flagellar regulator FleQ. In this work, we extended the regulon of Vfr by demonstrating that it controls directly and positively the expression of the main virulence factor of the PA7-like strains, namely, the T5SS ExlBA. Therefore, the two major virulence determinants in *P. aeruginosa*, T3SS and ExlBA, are encoded by genes that are mutually excluded from the genomes of different *P. aeruginosa* groups (PAO1/PA14 versus PA7), but they share similarities in their mechanisms of action and regulation. Effectively, both systems require close host cell contact for translocation and action of their toxins, and the interaction is mediated by extracellular appendages, the *P. aeruginosa* TFP (25, 41). Furthermore, for full T3SS- and ExlA-dependent cytotoxicity, they both require CyaB, the main cAMP-producing enzyme, and the cAMP receptor Vfr (33; this work). While Vfr was known to control T3SS synthesis for over a decade (33), the underlying mechanism was deciphered only recently (42). Here, we demonstrated the cAMP-dependent binding of Vfr to the VBS identified in the *exlBA* promoter of PA7-like strains and its requirement for cytotoxicity toward eukaryotic cells. Deletions of *cyaB* and/or *vfr* in a classical T3SS-positive strain led to an attenuated phenotype with reduced colonization and dissemination in a mouse model of lung infection, mostly through downregulation of T3SS (43). Thus, we can infer the same cAMP/Vfr regulatory pathway requirement *in vivo* for the virulence of the PA7-like strains that relies on exolysin ExlA, supported by our previous observation that PA7 is avirulent in mice (19).

The *P. aeruginosa* T5bSS ExlBA is a new TPS found in strains of the PA7 group. TPSs are typically encoded by contiguous genes organized in a single operon, with the gene encoding the transporter preceding the sequence encoding the toxin (26). However, alternate gene organizations for other TPS-encoding genes have been described. For example, the *P. aeruginosa* PdtBA system is encoded by two noncontiguous genes transcribed in different transcriptional units, but they are coregulated (27). We showed that the *exlBA* genes are transcribed as a single transcriptional unit from the promoter controlled by Vfr. The *exlBA* expression is low when the IHMA87 strain is cultivated in rich liquid medium, as suggested by very low activity of a reporter *lacZ* fusion in the wild-type IHMA87 strain. This could reflect the poorly conserved -35 (TAACAA) and -10 (TAATCT) sequences that deviate from the consensus sequences (-35 TTGACA/ -10 TATAAT) but govern *exlBA* transcription (Fig. S1), suggesting that other factors besides Vfr might be required for an efficient transcription.

Vfr binding to its target promoters relies on VBS whose location relative to the TSSs determines the mechanism of transcriptional regulation. Vfr downregulates expression of few genes where the VBS overlaps the -10 sequence or is located just downstream of the TSS, as reported, respectively, for *fleQ* and one of the four *rhIR* promoters (40, 44). For them, Vfr binding probably reduces transcription initiation by impairing the RNA

polymerase recruitment. However, most genes are positively controlled by Vfr, the VBSs being located upstream of the TSS at variable distance. For instance, in *algD* far upstream (FUS) promoter, VBS is centered at bp -362.5 (31), while it is at bp -58 from the TSS at the *vfr* promoter (36). The VBSs can also overlap the -35 sequence, as reported for the *ptxR* T2 and *exsA* promoters (42, 45). Consequently, Vfr employs several mechanisms for RNA polymerase recruitment to promote gene expression, similar to what was observed for the CRP of *Escherichia coli*, with which it shares 67% sequence identity (37, 46, 47). With its VBS centered at around bp -97 , the *exlBA* promoter should belong to a class I CRP promoter type, whereby Vfr recruits RNA polymerase by interacting with the C-terminal domain of its α -subunit (α -CTD). The *in vitro* binding of Vfr on *exlBA* promoter occurs with a high affinity (K_{eq} of ≈ 2.5 nM), placing it in the top range of those previously reported for other target sequences of this regulator (36, 42). As for most genes, binding activity of Vfr depends on the cyclic nucleotide cAMP and factors affecting its cellular levels.

In the PA7 reference strain, two key regulatory genes, *vfr* and *pqsR* (*mvfR*), carry mutations and are inactivated. Although the base deletion within *vfr* was not identified in the original report (17), it is reminiscent of the annotated *pqsR* pseudogene resulting from the deletion of two consecutive bases, the guanidine and cytosine at positions 698/699 (28; www.pseudomonas.com). This *pqsR* mutation accounts for some phenotypic differences between PA7 and PAO1 (17), as the PQS system controls the expression of several virulence factors such as elastase, pyocyanin, and rhamnolipids (48). We demonstrated that the absence of Vfr also impacts PA7 virulence, particularly by reducing TFP and ExlBA synthesis, required for full cytotoxicity. The importance of the Vfr regulator in *P. aeruginosa* physiology and adaptation during chronic infection is highlighted by mutations in its gene commonly found among CF isolates (49). Loss of regulatory genes affecting virulence is a well-known means of reducing the aggressive phenotype of CF isolates and promotes chronic long-term infections (49, 50). Interestingly, spontaneous mutations in *vfr* were also observed in PAO1 after several cycles of static growth, leading to a secretion-defective and impaired-motility phenotype that could potentially benefit the bacterium under these conditions (51).

Recently we found that other *Pseudomonas* species, such as *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas protegens* and *Pseudomonas entomophila*, express ExlA-like toxins which are responsible for pyroptotic death of macrophages (52). Orthologs of *vfr* and *cyaB* genes are present in these species, inferring a common regulatory mechanism. Identification of the signaling events triggering cAMP synthesis upon host cell contact, as well as other regulatory circuits controlling ExlBA synthesis, will be the next steps toward understanding of the virulence exerted by *P. aeruginosa* taxonomic outliers.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions. The *P. aeruginosa* strains used in this study are described in Table 1. Bacteria were grown in lysogeny broth (LB) at 37°C with agitation. To assess the effect of calcium on *exlBA* expression, overnight cultures were diluted in LB to an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 0.1. When cultures reached an OD_{600} of 0.5, either 5 mM calcium (high-calcium condition) or 20 mM $MgCl_2$ -5 mM EGTA at pH 8.0 (low-calcium condition) was added, and growth was continued until the OD_{600} reached 1.0 to 1.5. For the introduction of plasmids into *P. aeruginosa*, strains were selected following mating with *E. coli* donors on LB plates supplemented with 25 μ g/ml irgasan. The following antibiotics were added when needed: 75 μ g/ml gentamicin (Gm) and 75 μ g/ml tetracycline (Tc).

Plasmids and genetic manipulation. The plasmids utilized in this study and the primers used for PCR are listed in Table 1 (and see Table S1 in the supplemental material). To generate *P. aeruginosa* deletion mutants, upstream and downstream flanking regions of *vfr*, *cyaA*, and *cyaB* were fused by the splicing by overlap extension PCR (SOE-PCR) procedure using the appropriate primer pairs (53). The resulting fragments of 873, 884, and 850 bp were cloned into the pCR-Blunt II-TOPO vector and then subcloned into the PstI-BamHI (for *vfr*) or HindIII-XhoI (for *cya*) sites of the pEXG2 plasmid to obtain the pEXG2-Mut-*vfr*, pEXG2-Mut-*cyaA*, and pEXG2-Mut-*cyaB* plasmids, respectively. Each wild-type gene with its own promoter region was amplified by PCR and sequenced. To complement the mutants, the DNA fragments containing the *cyaA* (3,385-bp) and *cyaB* (1,998-bp) genes were inserted into the SmaI site of the integrative vector miniCTX1 by sequence- and ligation-independent cloning (SLIC) (54), leading to miniCTX-*cyaA* and miniCTX-*cyaB*. The *vfr* fragment (1,220 bp) was cloned in the BamHI-HindIII sites of the plasmid, leading to miniCTX-comp-*vfr*. To create the transcriptional *exlA-lacZ* fusion, the upstream region of *exlA*, the *lacZ* gene, and the downstream region of *exlA* were amplified using the

TABLE 1 Bacterial strains and plasmids used in this work

Strain or plasmid	Genotype or relevant properties	Reference or source
Strains		
<i>P. aeruginosa</i>		
IHMA879472 (IHMA87)	Wild-type strain (urinary infection) ^a	58
IHMA87 <i>exlA</i> mut	IHMA87 with pEXG2 inserted into <i>exlA</i> gene (Gm ^r)	25
IHMA87 Δ <i>pilA</i>	IHMA87 with nonpolar <i>pilA</i> deletion	25
IHMA87 Δ <i>vfr</i>	IHMA87 with nonpolar <i>vfr</i> deletion	This work
IHMA87 Δ <i>vfr::vfr</i>	IHMA87 Δ <i>vfr</i> with miniCTX-comp- <i>vfr</i> (Tc ^r)	This work
IHMA87 VBM	IHMA87 carrying a mutation in the Vfr binding site upstream of <i>exlB</i> gene, in <i>exlBA</i> promoter	This work
IHMA87 Δ <i>cyaA</i>	IHMA87 with nonpolar <i>cyaA</i> deletion	This work
IHMA87 Δ <i>cyaA::cyaA</i>	IHMA87 Δ <i>cyaA</i> with miniCTX- <i>cyaA</i> (Tc ^r)	This work
IHMA87 Δ <i>cyaB</i>	IHMA87 with nonpolar <i>cyaB</i> deletion	This work
IHMA87 Δ <i>cyaB::cyaB</i>	IHMA87 Δ <i>cyaB</i> with miniCTX- <i>cyaB</i> (Tc ^r)	This work
IHMA87 Δ <i>cyaA</i> Δ <i>cyaB</i>	IHMA87 with nonpolar <i>cyaA</i> and <i>cyaB</i> deletion	This work
IHMA87 <i>exlA::lacZ</i>	IHMA87 with promoterless <i>lacZ</i> in <i>exlA</i>	This work
IHMA87 Δ <i>vfr</i> <i>exlA::lacZ</i>	IHMA87 Δ <i>vfr</i> with promoterless <i>lacZ</i> in <i>exlA</i>	This work
IHMA87 Δ <i>vfr::vfr</i> <i>exlA::lacZ</i>	IHMA87 Δ <i>vfr::vfr</i> with promoterless <i>lacZ</i> in <i>exlA</i>	This work
IHMA87 VBM <i>exlA::lacZ</i>	IHMA87 VBM with promoterless <i>lacZ</i> in <i>exlA</i>	This work
IHMA87 Δ <i>cyaA</i> <i>exlA::lacZ</i>	IHMA87 Δ <i>cyaA</i> with promoterless <i>lacZ</i> in <i>exlA</i>	This work
IHMA87 Δ <i>cyaA::cyaA</i> <i>exlA::lacZ</i>	IHMA87 Δ <i>cyaA::cyaA</i> with promoterless <i>lacZ</i> in <i>exlA</i>	This work
IHMA87 Δ <i>cyaB</i> <i>exlA::lacZ</i>	IHMA87 Δ <i>cyaB</i> with promoterless <i>lacZ</i> in <i>exlA</i>	This work
IHMA87 Δ <i>cyaB::cyaB</i> <i>exlA::lacZ</i>	IHMA87 Δ <i>cyaB::cyaB</i> with promoterless <i>lacZ</i> in <i>exlA</i>	This work
IHMA87 Δ <i>cyaA</i> Δ <i>cyaB</i> <i>exlA::lacZ</i>	IHMA87 Δ <i>cyaA</i> Δ <i>cyaB</i> with promoterless <i>lacZ</i> in <i>exlA</i>	This work
PA7	Wild-type strain (nonrespiratory infection)	17
PA7::miniCTX	PA7 with miniCTX1 empty vector (Tc ^r)	This work
PA7::miniCTX- <i>vfr</i>	PA7 with miniCTX-comp- <i>vfr</i> (Tc ^r)	This work
<i>E. coli</i>		
Top10	Chemically competent cells	Invitrogen
BL21 Star(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm rne131</i> (DE3)	Invitrogen
Plasmids		
pCR-Blunt II-TOPO	Commercial cloning vector (Kn ^r)	Invitrogen
pRK2013	Helper plasmid conjugative properties (Kn ^r)	59
pEXG2	Allelic exchange vector (Gm ^r)	60
pEXG2-Mut- <i>vfr</i>	pEXG2 carrying SOE-PCR fragment for deletion of <i>vfr</i>	This work
pEXG2-VBM	pEXG2 carrying SOE-PCR fragment for mutation of Vfr binding site in <i>pexlBA</i>	This work
pEXG2-Mut- <i>cyaA</i>	pEXG2 carrying SOE-PCR fragment for deletion of <i>cyaA</i>	This work
pEXG2-Mut- <i>cyaB</i>	pEXG2 carrying SOE-PCR fragment for deletion of <i>cyaB</i>	This work
pEXG2- <i>exlBA-lacZ</i>	pEXG2 carrying <i>lacZ</i> integrated within <i>exlBA</i> fragment for integration into chromosome	This work
miniCTX1	Site-specific integrative plasmid (<i>att B</i> site, Tc ^r)	61
miniCTX-comp- <i>vfr</i>	miniCTX carrying <i>vfr</i> gene	This work
miniCTX- <i>cyaA</i>	miniCTX carrying <i>cyaA</i> gene	This work
miniCTX- <i>cyaB</i>	miniCTX carrying <i>cyaB</i> gene	This work
pET15BVP	Expression vector for inducible production of N-terminally His ₆ -tagged proteins (Ap ^r)	62
pET15BVP-purif- <i>vfr</i>	Expression vector pET15BVP carrying PCR fragment for Vfr overproduction	This work

^aReferred to as AZPAE15042 at www.pseudomonas.com.

SLIC_pEXG2_*exlBA'*_F/SLIC_*exlBA'*_lacZ_R, SLIC_lacZ_F/SLIC_lacZ_R and SLIC_lacZ_*exlA'*_F/SLIC_*exlA'*_pEXG2_R primer pairs. The resulting fragments of 700, 3,123, and 700 bp were then cloned into SmaI-cut pEXG2 by SLIC. Flanking *exlA* regions were designed so that the *lacZ* coding sequence with its own ribosome binding site can be inserted in frame after the third codon of *exlA*. The miniCTX and pEXG2-derived vectors were transferred into *P. aeruginosa* IHMA87 or PA7 strains by triparental mating using pRK2013 as a helper plasmid. For allelic exchange using the pEXG2 plasmids, coinfection events were selected on LB plates containing Irgasan and gentamicin. Single colonies were then plated on NaCl-free LB agar plates containing 10% (wt/vol) sucrose to select for the loss of plasmid, and the resulting sucrose-resistant strains were checked for gentamicin sensitivity and mutant genotype.

For overproduction of Vfr in *E. coli*, the *vfr* gene was PCR amplified using IHMA87 genomic DNA as the template, and the amplicon was inserted into NdeI-BamHI sites of the pET15b plasmid. All the constructions were verified by sequencing.

Mapping of the 5' end using circularization of *exlB* cDNA. The procedure for 5'-end mapping was carried out as previously described (55) with some modification. Total RNA was isolated from IHMA87 at an OD₆₀₀ of 2.0 using hot phenol-chloroform extraction. The residual DNAs in 30 μ g of total RNA were removed with Turbo DNase I (4 U; Thermo Fisher Scientific). Following phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation, 15 μ g of total RNA was reverse transcribed using 5'-phosphorylated *exlB* gene-specific primer (R_*exlB*+60; 2 pmol) and SuperScript III reverse transcriptase (400 U, 40 μ l of reaction

volume; Thermo Fisher Scientific). After reverse transcription, the residual RNAs were removed using RNase H (5 U) and RNase I_f (50 U). The cDNA was purified using the Oligo Clean & Concentrator kit (Zymo Research) with a reduced ethanol volume (200 μ l) and recovered with 19 μ l of nuclease-free water. The 8.75 μ l of cDNA was used for the circularization reaction (15 μ l of reaction mixture volume, 100 U of CirLigase II; Epicentre). The control cDNA was incubated under the same condition in the absence of CirLigase II. After incubation at 60°C for 2 h, the reaction was terminated by further incubating at 80°C for 10 min. The circularized cDNA (4 μ l) was used as the template in an amplification of the junction sequence using GoTaq green master mix (40 μ l of reaction mixture volume; Promega) and *exlB* primer pairs (F_{exlB}+4 and R_{exlB}+3). The cycling conditions were 94°C for 3 min, followed by 36 cycles of 94°C for 20 s, 55°C for 45 s, 72°C for 60 s, and 72°C for 2 min. PCR products were separated and eluted by 2% agarose and cloned into pJET2.1 vector (Thermo Fisher Scientific). Positive clones obtained from colony PCR were sequenced with the pJET reverse primer. All the primers used for circularization are listed in Table S1.

Cell culture and cytotoxicity assay. The epithelial lung carcinoma cell line A549 (ATCC CCL-185) was cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), at 37°C, in 5% CO₂. The day before the infection, the A549 cells were seeded in a 48-well tissue culture plate (Falcon) at 8×10^4 cells/well in fresh RPMI medium. For the infection, RPMI medium was replaced by nonsupplemented endothelial basal medium 2 (EBM2; Lonza). Monolayers were infected with bacteria at an OD₆₀₀ of ≈ 1.0 and at a multiplicity of infection (MOI) of 10. The bacterial cytotoxicity was determined by measuring the release of lactate dehydrogenase (LDH) in the supernatant 4.5 h postinfection using the Roche cytotoxicity LDH detection kit. The negative controls were noninfected cells, and the positive controls were cells lysed by the addition of Triton X-100. The degree of cytotoxicity was calculated by determining the percentage of cytotoxicity compared to that of the positive control. The experiments were performed at least in triplicate.

ExlA secretion analysis. ExlA proteins were precipitated and concentrated using the sodium deoxycholate-trichloroacetic acid (DOC-TCA) method, either in LB cultures or after cell infection, as previously described (25). Briefly, proteins secreted by the bacteria were collected when the bacterial cultures reached an OD₆₀₀ of ≈ 1.0 , or after 2 h of A549 infection at an MOI of 10. The secreted proteins were precipitated by adding DOC at a final concentration of 0.02% for 30 min at 4°C. TCA was then added to 10%, and the solution was incubated overnight at 4°C. After centrifugation for 15 min at $15,000 \times g$ at 4°C, the pellet was resuspended in Laemmli loading buffer corresponding to 1/100 of the original volume. Samples were separated on 8% SDS-PAGE and transferred onto 0.2- μ m-pore polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Amersham) for Western immunoblotting. Rabbit polyclonal primary antibodies raised against the recombinant C-terminal part of ExlA and against the purified ExlA protein with its C-terminal part deleted (52) were mixed at a 1:1,000 dilution. The anti-FliC antibodies, used at a 1:1,000 dilution, were raised in rabbits (Biotem) with the recombinant FliC4 protein (residues 43 to 443 of the FliC b-type). His₆-FliC4 was expressed from pET28a.TEV-FliC4 and purified by affinity chromatography using the HIS60 Ni SuperFlow cartridge (Clontech Laboratories). Before immunization of rabbits, the tag was cleaved off by the tobacco etch virus (TEV) protease and the FliC4 protein was further purified by size exclusion chromatography using HiLoad 16/60 Superdex 75 Prep grade column (GE Healthcare). The immunoblots were developed using horseradish peroxidase (HRP [Sigma]) conjugated anti-rabbit secondary antibodies at a 1:40,000 dilution. The detection was performed with the Luminata Classico Western HRP substrate kit (Millipore) and analyzed using a Chemidoc (Bio-Rad).

Vfr analysis in PA7-like strains. Bacterial cultures (30 ml at an OD₆₀₀ of ≈ 1.0) were centrifuged for 10 min at $6,000 \times g$ and resuspended in 600 μ l of a mixture of 25 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, and 10 mM imidazole (pH 8.0), supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche). After sonication (3×150 J), the broken cells were removed by centrifugation at $22,000 \times g$ for 30 min at 4°C. A 7.5- μ l concentration of each sample was subjected to SDS-PAGE (15% gel) and then transferred onto a PVDF membrane. The primary anti-Vfr antibody was used at a 1:25,000 dilution and the secondary HRP-conjugated anti-rabbit antibody at 1:50,000.

Twitching motility assay. For the twitching motility assay, bacteria were inoculated at the plastic-agar interface of agar plates containing 10 g/liter tryptone, 5 g/liter yeast extract, 1% agar, and 10 g/liter NaCl and kept at 37°C for 48 h. The agar medium was then removed, and the twitching diameter was observed after staining with 0.1% Coomassie blue (21).

β -Galactosidase assays. β -Galactosidase activity was assayed when the bacterial cultures reached an OD₆₀₀ of ≈ 1.5 as described previously (56), with technical details reported in reference 57.

RT-qPCR. Total RNA from 2.0 ml of cultures (OD₆₀₀ of ≈ 1.0) was extracted either with hot phenol followed by ethanol precipitation or using the TRIzol Plus RNA purification kit (Invitrogen) and then treated with DNase I (amplification grade; Invitrogen). The yield, purity, and integrity of RNA were further evaluated on a NanoDrop spectrophotometer and by agarose gel migration. cDNA synthesis was carried out using 3 μ g of RNA with the SuperScript III first-strand synthesis system (Invitrogen) in the presence or absence of the SuperScript III RT enzyme to assess the absence of genomic DNA. The CFX96 real-time system (Bio-Rad) was used to PCR amplify the cDNA, and the quantification was based on use of SYBR green fluorescent molecules. Two microliters of cDNA was incubated with 5 μ l of GoTaq master mix (2 \times) (Promega) and reverse and forward specific primers at a final concentration of 125 nM in a total volume of 10 μ l. The cycling parameters of the real-time PCR were 95°C for 2 min (for activation of the *Taq* polymerase), 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 45 s, and finally a melting curve from 65°C to 95°C by increments of 0.5°C for 5 s to assess the specificity of the amplification. To generate standard curves, serial dilutions of the cDNA pool of the CLJ strains were used. The experiments were performed in duplicate with 3 biological replicates for each strain, and the results were analyzed with the CFX Manager

software (Bio-Rad). The relative expression of mRNAs was calculated using the quantification cycle ($\Delta\Delta C_q$) method relative to *rpoD* reference C_q values. The sequences of primers were designed using Primer3Plus and are given in Table S1.

Vfr purification. Overproduction of His₆-Vfr was performed in *E. coli* BL21(DE3)Star harboring pET15BVP grown at 37°C in ampicillin-containing LB medium. Overnight culture was diluted to an OD₆₀₀ of 0.05, and expression was induced at an OD₆₀₀ of 0.6 with 1 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside). After 3 h of growth, bacteria were harvested by centrifugation (4,000 × g, 10 min, 4°C) and resuspended in a mixture of 25 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, and 10 mM imidazole (pH 8.0) supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche). The bacteria were then broken using an M110-P Microfluidizer (Microfluidics). After centrifugation at 4°C and 30,000 rpm for 30 min, the soluble fraction was directly loaded onto a 1-ml nickel column (Protino Ni-nitrilotriacetic acid [NTA]; Macherey-Nagel). The column was washed with buffer containing increasing imidazole concentrations (20, 40, and 60 mM) using an ÄKTA purifier system (GE Healthcare), and the proteins were eluted with 200 mM imidazole. Aliquots from the peak protein fractions were analyzed by SDS-PAGE, and the fractions containing Vfr were pooled and dialyzed against buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 50 mM NaCl, 2 mM dithiothreitol [DTT], 2 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5% Tween 20 [pH 7.0]) as previously described (36).

EMSA. The 60-mer DNA probes (5′Cy5-pexI_{BA}_EMSA_F/pexI_{BA}_EMSA_R, pexI_{BA}_EMSA_F/pexI_{BA}_EMSA_R, 5′Cy5-pexI_{BA}_mut_EMSA_F/pexI_{BA}_mut_EMSA_R, and pexI_{BA}_mut_EMSA_F/pexI_{BA}_mut_EMSA_R) were generated by annealing complementary pairs of oligonucleotides as described in Table S1. The probes (0.5 nM) were incubated for 5 min at 25°C in binding buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 5% glycerol, 100 μg/ml bovine serum albumin, 1 mM EDTA [pH 7.5]) containing 25 ng/μl poly(dI-dC) (×1,330) and, unless indicated otherwise, 20 μM cAMP (Sigma-Aldrich). Vfr protein was added at the indicated concentrations in a final reaction volume of 20 μl and incubated for an additional 15 min at 25°C. Samples were immediately loaded on a native 5% Tris-borate-EDTA (TBE) polyacrylamide gel and run at 100 V and 4°C with cold 0.5× TBE buffer. Fluorescence imaging was performed using the Chemidoc MP apparatus. EMSAs were repeated a minimum of two times, and the representative gels are presented.

Statistical analysis. Statistical analyses were carried out using a nonparametric Mann-Whitney U test. *P* values of <0.05 and <0.01 were considered significant.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/JB.00135-18>.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.6 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Katrina Forest for the Vfr antiserum, Annabelle Varrot for the pET28a.TEV-FliC4 plasmid, and Peter Panchev for proofreading the manuscript. International Health Management Association (IHMA, USA) kindly provided the *P. aeruginosa* IHMA879472 strain.

This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR-15-CE11-0018-01), the Laboratory of Excellence GRAL (ANR-10-LABX-49-01), and the Fondation pour la Recherche Médicale (Team FRM 2017, DEQ20170336705). We further acknowledge support from CNRS, INSERM, CEA, and Grenoble Alps University. Alice Berry received a Ph.D. fellowship from the CEA Irtelis program.

REFERENCES

- Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell Infect Microbiol* 7:39. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406:959–964. <https://doi.org/10.1038/35023079>.
- Rodrigue A, Quentin Y, Lazdunski A, Mejean V, Foglino M. 2000. Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol* 8:498–504. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01833-3](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01833-3).
- Galan-Vasquez E, Luna B, Martinez-Antonio A. 2011. The regulatory network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Inform Exp* 1:3. <https://doi.org/10.1186/2042-5783-1-3>.
- Wurtzel O, Yoder-Himes DR, Han K, Dandekar AA, Edelheit S, Greenberg EP, Sorek R, Lory S. 2012. The single-nucleotide resolution transcriptome of *Pseudomonas aeruginosa* grown in body temperature. *PLoS Pathog* 8:e1002945. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002945>.
- Cattoir V, Narasimhan G, Skurnik D, Aschard H, Roux D, Ramphal R, Jyot J, Lory S. 2013. Transcriptional response of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to human respiratory mucus. *mBio* 3:e00410-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00410-12>.
- Gomez-Lozano M, Marvig RL, Tulstrup MV, Molin S. 2014. Expression of antisense small RNAs in response to stress in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Genomics* 15:783. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-783>.
- Coggan KA, Wolfgang MC. 2012. Global regulatory pathways and cross-talk control *Pseudomonas aeruginosa* environmental lifestyle and virulence phenotype. *Curr Issues Mol Biol* 14:47–70.
- Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ. 2012. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* 76:46–65. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05007-11>.
- Balasubramanian D, Schnepfer L, Kumari H, Mathee K. 2013. A dy-

- namic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Res* 41:1–20. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1039>.
11. Suh SJ, Runyen-Janecky LJ, Maleniak TC, Hager P, MacGregor CH, Zielinski-Mozny NA, Phibbs PV, Jr, West SE. 2002. Effect of vfr mutation on global gene expression and catabolite repression control of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 148:1561–1569. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-5-1561>.
 12. Hengge R. 2009. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 7:263–273. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2109>.
 13. Valentini M, Filloux A. 2016. Biofilms and cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria. *J Biol Chem* 291:12547–12555. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.711507>.
 14. Jin Y, Yang H, Qiao M, Jin S. 2011. MexT regulates the type III secretion system through MexS and PtrC in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 193:399–410. <https://doi.org/10.1128/JB.01079-10>.
 15. Mikkelsen H, McMullan R, Filloux A. 2011. The *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in *ladS*. *PLoS One* 6:e29113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029113>.
 16. Sall KM, Casabona MG, Bordi C, Huber P, de Bentzmann S, Attree I, Elsen S. 2014. A *gacS* deletion in *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate CHA shapes its virulence. *PLoS One* 9:e95936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095936>.
 17. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.008842>.
 18. Dingemans J, Ye L, Hildebrand F, Tontodonati F, Craggs M, Bilocq F, De Vos D, Crabbe A, Van Houdt R, Malfrout A, Cornelis P. 2014. The deletion of TonB-dependent receptor genes is part of the genome reduction process that occurs during adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis lung. *Pathog Dis* 71:26–38. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12170>.
 19. Elsen S, Huber P, Bouillot S, Coute Y, Fournier P, Dubois Y, Timsit JF, Maurin M, Attree I. 2014. A type III secretion negative clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* employs a two-partner secreted exolysin to induce hemorrhagic pneumonia. *Cell Host Microbe* 15:164–176. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.003>.
 20. Boukerb AM, Marti R, Cournoyer B. 2015. Genome sequences of three strains of the *Pseudomonas aeruginosa* PA7 clade. *Genome Announc* 3:e01366-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01366-15>.
 21. Reboud E, Elsen S, Bouillot S, Golovkine G, Basso P, Jeannot K, Attree I, Huber P. 2016. Phenotype and toxicity of the recently discovered exA-positive *Pseudomonas aeruginosa* strains collected worldwide. *Environ Microbiol* 18:3425–3439. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13262>.
 22. Huber P, Basso P, Reboud E, Attree I. 18 July 2016. *Pseudomonas aeruginosa* renews its virulence factors. *Environ Microbiol Rep* <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12443>.
 23. Freschi L, Jeukens J, Kukavica-Ibrulj I, Boyle B, Dupont MJ, Laroche J, Larose S, Maaroufi H, Fothergill JL, Moore M, Winsor GL, Aaron SD, Barbeau J, Bell SC, Burns JL, Camara M, Cantin A, Charette SJ, Dewar K, Deziel E, Grimwood K, Hancock RE, Harrison JJ, Heeb S, Jelsbak L, Jia B, Keenan DT, Kidd TJ, Klockgether J, Lam JS, Lamont IL, Lewenza S, Loman N, Malouin F, Manos J, McArthur AG, McKeown J, Milot J, Naghra H, Nguyen D, Pereira SK, Perron GG, Pirnay JP, Rainey PB, Rousseau S, Santos PM, Stephenson A, Taylor V, Turton JF, Waglechner N, Williams P, Thrane SW, Wright GD, Brinkman FS, Tucker NP, Tummeler B, Winstanley C, Levesque RC. 2015. Clinical utilization of genomics data produced by the International *Pseudomonas aeruginosa* Consortium. *Front Microbiol* 6:1036. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01036>.
 24. 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. <https://doi.org/10.1128/JB.01563-14>.
 25. Basso P, Ragno M, Elsen S, Reboud E, Golovkine G, Bouillot S, Huber P, Lory S, Faudry E, Attree I. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* pore-forming exolysin and type IV pili cooperate to induce host cell lysis. *mBio* 8:e02250-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.02250-16>.
 26. Leo JC, Grin I, Linke D. 2012. Type V secretion: mechanism(s) of auto-transport through the bacterial outer membrane. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367:1088–1101. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0208>.
 27. Faure LM, Llamas MA, Bastiaansen KC, de Bentzmann S, Bigot S. 2013. Phosphate starvation relayed by PhoB activates the expression of the *Pseudomonas aeruginosa* sigma_{mv} ECF factor and its target genes. *Microbiology* 159:1315–1327. <https://doi.org/10.1099/mic.0.067645-0>.
 28. Winsor GL, Griffiths EJ, Lo R, Dhillon BK, Shay JA, Brinkman FS. 2016. Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* Genome Database. *Nucleic Acids Res* 44:D646–D653. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1227>.
 29. Solovyev V, Salamov A, Seledtsov I, Vorobyev D, Bachinsky A. 2011. Automatic annotation of bacterial community sequences and application to infections diagnostic, p 346–353. *In* *Bioinformatics* 2011. Proceedings of the International Conference on Bioinformatics Models, Methods, and Algorithms, Rome, Italy, 26 to 29 January 2011.
 30. Medina-Rivera A, Defrance M, Sand O, Herrmann C, Castro-Mondragon JA, Delerce J, Jaeger S, Blanchet C, Vincens P, Caron C, Staines DM, Contreras-Moreira B, Artufel M, Charbonnier-Khamvongsa L, Hernandez C, Thieffry D, Thomas-Chollier M, van Helden J. 2015. RSAT 2015: Regulatory Sequence Analysis Tools. *Nucleic Acids Res* 43:W50–W56. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv362>.
 31. Kanack KJ, Runyen-Janecky LJ, Ferrell EP, Suh SJ, West SE. 2006. Characterization of DNA-binding specificity and analysis of binding sites of the *Pseudomonas aeruginosa* global regulator, Vfr, a homologue of the *Escherichia coli* cAMP receptor protein. *Microbiology* 152:3485–3496. <https://doi.org/10.1099/mic.0.29008-0>.
 32. Beatson SA, Whitchurch CB, Sargent JL, Levesque RC, Mattick JS. 2002. Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 184:3605–3613. <https://doi.org/10.1128/JB.184.13.3605-3613.2002>.
 33. Wolfgang MC, Lee VT, Gilmore ME, Lory S. 2003. Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway. *Dev Cell* 4:253–263. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00019-4](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00019-4).
 34. Luo Y, Zhao K, Baker AE, Kuchma SL, Coggan KA, Wolfgang MC, Wong GC, O'Toole GA. 2015. A hierarchical cascade of second messengers regulates *Pseudomonas aeruginosa* surface behaviors. *mBio* 6:e02456-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02456-14>.
 35. Serate J, Roberts GP, Berg O, Youn H. 2011. Ligand responses of Vfr, the virulence factor regulator from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 193:4859–4868. <https://doi.org/10.1128/JB.00352-11>.
 36. Fuchs EL, Brutinel ED, Jones AK, Fulcher NB, Urbanowski ML, Yahr TL, Wolfgang MC. 2010. The *Pseudomonas aeruginosa* Vfr regulator controls global virulence factor expression through cyclic AMP-dependent and -independent mechanisms. *J Bacteriol* 192:3553–3564. <https://doi.org/10.1128/JB.00363-10>.
 37. West SE, Sample AK, Runyen-Janecky LJ. 1994. The vfr gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and protease production, belongs to the cyclic AMP receptor protein family. *J Bacteriol* 176:7532–7542. <https://doi.org/10.1128/jb.176.24.7532-7542.1994>.
 38. Inclan YF, Huseby MJ, Engel JN. 2011. FimL regulates cAMP synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 6:e15867. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015867>.
 39. Lory S, Wolfgang M, Lee V, Smith R. 2004. The multi-talented bacterial adenylate cyclases. *Int J Med Microbiol* 293:479–482. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00297>.
 40. Dasgupta N, Ferrell EP, Kanack KJ, West SE, Ramphal R. 2002. fleQ, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is sigma⁷⁰ dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *J Bacteriol* 184:5240–5250. <https://doi.org/10.1128/JB.184.19.5240-5250.2002>.
 41. Sundin C, Wolfgang MC, Lory S, Forsberg A, Frithz-Lindsten E. 2002. Type IV pili are not specifically required for contact dependent translocation of exoenzymes by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Pathog* 33:265–277. <https://doi.org/10.1006/mpat.2002.0534>.
 42. Marsden AE, Intile PJ, Schulmeyer KH, Simmons-Patterson ER, Urbanowski ML, Wolfgang MC, Yahr TL. 2016. Vfr directly activates *exsA* transcription to regulate expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *J Bacteriol* 198:1442–1450. <https://doi.org/10.1128/JB.00049-16>.
 43. Smith RS, Wolfgang MC, Lory S. 2004. An adenylate cyclase-controlled signaling network regulates *Pseudomonas aeruginosa* virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect Immun* 72:1677–1684. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.3.1677-1684.2004>.
 44. Croda-García G, Grosso-Becerra V, Gonzalez-Valdez A, Servin-Gonzalez L, Soberon-Chavez G. 2011. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* rhlR: role of the CRP orthologue Vfr (virulence factor regu-

- lator) and quorum-sensing regulators LasR and RhIR. *Microbiology* 157: 2545–2555. <https://doi.org/10.1099/mic.0.050161-0>.
45. Ferrell E, Carty NL, Colmer-Hamood JA, Hamood AN, West SE. 2008. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* ptxR by Vfr. *Microbiology* 154: 431–439. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/011577-0>.
 46. Busby S, Ebright RH. 1999. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol* 293:199–213. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3161>.
 47. Browning DF, Busby SJ. 2016. Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 14:638–650. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.103>.
 48. Diggle SP, Cornelis P, Williams P, Camara M. 2006. 4-Quinolone signaling in *Pseudomonas aeruginosa*: old molecules, new perspectives. *Int J Med Microbiol* 296:83–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01.038>.
 49. Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R, Olson MV. 2006. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 8487–8492. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602138103>.
 50. Jeukens J, Boyle B, Kukavica-Ibrulj I, Ouellet MM, Aaron SD, Charette SJ, Fothergill JL, Tucker NP, Winstanley C, Levesque RC. 2014. Comparative genomics of isolates of a *Pseudomonas aeruginosa* epidemic strain associated with chronic lung infections of cystic fibrosis patients. *PLoS One* 9:e87611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087611>.
 51. Fox A, Haas D, Reimann C, Heeb S, Filloux A, Voulhoux R. 2008. Emergence of secretion-defective sublines of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 resulting from spontaneous mutations in the vfr global regulatory gene. *Appl Environ Microbiol* 74:1902–1908. <https://doi.org/10.1128/AEM.02539-07>.
 52. Basso P, Wallet P, Elsen S, Soleilhac E, Henry T, Faudry E, Attree I. 2017. Multiple *Pseudomonas* species secrete exolysin-like toxins and provoke caspase-1-dependent macrophage death. *Environ Microbiol* 19: 4045–4064. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13841>.
 53. Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR. 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77:61–68. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90359-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90359-4).
 54. Li MZ, Elledge SJ. 2007. Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat Methods* 4:251–256. <https://doi.org/10.1038/nmeth1010>.
 55. Polidoros AN, Pasentsis K, Tsaftaris AS. 2006. Rolling circle amplification-RACE: a method for simultaneous isolation of 5' and 3' cDNA ends from amplified cDNA templates. *BioTechniques* 41:35–36, 38, 40. <https://doi.org/10.2144/000112205>.
 56. Miller JH. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 57. Thibault J, Faudry E, Ebel C, Attree I, Elsen S. 2009. Anti-activator ExsD forms a 1:1 complex with ExsA to inhibit transcription of type III secretion operons. *J Biol Chem* 284:15762–15770. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.003533>.
 58. Kos VN, Deraspe M, McLaughlin RE, Whiteaker JD, Roy PH, Alm RA, Corbeil J, Gardner H. 2015. The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 59:427–436. <https://doi.org/10.1128/AAC.03954-14>.
 59. Figurski DH, Helinski DR. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:1648–1652. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.4.1648>.
 60. Rietsch A, Vallet-Gely I, Dove SL, Mekalanos JJ. 2005. ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8006–8011. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503005102>.
 61. Hoang TT, Kutchma AJ, Becher A, Schweizer HP. 2000. Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid* 43:59–72. <https://doi.org/10.1006/plas.1999.1441>.
 62. Arora SK, Ritchings BW, Almira EC, Lory S, Ramphal R. 1997. A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *J Bacteriol* 179:5574–5581. <https://doi.org/10.1128/jb.179.17.5574-5581.1997>.

**cAMP and Vfr control Exolysin expression and cytotoxicity
of *Pseudomonas aeruginosa* taxonomic outliers**

**Alice Berry,^a Kook Han,^b Julian Trouillon,^a Mylène Robert-Genthon,^a Michel Ragno,^a
Stephen Lory,^b Ina Attrée^a and Sylvie Elsen^{a,#}**

Biology of Cancer and Infection, U1036 INSERM, CEA, University of Grenoble Alpes, ERL5261 CNRS, Grenoble, France^a; Department of Microbiology and Immunobiology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA^b

#Address correspondence to Sylvie Elsen, sylvie.elsen@cea.fr.

Supplemental Material and Methods

Mutagenesis of *exlBA* promoter. Three mutations were introduced into the promoter of *exlBA* directly in the chromosome of the strain IHMA87 *exlA::lacZ*, two abolishing completely the consensus boxes “-10” (“Box -10 mut”) and “-35” (“Box -35 mut”), and the other optimizing the predicted “-35” box to become closer to the consensus one (“Box -35 opt”). To create the mutations, the upstream region and the downstream region flanking the targeted box were amplified using for: 1) “Box -10 mut” : Mut-pexlBA-sF1 / Mut-pexlBA1-new10-sR1 (fragment of 539 pb) and Mut-pexlBA1-new10-sF2 / Mut-pexlBA-sR2 (fragment of 559 pb) ; 2) “Box -35 mut” : Mut-pexlBA-sF1 / Mut-pexlBA1-new35-sR1 (fragment of 515 pb) and Mut-pexlBA1-new35-sF2 / Mut-pexlBA-sR2 (fragment of 583 pb) ; 3) “Box -35 opt” : Mut-pexlBA-sF1 / Mut-pexlBA1-35-sR1 (fragment of 514 pb) and Mut-pexlBA1-35-sF2 / Mut-pexlBA-sR2 (584 pb). The resulting fragments were then cloned into *Sma*I-cut pEXG2 by

Sequence- and Ligation-Independent Cloning (SLIC) (1) and the mutated sequences were introduced into the chromosome by allelic exchange. Each mutation created restriction site (*Sall* or *SphI*) allowing selection of mutated genotype. The primers used for PCR are listed in the Table S1.

1. Li MZ, Elledge SJ. 2007. Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat Methods* 4:251-256.

Supplemental Tables

TABLE S1. Primers used in this work

Name	Sequence (5'→3')	Use
Mut-pexI _{BA} -sF1	GGTCGACTCTAGAGGATCCCCTGGTGATGG CGGCTGGCACC	<i>pexI_{BA}</i> mutagenesis
Mut-pexI _{BA} -sR2	ACCGAATTCGAGCTCGAGCCCCGACGTAGC CGG CATCGACAT	<i>pexI_{BA}</i> mutagenesis
Mut-pexI _{BA} 1-new10-sR1	<u>GTCGAC</u> GTCGACAGACCTCACCCGTTTG	<i>pexI_{BA}</i> mutagenesis
Mut-pexI _{BA} 1-new10-sF2	GGTGAGGTCTGCGAC <u>GTCGAC</u> ACGCAAGAC ACAAAGTTTACATAAC	<i>pexI_{BA}</i> mutagenesis
Mut-pexI _{BA} 1-new35-sR1	GCATGCCATCCGAGTAAAGAAATTGACCG	<i>pexI_{BA}</i> mutagenesis
Mut-pexI _{BA} 1-new35-sF2	TTCTTTACTCGGAT <u>GGCATGC</u> ACGGGTGAG GTCTGCGACTAA	<i>pexI_{BA}</i> mutagenesis
Mut-pexI _{BA} 1-35-sR1	<u>GTCGAC</u> ATCCGAGTAAAGAAATTGACCG	<i>pexI_{BA}</i> mutagenesis
Mut-pexI _{BA} 1-35-sF2	TTTCTTTACTCGGAT <u>GTCGAC</u> AACGGGTGAG GTCTGCGACTAA	<i>pexI_{BA}</i> mutagenesis
Mut-vfr-F1	CTGCAGGCGCCAGCTTAGCACAGGGC	<i>vfr</i> deletion
Mut-vfr-R1	GGCGACCGTCCGGTGACTCAGCGGCCGTC GTCGTCCTCG	<i>vfr</i> deletion
Mut-vfr-F2	GTCACCGGACGCGTCGCCC	<i>vfr</i> deletion
Mut-vfr-R2	GGATCCTCTCAACCGGGCCGACGTGG	<i>vfr</i> deletion
IHMA-Mut-cyaA-F1	CCTTAGACCGACGCTGTTCCCTAGTCC	<i>cyaA</i> deletion
IHMA-Mut-cyaA-R1	CTGTGCGTTCATGGGCGTCC	<i>cyaA</i> deletion

IHMA-Mut-cyaA-F2	GGACGCCCATGAACCGACAGCAGGCGCTGC TGGAGCAATGA	<i>cyaA</i> deletion
IHMA-Mut-cyaA-R2	GGCTCGAGATGCCTTCCTGTGCCTGCTG	<i>cyaA</i> deletion
IHMA-Mut-cyaB-F1	CCTCTAGAGTGCTCTTCCACGCGCTGGC	<i>cyaB</i> deletion
IHMA-Mut-cyaB-R1	GAGGGTGGGCTTCATGCGCT	<i>cyaB</i> deletion
IHMA-Mut-cyaB-F2	AGCGCATGAAGCCCACCCTCTACGTTCGAGCA CGAACTGCCC	<i>cyaB</i> deletion
IHMA-Mut-cyaB-R2	GGCTCGAGCCTGGTGTGCTCGAAGCC	<i>cyaB</i> deletion
Vfr-binding-F1	GGATCCTACGGCATGCATCTCGATGTC	<i>pex/BA</i> Vfr binding site mutation
Vfr-binding-R1	GCCTCTAGACTGATTCACGAAAGTTGGCG	<i>pex/BA</i> Vfr binding site mutation
Vfr-binding-F2	CTTTCGTGAATCAGTCTAGAGGCGTTTCTTC GTCCAGTCAGCAAC	<i>pex/BA</i> Vfr binding site mutation
Vfr-binding-R2	CTCGAGGCAATTGGCGTTGGCGTTCCT	<i>pex/BA</i> Vfr binding site mutation
IHMA-Comp-vfr-F	CCGGATCCCGCCTCGAGGAAGCCTCGCA GC	<i>vfr</i> complementation
IHMA-Comp-vfr-R	CCAAGCTTCTGACTGATCCGCGCTGTCGA	<i>vfr</i> complementation
Comp-cyaA-sF	GATATCGAATTCCTGCAGCCCGCCGAACAC CTGCTCGAGC	<i>cyaA</i> complementation
Comp-cyaA-sR	CTTAGAACTAGTGGATCCCCGATAGCCAT GGATTACGTCCCT	<i>cyaA</i> complementation
IHMA-Comp-cyaB-sF	GATATCGAATTCCTGCAGCCCTTTCGCCGAG TTCTACCCCTAT	<i>cyaB</i> complementation
IHMA-Comp-cyaB-sR	CTTAGAACTAGTGGATCCCCGAGCAATCC TGGCGGGCCTC	<i>cyaB</i> complementation
SLIC_pEXG2_exlBA'_F	TGCAGGTGCACTCTAGAGGATCCCCAGCGC GGTCTGGAGTCTCG	<i>exlA-lacZ</i> fusion
SLIC_exlBA'_lacZ_R	AAGTTAAAATGCCGCGCCCCTACCTTCTATG CATGAGAACCTCTTCG	<i>exlA-lacZ</i> fusion
SLIC_lacZ_F	AGGTAGGGGCGCGGCATTTT	<i>exlA-lacZ</i> fusion
SLIC_lacZ_R	TTATTTTTGACACCAGACCAACTG	<i>exlA-lacZ</i> fusion
SLIC_lacZ_exlA'_F	CCAGTTGGTCTGGTGTCAAAAATAAGACAAT CCTGTCTTCCACCTC	<i>exlA-lacZ</i> fusion
SLIC_exlA'_pEXG2_R	AGGTACCGAATTCGAGCTCGAGCCCTCGAG CTCGGTTCGACGCCT	<i>exlA-lacZ</i> fusion
Purif-vfr-NdeI-F	GGCATATGGTAGCTATTACCCACACACCCA	Vfr over-production
Purif-vfr-BamHI-R	GGGGATCCTTCAGCGGGTGCCGAAGACCA	Vfr over-production
R_exlB+60	CAGCAGCAGGGCTCGGCAG	circularization

F_exIB+4	CGTACCGCTCTACCGAATCATC	circularization
R_exIB+3	CACGCGGCATCCTTCATGTATC	circularization
rpoD-F3	CTGTTTCATGCCGATCAAGCTG	RTqPCR
		Reference gene
rpoD-R3	AACGCTGTCGACCCACTTCTC	RTqPCR
		Reference gene
exIB-F	CCTATGGCTACTGGACCTACA	RTqPCR
exIB-R	AGGTAGCTGTCGACATCCTTG	RTqPCR
exIA-F	CGCTGAAGGACAAGCTGGAA	RTqPCR
exIA -R	CATTACGGTTCGATGCCGTTT	RTqPCR
5'Cy5-pex/BA_EMSA_F	CCAGTCGCGACACGCCAAACTTTCGTGAATC AGTTCACAGGCGTTTCTTCGTCCAGTAG	EMSA
pex/BA_EMSA_F	CCAGTCGCGACACGCCAAACTTTCGTGAATC AGTTCACAGGCGTTTCTTCGTCCAGTCAG	EMSA
pex/BA_EMSA-R	CTGACTGGACGAAGAAACGCCTGTGAACTG ATTCACGAAAGTTTGGCGTGTGCGGACTGG	EMSA
5'Cy5-pex/BA_mut_EMSA_F	CTGACTGGACGAAGAAACGCCTGTGAACTG ATTCACGAAAGTTTGGCGTGTGCGGACTGG	EMSA
pex/BA_mut_EMSA_F	CCAGTCGCGACACGCCAAACTTTCGTGAATC AGTCTAGAGGCGTTTCTTCGTCCAGTCAG	EMSA
pex/BA_mut_EMSA-R	CTGACTGGACGAAGAAACGCCTCTAGACTG ATTCACGAAAGTTTGGCGTGTGCGGACTGG	EMSA

A

GTCAATTTCTTTACTCGGATGTAACAAACGGGTGAGGTCTGCGACTTAATCTACGCAAG**A**CACAAAGTT
 -35 -10

consensus : TTGACA N_{16/18} TATAAT N_{5/8} +1 (A/G)
*exlB*Ap : TAACAA N₁₈ TAATCT N₇ +1 (A)
 Box -10 mut : TAACAA N₁₈ **gtcgac**
 Box -35 mut : **gcAtgc** N₁₈ TAATCT
 Box -35 opt : TcgacA N₁₈ TAATCT

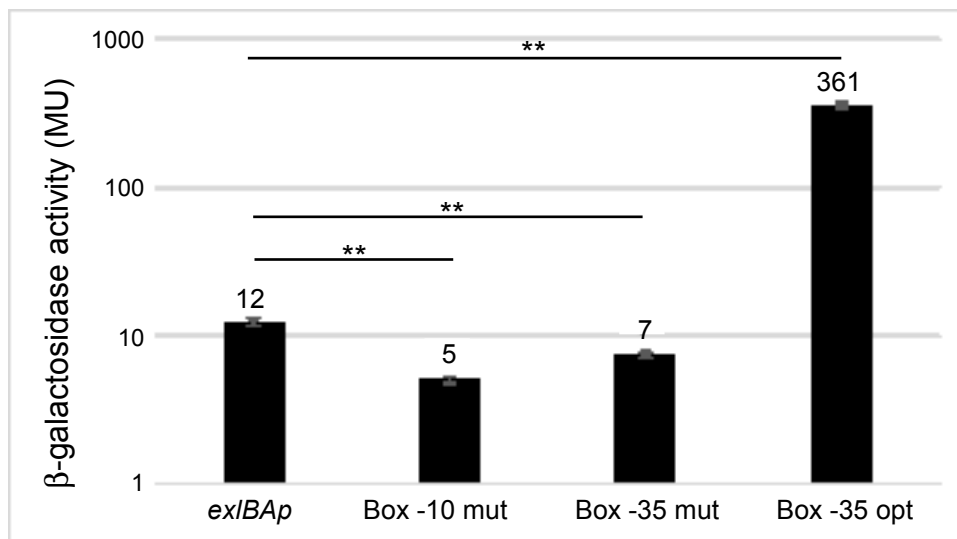
B

FIG S1 Definition of the *exlBA* promoter. (A) DNA sequence of the 5' region of *exlB*, with the nucleotide "A" identified as the TSS in bold and pinpointed by an arrow. The putative "-10" and "-35" boxes are underlined and compared to the consensus "-10" and "-35" sequences, with the conserved nucleotides underlined. The mutations introduced in the chromosome of the IHMA87 *exlA::lacZ* strain are indicated with the mutated bases in bold lower cases. The selected changes either reduce (Box -10 mut and Box -35 mut) or increase (Box -35 opt, "opt" for "optimal") the homology to the consensus. (B) β -galactosidase activities of IHMA87 *exlA::lacZ* strain with the indicated *exlBA* sequences. Strains were grown in LB medium at 37°C to an OD₆₀₀ of 1.5 then β -galactosidase activity was measured. The experiments were performed in triplicate and the mean values of the β -galactosidase activities are indicated on the top of the histograms (in Miller Units) while the error bars indicate the standard deviations. The p-value ($p < 0.01$) is determined using Mann-Whitney U test and indicated by two stars when the difference with the wild-type *exlBA-lacZ* fusion is statistically supported.

Note that the implication of another putative -35 box (underlined with dashed line, panel (A)) closer to the consensus was ruled out as its modification from GTAACA to GTCGAC ("box -35 opt") led to a higher activity of *exlB*Ap. The poor matches of the identified "-10" and "-35" boxes to consensus might explain the low *exlBA* transcriptional activity measured in the IHMA87 strain harboring the native promoter fusion and the mild impact of introduced mutations. On the other hand, the change of the putative "-35" box to fit better the consensus led to strong increase (30 fold) of *exlB*Ap activity.

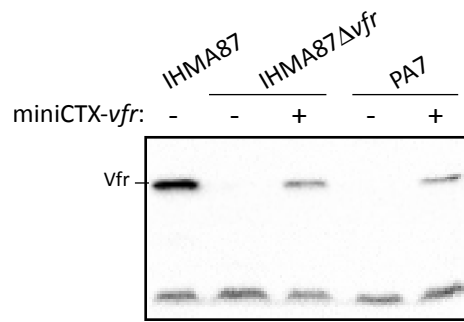


FIG S2 Vfr synthesis in wild-type and complemented strains. Western blot of the cytosolic fractions of the indicated strains grown in low calcium condition (EGTA/MgCl₂). The upper band corresponds to Vfr, while the lower band is a non-specific cross-reacting protein used as a loading control. The amount of Vfr observed in the complemented strains is lower compared to the parental strain IHMA87, probably due to the ectopic location (*att* site) of the own-promoter driven *vfr* gene.

Annexe 9 : Article présentant l'étude de la pathoadaptation des souches CLJ1 et CLJ3, publié en Avril 2019 dans le journal « *Microbial Genomics* ».

Ce travail a également été publié sur la plateforme BioRxiv en Septembre 2018.

Insertion sequences drive the emergence of a highly adapted human pathogen

Erwin Sentausa,^{1†} Pauline Basso,^{1‡} Alice Berry,¹ Annie Adrait,² Gwendoline Bellement,^{1,2§} Yohann Couté,² Stephen Lory,³ Sylvie Elsen^{1,*} and Ina Attrée^{1,*}

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a highly adaptive opportunistic pathogen that can have serious health consequences in patients with lung disorders. Taxonomic outliers of *P. aeruginosa* of environmental origin have recently emerged as infectious for humans. Here, we present the first genome-wide analysis of an isolate that caused fatal haemorrhagic pneumonia. In two clones, CLJ1 and CLJ3, sequentially recovered from a patient with chronic pulmonary disease, insertion of a mobile genetic element into the *P. aeruginosa* chromosome affected major virulence-associated phenotypes and led to increased resistance to the antibiotics used to combat the infection. Comparative genome, proteome and transcriptome analyses revealed that this ISL3-family insertion sequence disrupted the genes for flagellar components, type IV pili, O-specific antigens, translesion polymerase and enzymes producing hydrogen cyanide. Seven-fold more insertions were detected in the later isolate, CLJ3, than in CLJ1, some of which modified strain susceptibility to antibiotics by disrupting the genes for the outer-membrane porin OprD and the regulator of β -lactamase expression AmpD. In the *Galleria mellonella* larvae model, the two strains displayed different levels of virulence, with CLJ1 being highly pathogenic. This study revealed insertion sequences to be major players in enhancing the pathogenic potential of a *P. aeruginosa* taxonomic outlier by modulating both its virulence and its resistance to antimicrobials, and explains how this bacterium adapts from the environment to a human host.

DATA SUMMARY

All data are available. The whole-genome shotgun projects for CLJ1 and CLJ3 have been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under accession numbers PVXJ000000000 and PZJI000000000, respectively. The raw sequencing data were deposited at NCBI's Sequence Read Archive under accession numbers SRP170343 and SRP170410. The RNA-Seq datasets have been uploaded to GEO under identifiers GSE123106 and GSE123107. The MSy proteomics data were deposited with the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository under dataset identifier PXD011105. These data can be accessed on <https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/>. The RNA-Seq experiments were

performed in accordance with the ENCODE guidelines and appropriately validated by RT-qPCR.

INTRODUCTION

Emerging infectious diseases caused by multidrug-resistant bacteria represent a serious threat to human well-being and health. Over the last 40 years, several hundred novel pathologies caused by infectious agents have been reported [1]. Environmental bacteria can adapt to a human host by acquiring virulence traits through chromosomal rearrangements due to the insertion of mobile genetic elements, horizontal gene transfer or small local sequence changes, such as single nucleotide substitutions [2, 3].

Received 8 December 2018; Accepted 17 March 2019; Published 4 April 2019

Author affiliations: ¹Université Grenoble Alpes, CNRS ERL5261, INSERM U1036, CEA, Laboratory Biology of Cancer and Infection, Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses, Biosciences and Biotechnology Institute of Grenoble, 38000 Grenoble, France; ²Université Grenoble Alpes, CEA, Inserm, BIG-BGE, 38000 Grenoble, France; ³Department of Microbiology and Immunobiology, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

***Correspondence:** Sylvie Elsen, sylvie.elsen@cea.fr; Ina Attrée, ina.attree-delic@cea.fr

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; adaptation; antibiotic resistance; bacterial infection; multiomics.

Abbreviations: CF, cystic fibrosis; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; DR, direct repeat; IS, insertion sequence; FDR, false discovery rate; LPS, lipopolysaccharide; OSA, O-specific antigen; RGP, region of genomic plasticity; T3SS, type 3 secretion system; T4P, type IV pili; TLS, translesion synthesis; TPS, two-partner secretion.

†Present address: Evotec ID (Lyon) SAS, Marcy l'Étoile, France.

‡Present address: Department of Microbiology and Immunology, University of California San Francisco (UCSF) School of Medicine, San Francisco, CA, USA.

§Present address: Biozentrum, University of Basel, Basel, Switzerland.

Data statement: All supporting data, code and protocols have been provided within the article or through supplementary data files. One supplementary figure and eleven supplementary tables are available with the online version of this article.

The genus *Pseudomonas* is one of the largest groups of bacteria, found in diverse environments and capable of causing both plant and animal diseases. *Pseudomonas* species such as *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* and *P. syringae* adversely impact human health and agriculture [4–6]. *P. aeruginosa* is a particularly successful opportunistic pathogen frequently found in humid environments associated with human activities. In hospital settings, infections caused by multidrug-resistant *P. aeruginosa* strains present a real danger for elderly individuals, patients treated with immunosuppressive therapies and users of invasive devices in intensive care units. In addition to acute infections, *P. aeruginosa* is a common cause of chronic wound infections, and is linked to long-lasting respiratory infections in patients with cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). During chronic infections, the bacteria adjust to their particular host environment by adapting their metabolic pathways and synthesizing particular virulence-associated components [7]. Alterations occurring post-colonization include acquisition of loss-of-function mutations in genes of motility and antibiotic resistance, as well as aggressive factors responsible for acute virulence [8–12].

Recent massive whole-genome sequencing has allowed the classification of clinical and environmental *P. aeruginosa* strains into four well-defined clades [13, 14]. The different clades rely on different toxins to exert their pathogenic strategies. The two most populated clades inject toxins, also referred to as effectors, ExoS, ExoT, ExoY and ExoU, directly into the host cell cytoplasm using a type-III secretion system (T3SS) [15]. The third and fourth clades are occupied by strains lacking all the genes encoding the effectors and the components of the T3SS. The first fully sequenced taxonomic outlier, PA7, was found to be multidrug resistant and non-virulent in a mouse model of acute lung infection [16, 17]. Other PA7-related strains were mainly of environmental origin [18, 19], but were occasionally associated with acute (wounds and urinary tract) and chronic (CF and COPD) human infections [20–22]. Some recently emerged highly virulent clones from those clades secrete the pore-forming toxin Exolysin, ExlA, that was found to be responsible for bacterial cytotoxicity [16, 21–24]. The most pathogenic *exlA*⁺ *P. aeruginosa* strain described to date is CLJ1, which was isolated at the University Hospital in Grenoble, France, from a COPD patient with haemorrhagic pneumonia [16]. Experimentally infected mice with CLJ1 had extensive damage to their lung endothelial monolayers, and bacteria had transmigrated into the blood and disseminated into secondary organs, all without being detected by the host's immune system. This clinical scenario differs greatly from the consequences observed with the T3SS⁺ strain PAO1 [16, 25].

To gain insight into the molecular determinants of pathogenesis expressed by Exolysin-producing *P. aeruginosa* taxonomic outliers, and to assess the extent of evolutionary adaptation during the course of infection, we performed a comprehensive comparative genome-wide study of two

IMPACT STATEMENT

Bacteria employ diverse strategies to adapt to changing environments, including the infectious niche in human hosts. *Pseudomonas aeruginosa* adapts to establish a chronic infection in cystic fibrosis patients through small nucleotide changes in pathoadaptive genes. In this study, we demonstrate that *P. aeruginosa* clonal outliers use another strategy to evade the host's immune system and to deal with the antibiotics used to treat the infection. Using a genome-wide 'multiomics' approach, we discovered that a single mobile genetic element belonging to the ISL3 insertion sequence family altered (i) the structure of multiple surface macromolecules (flagella, pili, lipopolysaccharide), (ii) the levels of proteins responsible for antibiotic resistance, and (iii) the expression of some virulence factors. Our work thus reveals another powerful means used by bacteria to rapidly adapt to a human niche and deal with the threat posed by antimicrobials.

clonal variants, CLJ1 and CLJ3, isolated from the same patient at different time-points during hospitalization. The data gathered demonstrated that mobile genetic elements belonging to the ISL3 insertion sequence (IS) family, originally found in soil bacteria *P. stutzeri* and *P. putida*, shaped the virulence traits and strategies used by these strains to colonize their human host, escape from the immune system and resist antibiotic treatment.

METHODS

Bacterial strains and culture conditions

The *P. aeruginosa* strains used in this study were CLJ1 and CLJ3 [16]. Bacteria were grown at 37 °C in liquid Lysogeny broth (LB) medium (per litre: 10 g Bacto tryptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl) with shaking until the cultures reached an optical density of 1.0 (or other value where indicated) at 600 nm (OD₆₀₀). To assess levels of cyclic-di-GMP (*c*-di-GMP), pUCP22-*pcdrA-gfp*(ASV)^c was introduced into CLJ1 and CLJ3 strains by electroporation, as previously described [26], and transformed bacteria were selected on LB agar plates containing carbenicillin at 200 µg ml⁻¹.

Genome analysis

Details of sequencing, assembly, annotation and comparison can be found in the Supplementary Materials and Methods. The assembly and annotation statistics for the CLJ1 and CLJ3 genomes are presented in Table S1 (available in the online version of this article). Functional annotation was performed on the Rapid Annotations based on Subsystem Technology (RAST) Genome Annotation Server, version 2.0 [27], using the Classic RAST annotation scheme and the GLIMMER-3 gene caller. Annotations were manually curated based on annotations of orthologous genes in PA7 and PAO1 strains in the *Pseudomonas* Genome

Database [28]. Circos 0.69-3 [29] was used to create the multiomic data visualizations for Figs 1 and S1.

Identifying insertion sites for IS elements

Locations of CLJ-ISL3 insertions in the gaps between CLJ3 contigs were detected by checking for the inverted repeat sequences at contig ends, while taking the shared gene synteny between CLJ1, PA7 and PAO1 genomes into account. PanISa version 0.1.0 (<https://github.com/bvalot/panISa>) [30] was also used, with default parameters, to search for ISs in CLJ3 reads. Reads were mapped to the PA7 and CLJ1 genomes using the BWA-MEM algorithm from BWA version 0.7.15 [31].

Transcriptome

The RNA for RNA-Seq was prepared as previously described [32] from bacterial cultures grown in duplicate in LB to an OD₆₀₀ of 1. Briefly, total RNA was isolated using the Direct-zol RNA MiniPrep kit (Zymo). Cells were collected by centrifugation (8000 g, 5 min) and the supernatant was discarded. TRI Reagent (700 µl) was added to the pellet, and bacteria were lysed by vigorous vortexing (2 min). After centrifugation at 13000 g for 1 min, the lysate was transferred to a clean tube containing an equal volume of 100 % ethanol. The ethanol mixture was transferred to a Zymo-Spin IIC Column placed in a collection tube and centrifuged. The column, to which RNAs were bound, was washed according to the manufacturer's protocol. RNA was finally eluted with 40 µl nuclease-free water. rRNA was depleted using the Ribo-Zero magnetic kit (Epicentre). The Illumina libraries and sequencing were prepared according to standard procedures at the Biopolymer Facility, Harvard Medical School, Boston, USA. Data were analysed as described in the Supplementary Materials and Methods. The total number of reads mapped to the genes was incorporated into a tabular format and analysed as raw counts using the DESeq2 differential expression analysis pipeline. Differentially expressed genes between CLJ1 and CLJ3 were identified using a 5 % false discovery rate (FDR).

MS-based quantitative proteomics analyses

Proteomics samples were prepared and analysed by nano-LC coupled to tandem MS (Ultimate 3000 coupled to an LTQ-Orbitrap Velos Pro; Thermo Scientific) as described previously [33] with slight modifications (see Supplementary Materials and Methods). Each fraction was verified by western blot for purity using appropriate antibodies. The protein content in the whole-cell, membrane and secretome fractions of CLJ1 and CLJ3 was analysed independently. Statistical analyses were performed using ProStaR [34]. In total, a list of 2852 quantified proteins was obtained. The MS proteomics data were deposited with the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [35] partner repository under dataset identifier PXD011105.

Phenotypic analyses

HCN production was assessed on induction plates containing arginine (an HCN precursor), as previously described

[22]. Briefly, a sheet impregnated with a Cu²⁺-containing reaction mixture was placed above agar plates seeded with bacteria. A white-to-blue colour transition indicates HCN production. The fluorescence-based reporter plasmid pUCP22-p*CdrA-gfp*(ASV)^c was used to monitor levels of c-di-GMP [36]. Bacteria carrying the plasmid were subcultured to an OD₆₀₀ of 0.05 in a black 96-well plate with a clear bottom, and incubated at 37 °C under 60 r.p.m. in the Fluoroskan reader. Fluorescence was measured every 15 min for 6 h, and emission was monitored at 527 nm following excitation at 485 nm. Serum sensitivity was assessed by a protocol adapted from the literature [37]. Two different human sera provided by the French National blood service (EFS) were used in all experiments. Overnight cultures of CLJ1 and CLJ3 bacteria were pelleted at 3000 r.p.m. for 5 min and suspended in Hanks balanced salt solution (HBSS; Gibco) with 0.1 % gelatin, adjusted to 10⁸ c.f.u. ml⁻¹. Bacteria (10⁶) were incubated in the presence of 10 % human serum in a final volume of 3 ml for 15 min or 30 min at 37 °C under gentle agitation. A negative control with heat-inactivated serum (56 °C for 30 min) was included. Numbers of c.f.u. were determined at 0, 15 and 30 min by serial-dilution and spreading on LB plates. Statistical significance was determined using a *t*-test.

Infections of *Galleria mellonella* larvae

Calibrated larvae of the wax moth *Galleria mellonella* were purchased from Sud-Est Appats (<http://www.sudestappats.fr>). Healthy, uniformly white larvae measuring around 3 cm were selected for infection. The bacteria were grown to an OD₆₀₀ of 1 and diluted in PBS to approximately 10³ bacteria ml⁻¹. Insulin cartridges were sterilized before filling with bacterial solutions. Larvae were injected with 10 µl of bacterial suspensions using an insulin pen. The precise number of bacteria transferred in injections was determined by spotting 10 µl aliquots with the pen five times onto agar plates, and counting c.f.u. after growth at 37 °C for 16 h. Infected larvae were placed in Petri dishes and maintained at 37 °C. Dead larvae were counted over the period indicated. Twenty larvae were used per condition, and the experiment was performed twice.

RT-qPCR

To quantify selected transcripts, total RNA from 2.0 ml cultures (OD₆₀₀ of 1.0) was extracted with the TRIzol Plus RNA Purification Kit (Invitrogen) and treated with DNase I (Amplification Grade; Invitrogen). Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was performed as described [38] with minor modifications (see Supplementary Materials and Methods). Primer sequences were designed using Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) and are listed in Table S2. Transcript quantifications are shown with SEM.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed with 'T-Test Calculator for 2 Independent Means' (<https://www.socscistatistics.com>).

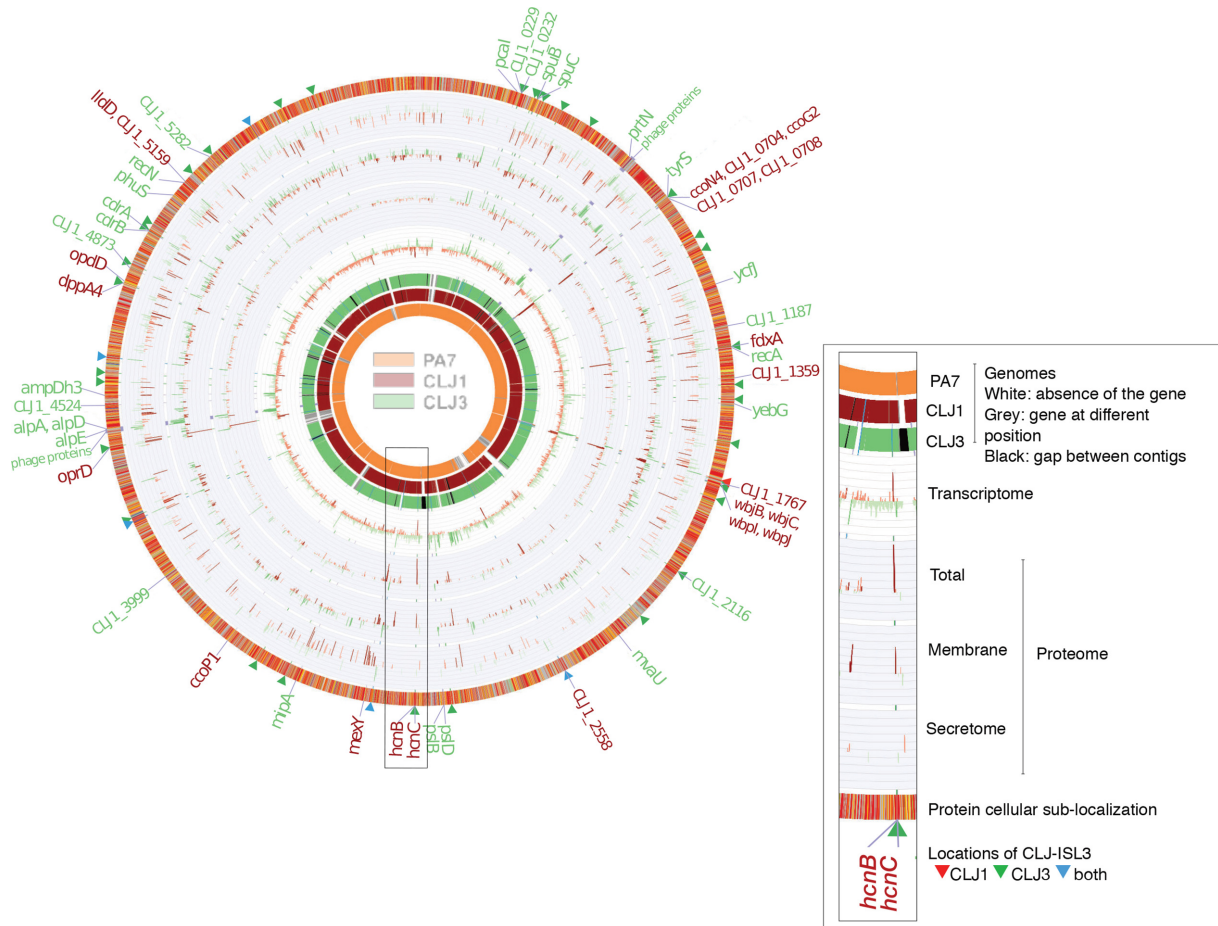


Fig. 1. Comparison of the CLJ1 and CLJ3 genomes, transcriptomes and proteomes. The overview of the two genomes, compared to the PA7 strain reference genome, is shown on the left. The image on the right is an enlarged genomic segment at the *hcn* locus presenting a more detailed description of the data. The three genome rings in the figure represent the pangenomes for the different strains. Grey blocks in the PA7 ring indicate that the homologue of the CLJ1 (and CLJ3) gene in that position exists elsewhere in the PA7 genome. Genes were ordered based on the ordering of genes in the PA7 genome, remaining genes were ordered according to their positions in the CLJ1 contig, or when not present in either PA7 or CLJ1, the ordering of genes in CLJ3 contigs. The red bars on charts indicate genes or proteins that were more abundantly expressed in CLJ1, whereas the green bars indicate higher expression levels in CLJ3; darker tones indicate statistically significant differences in expression levels between the two strains (false discovery rate < 0.05). The labels on the outermost ring highlight genes that were differentially expressed in both RNA sequencing (RNA-Seq) and at least one of the proteomics datasets. The protein subcellular localization (outermost ring) was coloured according to the coding used in the *Pseudomonas* Genome Database [30]. CLJ-ISL3 insertions are indicated by red, green and blue triangles, depending on whether they were present in CLJ1, CLJ3 or both strains, respectively.

com/tests/studentttest), or a log-rank test. The threshold for statistical significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Analysis of the CLJ1 genome and its regions of genomic plasticity

CLJ1, an antibiotic-sensitive *P. aeruginosa* strain, was isolated from a patient with necrotizing haemorrhagic pneumonia. Twelve days after initiating antibiotic therapy, the patient's condition worsened and a multidrug-resistant clonal variant, CLJ3, was isolated [16]. CLJ1 shares the main genomic features with the first fully sequenced antibiotic-

resistant *P. aeruginosa* taxonomic outlier, PA7 [16, 17]. In particular, CLJ1 lacks the entire locus encoding the T3SS machinery and the genes encoding all known T3SS effectors; however, it carries the determinant for the two-partner secretion pore-forming toxin, Exolysin. To initiate genome-wide studies into the mechanisms conferring the specific CLJ1 phenotypes, we sequenced the genome of this strain and compared it to PA7. As expected, most core genes were shared by the two strains (Figs 1 and S1). However, differences in the content and distribution of several variable regions, or 'regions of genomic plasticity (RGPs)' as defined by Mathee *et al.* [39], were detected. Thus, the CLJ1 genome

contained 15 regions that are absent from the PA7 genome, and lacked 26 PA7 regions, including some outside recognizable RGP (Table S4). The differences between PA7 and CLJ1 are presented in Tables S3 and S4. All CLJ1 regions absent from PA7 (CLJ-SR), except CLJ-SR14, were detected in other *P. aeruginosa* strains, some of which are phylogenetically unrelated to the PA7 strain. Strikingly, CLJ-SR14 carries 55 genes, including many that are predicted to encode proteins involved in metabolism and resistance to heavy metals (Table S5), suggesting that the strain is of environmental origin. Moreover, the so-called Dit island previously found in a CF isolate of *P. aeruginosa* [39] was found inserted into the 5' region of RGP27 at a tRNA^{Gly}. The determinants encoded in this island provide the bacteria with the ability to degrade aromatic diterpenes – tricyclic resin acids produced by wounded trees – and to use them as sole carbon and energy source [40]. The Dit island is uncommon in *P. aeruginosa* strains, but is frequently found in a range of soil bacteria such as *Burkholderia xenovorans*, *P. fluorescens* and *Pseudomonas mendocina*. Identification of this island further supports an environmental origin of the CLJ1 strain. Interestingly, most of the genes within RGP7 (pKLC102-like island) were missing from CLJ1 (Table S4).

Four gene clusters have been defined as replacement islands in *P. aeruginosa*; they carry horizontally acquired material and sequences diverge significantly between strains [41, 42]. These gene clusters encode proteins involved in the biosynthesis or post-translational modification of lipopolysaccharide (LPS) O antigen, pyoverdine, pili and flagella. Modifications to three of these clusters can produce the CLJ1-specific phenotype. The CLJ replacement island in RGP60 (harbouring pilin and pilin-modification genes) carries a group I pilin allele. In contrast, PA7 contains a group IV allele [43]. Within RGP9, CLJ1 encodes a b-type flagellin as the principal component of its flagellum, while PA7 has an a-type flagellin [17]. RGP9, containing the flagellin glycosylation genes, and the replacement island in RGP31, bearing the O-specific antigen (OSA) biosynthesis gene cluster, were further modified in CLJ strains (see below).

Among other potential virulence-associated genes, CLJ1 lacks one of the three copies of the type-6 secretion system loci (*PSPA7_2884–2902*) encoding a machine to inject toxins with activity in both prokaryotic and eukaryotic cells [44]. The *plcH* and *plcR* genes, coding for the haemolytic phospholipase C precursor and its accessory protein, respectively, were also absent from the CLJ1 genome. Although the *cupA* fimbrial gene cluster (*CLJ1_2899–2903*; *PSPA7_3019–3023*) was present in RGP23, the entire *cupE1-6* operon (*PSPA7_5297–5302*), which encodes cell surface fimbriae required to maintain a biofilm structure [45], was missing.

Evidence of mobile genetic elements in key pathogenic regions

The CLJ3 isolate was sampled from the same patient after a series of aggressive antibiotic treatments and displayed

different cytotoxicity and antibiotic-sensitivity profiles compared to CLJ1 [16]. The genomes of the two strains were almost identical, with a reciprocal best-hit average nucleotide identity [46] estimated at 99.97%, and >600 SNPs between them (Fig. 1). When analysing the genomes of CLJ1 and CLJ3, the most striking feature was the presence of multiple copies of a 2985 bp fragment corresponding to a mobile genetic element, absent from the reference PA7 genome. At the nucleotide level, the whole sequence of this element was 99% identical to ISPst2 from *P. stutzeri*, ISpu12 from *P. putida* and IS1396 from *Serratia marcescens*, found in the ISfinder database [47] (Table S6). Further examination of publicly available genome sequences (NCBI release February 2019) by BLASTN searching revealed the fragment to be 100% identical to a part of the pU12A_D plasmid present in the *Escherichia coli* ST131 urinary tract isolate (accession number: PRJNA516746). The complete sequence was also detected in a few other bacterial strains, including a multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate recovered from bronchoalveolar lavage fluid [48]. The element is an isoform of ISPst2 and belongs to the ISL3 family, and we therefore named it CLJ-ISL3. In addition to coding for a transposase, CLJ-ISL3 encodes a putative seven-transmembrane domain inner-membrane protein (344 aa, 36 kDa) from the permease superfamily cl17795 (with the conserved domain COG0701 [49]) and a putative transcriptional metalloregulator from the ArsR family (Fig. 2a). The element is flanked by a pair of 24 bp imperfect inverted repeat sequences, GGGTATCCG-GAATTTCTGGTTGAT (left inverted repeat, IRL) and GGGTATACGGATTTAATGGTTGAT (right inverted repeat, IRR) (Fig. 2a).

Six and 40 copies of CLJ-ISL3 were present in the genomes of CLJ1 and CLJ3, respectively. The six insertions in the CLJ1 genome were revealed by BLAST mining of the assembled contigs. In the CLJ3 genome, most of the ISs were predicted using a combination of bioinformatics tools, analysis of genome synteny and detection of inverted sequences (Materials and Methods). In agreement with the clonal origin of the strains, all but one of the CLJ-ISL3 in CLJ1 were found in the same location in the CLJ3 genome (Fig. 1, Table S7). MS-based quantitative proteomic analyses revealed a strong increase in expression of the transposase protein in CLJ3 compared to CLJ1, which might be the result of the considerably higher number of ISs within its genome (Table S8). As mobile genetic elements contribute significantly to phenotypic modifications by altering gene expression or by inactivating genes [50, 51], we examined how these insertions affected overall gene expression and specific phenotypes. To do so, we compared CLJ1 and CLJ3 transcriptomes and proteomes using RNA-Seq and MS-based quantitative proteomics, respectively. The proteomes for three different bacterial fractions (whole bacteria, total membranes and secretomes) were analysed. Stringent statistical analyses of extracted data revealed 75 differentially expressed elements between CLJ1 and CLJ3, at both mRNA and protein levels (Fig. 1, Tables S8, S9 and S10). Among

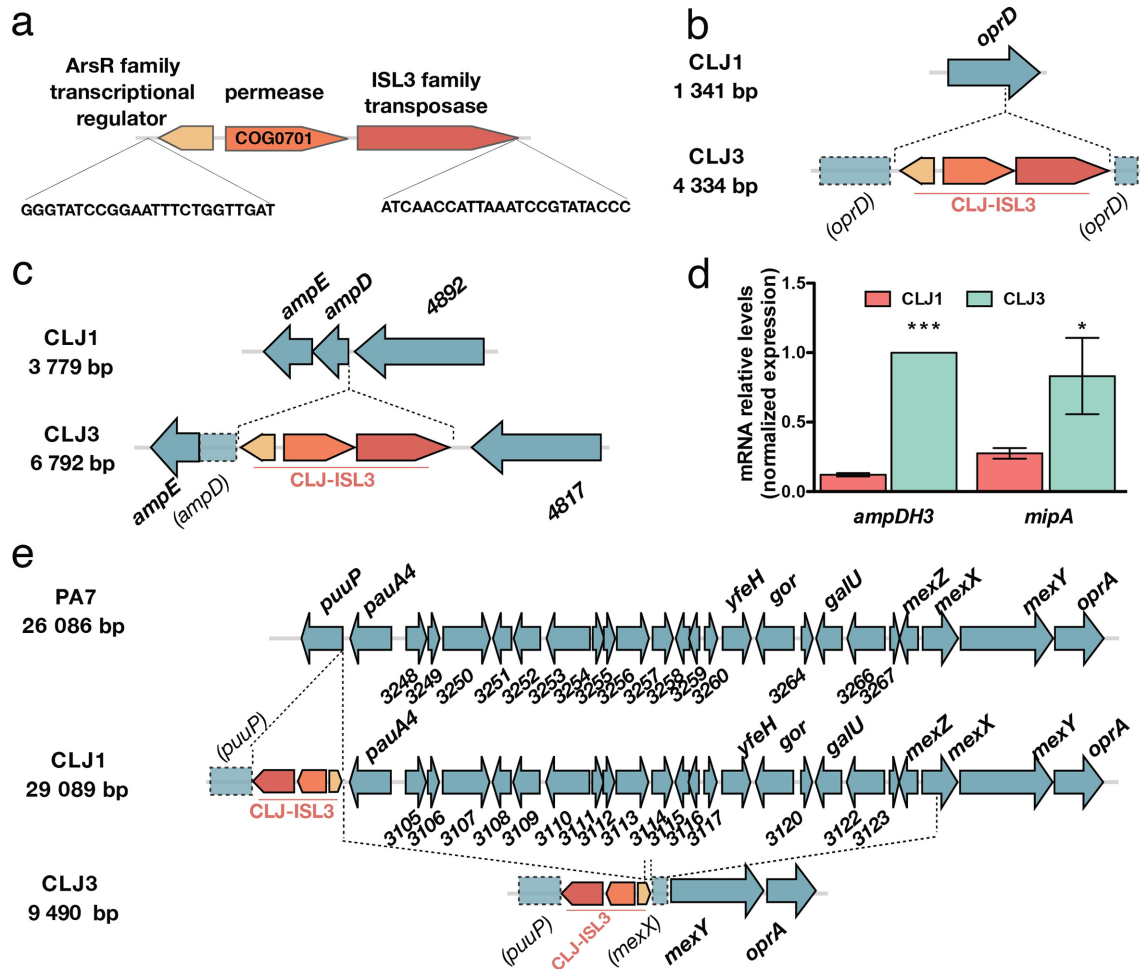


Fig. 2. Insertions of CLJ-ISL3 into genes encoding determinants of antibiotic susceptibility. (a) Representation of the 2985 bp CLJ-ISL3, encompassing three genes and with inverted repeats at its extremities. (b) Representation of disruption of *oprD* in CLJ3 by CLJ-ISL3. (c) Location of CLJ-ISL3 in *ampD* in CLJ3. (d) RT-qPCR analysis of the relative expression of *ampDH3* and *mipA* in CLJ1 and CLJ3 strains. Error bars correspond to SEM. The results of a *t*-test are indicated by asterisks when the difference between the two strains was statistically significant (* $P < 0.05$ or *** $P < 0.001$). (e) Gene organization of the region present in PA7 and CLJ1 but absent from CLJ3. CLJ-ISL3 was found in *puuP* in CLJ1, whereas both *puuP* and *mexX* were disrupted in CLJ3, with the connecting sequence replaced by CLJ-ISL3 (see main text).

these elements, 27 (35%) were phage-related, while 32 (42%) were predicted to be localized in bacterial membranes, the periplasm or secreted.

Contribution of CLJ-ISL3 to antibiotic resistance in the CLJ3 strain

The CLJ1 and CLJ3 strains were recently isolated from a patient treated unsuccessfully with high doses of various antibiotics. CLJ1, isolated before the beginning of the antibiotic therapy, was sensitive to the antibiotics tested, whereas CLJ3 displayed resistance to most of the antibiotics administered to the patient [16]. To gain insights into the mechanisms of antibiotic resistance developed by CLJ3, we examined the genomic data for gene modifications that could explain the switch in phenotypes. Several genes

encoding proteins potentially conferring antibiotic resistance were observed to be modified by ISs.

As the patient was given several antibiotics from the β -lactam family (ticarcillin, carbapenem, cephalosporin, etc.) and the CLJ3 isolate developed resistance to all of them, we examined the status of the two major determinants of intrinsic resistance to this group of antibiotics, the outer-membrane porin OprD (CLJ1_4366) and the chromosomally encoded AmpC β -lactamase (CLJ1_0728). The *oprD* gene was found to be interrupted by the CLJ-ISL3 insertion (Fig. 2b), resulting in absence of the protein (Table S8). Loss-of-function mutations or deletions in *oprD* make the cell envelope impermeable to these antibiotics and have been repeatedly reported in isolates from patients undergoing treatment with imipenem or meropenem [52–

55]. In addition, CLJ-ISL3 was detected in the 5' portion of the *ampD* gene (Fig. 2c), encoding the recycling amidase responsible for the production of mucopeptide regulators of *ampC* expression [56, 57]. Consequently, although RNA-Seq data indicated no difference in *ampC* expression, CLJ3 proteomes contained significantly greater amounts of the AmpC protein than CLJ1 extracts (Table S8).

Two additional periplasmic proteins involved in peptidoglycan recycling and biosynthesis, the AmpDH3 amidase (CLJ1_5671) [58] and the lytic transglycosylase MltA-interacting protein MipA (CLJ1_3357) [59], were also over-represented in the CLJ3 proteome. In these cases, RT-qPCR data indicated that the corresponding genes were also over-expressed (Fig. 2d, Table S9). Overproduction of these proteins in a clinical strain suggests a role in adaptation of the strain to the host through modulation of peptidoglycan synthesis. However, we were unable to find a link between upregulation of those two genes and CLJ-ISL3 insertion. The molecular mechanisms involved in the increased expression observed and the relevance of their overexpression to bacterial persistence in the host therefore remain to be determined.

All *P. aeruginosa* strains carry genes for multiple efflux pumps. The CLJ1/PA7 clade possesses the locus encoding the MexXY-OprA efflux pump, which can transport multiple antibiotics including fluoroquinolones, aminoglycosides and certain cephalosporins (reviewed by Li and colleagues [60]). However, when compared to CLJ1, an approximately 20 kb deletion in the CLJ3 genome (resulting in loss of 22 genes corresponding to *PSPA7_3247-3268*) was detected, corresponding to elimination of the entire transcriptional repressor *mexZ* gene and truncation of *mexX* (Fig. 2e). The deleted region was replaced by a copy of CLJ-ISL3 that is bordered by truncated *puuP* and *mexX* sequences. One plausible explanation for the genomic arrangement observed in this region in CLJ3 is that the strain was derived from an as-yet unidentified clonal strain that had another copy of CLJ-ISL3 in *mexX*. Recombination between these two IS elements would produce the 20 kb deletion, simultaneously eliminating the repressor and a portion of the *mexX* genes, rendering this efflux pump non-functional. To investigate this hypothesis, we analysed the DR (direct repeat) sequences flanking the CLJ-ISL3 sequences in both CLJ1 and CLJ3 genomes. DRs are short sequences generated during the process of IS insertion, and their analysis can provide evidence of homologous recombination between two IS elements. CLJ-ISL3 inserted in the CLJ1 *puuP* gene was flanked by the 8-bp-long 'TTCTTTT' sequence, corresponding to the classical DR length for ISL3. In agreement with our hypothesis, a hybrid element was found in CLJ3, as the same DR sequence was found to flank one side of the IS (in the *puuP* truncated gene), whereas the sequence 'AATTTTC' of *mexX* was found on the other side. Truncation of the *puuP* gene, encoding putrescine importer/permease, indicates that the CLJ-ISL3 sequence affects transport of polyamines, which play multiple roles in pathogen

biology, including conferring resistance to some antibacterial agents [61].

Modifications to the OSA cluster due to CLJ-ISL3 insertions

OSA is a component of LPS and an integral component of the cell envelope of *P. aeruginosa*. The OSA biosynthetic gene cluster in CLJ, RGP31, is similar in content to that of PA7, and both PA7 and CLJ1 belong to serotype O12 [22]. However, insertion of two different ISs affects the gene content and expression levels of the proteins encoded (Fig. 3a). In CLJ1, the CLJ-ISL3 element was detected within the gene encoding NAD-dependent epimerase/dehydratase (CLJ1_1762 corresponding to *PSPA7_1970*), whereas in CLJ3 two copies were present, one disrupting *wbjL* and the second located in the intergenic region between *CLJ3_1919* and *CLJ3_1920* (*PSPA7_1972*). In addition, in CLJ3, two copies of another IS, sharing 75% nucleotide identity with ISCARN15 from the IS66 family, were detected within the *wbjB* gene (*CLJ1_1771*; *CLJ3_1930*), and downstream of *wbjM* (*CLJ1_1778*; *CLJ3_1936*). By performing bioinformatic searches for IS extremities in CLJ1 and CLJ3 contigs, this IS, which we named CLJ-IS66, was found to be present in a single location in CLJ1, within the CLJ-SR12 region (*CLJ_4873-CLJ_4876*). An identical insertion was found in CLJ3. CLJ-IS66 within the OSA locus negatively affects expression of the corresponding genes, or stability of the mRNA produced, as higher levels of both mRNA and protein were detected in CLJ1 compared to CLJ3 (Tables S8 and S9).

Interestingly, the deletion at the *mexX-puuP* locus in CLJ3 described above also encompasses the *galU* gene (*CLJ1_3121*, Fig. 2e), which encodes UDP glucose pyrophosphorylase [62]. This enzyme adds sugar moieties onto the inner core on lipid A, serving as an anchor for the full-length LPS. In the absence of *galU*, LPS is truncated and a rough LPS is produced, making bacteria more susceptible to serum-mediated killing and reducing their *in vivo* virulence [63]. The CLJ3 strain was indeed more sensitive to serum than the CLJ1 strain (Fig. 3b). The *in vivo* mechanism leading to selection of a serum-sensitive phenotype is unclear. Modification to LPS structures in *P. aeruginosa* strains chronically infecting CF patients is considered an adaptation mechanism to a more 'persistent' lifestyle, by making the LPS molecule less inflammatory [63]. Thus, multiple mechanisms contributed to the final LPS structure in CLJ clones. Those events could have provided strains with numerous advantages during the infection process, such as resistance to antimicrobials or altered recognition by the immune system.

ISs determine the repertoire of surface appendices

Inspection of CLJ1 and CLJ3 genome sequences showed that CLJ-ISL3 has strongly affected the flagellar biosynthetic locus in both strains. The CLJ3 genome revealed an organization and gene content of the flagellar locus similar to that found in PAO1, which synthesizes a b-type flagellum [64],

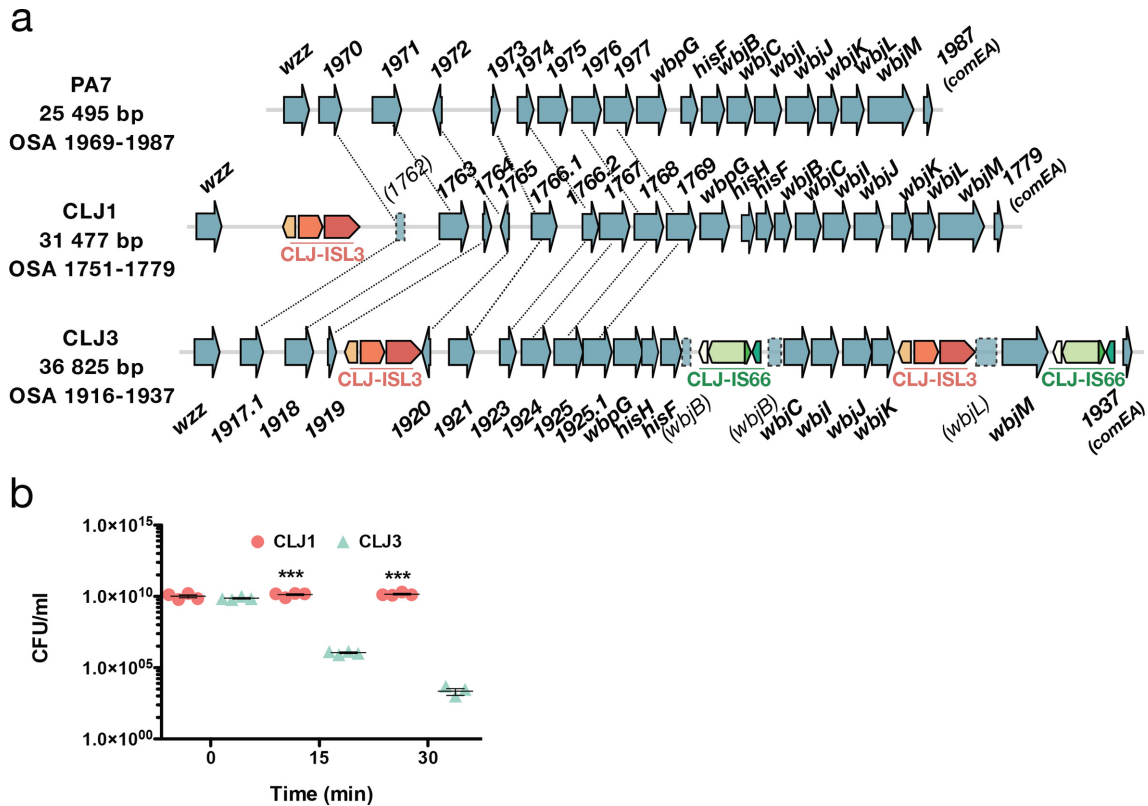


Fig. 3. ISs within OSA loci and how they affect serum sensitivity. (a) Comparison of the OSA region in PA7 and CLJ strains. CLJ-ISL3 was found in one location in CLJ1 and at two sites in CLJ3, whereas two copies of CLJ-IS66 were present in CLJ3. Correspondence between non-annotated genes is shown by connecting lines. (b) Kinetics of serum killing of CLJ1 and CLJ3 strains. Bacteria were incubated with human sera for the time indicated, before dilution and spotting on agar plates. Numbers of c.f.u. were counted after incubation at 37 °C for 16 h. Statistical significance was determined using a *t*-test. ****P*<0.001.

but with two copies of CLJ-ISL3 (Fig. 4a). The first IS interrupts *flgL* (*CLJ1_4222*), encoding the flagellar hook-associated protein through which the flagellum tethers to the cell envelope, whereas the second IS element is in *fgtA* (*CLJ1_4219*), which codes for the flagellin glycosyl transferase. These two ISs seem to have recombined in CLJ1, creating a deletion between the truncated *fgtA* and *flgL* genes (Fig. 4a). In agreement, the DRs flanking the two sides of the CLJ-ISL3 in CLJ1 are different and correspond to that found in CLJ3 in the IS integrated within *fgtA* ('ATTTTCCA') and *flgL* ('CGAAAATA'). This recombination between two ISs suggests that CLJ1 is not the direct ancestor of CLJ3, but that the two strains evolved from a common ancestor. The absence of a flagellum is in agreement with the non-motile phenotype of the strain observed during eukaryotic cell infection and on soft agar [22]. Bacterial flagella are also known to modulate the immune response during the response to infection, through binding of the major flagellar subunit, flagellin, to TLR5, which triggers TLR-dependent signalling and activates expression of pro-inflammatory cytokines [65]. The absence of assembled flagella in the isolates explains why pro-inflammatory

cytokine IL-1 β and tumour necrosis factor were undetectable in bronchoalveolar lavages from CLJ1-infected mice [23, 25].

As CLJ1 also lacks twitching motility [22], we examined the genomic data for possible mutations in genes encoding type IV pili (T4P) and found an insertion of CLJ-ISL3 within the 5' part of the *pilM* gene in both the CLJ1 and the CLJ3 genomes (Fig. 4b). This gene encodes a cytoplasmic actin-like protein, and is the first gene in the *pilMNOPQ* operon, which is reported to be essential for both T4P biogenesis and twitching motility [66]. Expression of the entire operon appears to be affected, as no proteins were detected by proteomic analysis, unlike several other Pil proteins encoded by other operons (Table S8). This effect is probably due to the polar effect of the IS element on the downstream genes. This finding was intriguing as the action of Exolysin, responsible for CLJ1 cytotoxicity, relies heavily on T4P in another *exlA*⁺ strain, IHMA87 [67]. Therefore, we examined CLJ1 proteomes for the presence of other putative adhesive molecules that may substitute for the T4P function during host cell invasion. Based on proteomic datasets, the CLJ1 strain synthesizes components of five two-partner

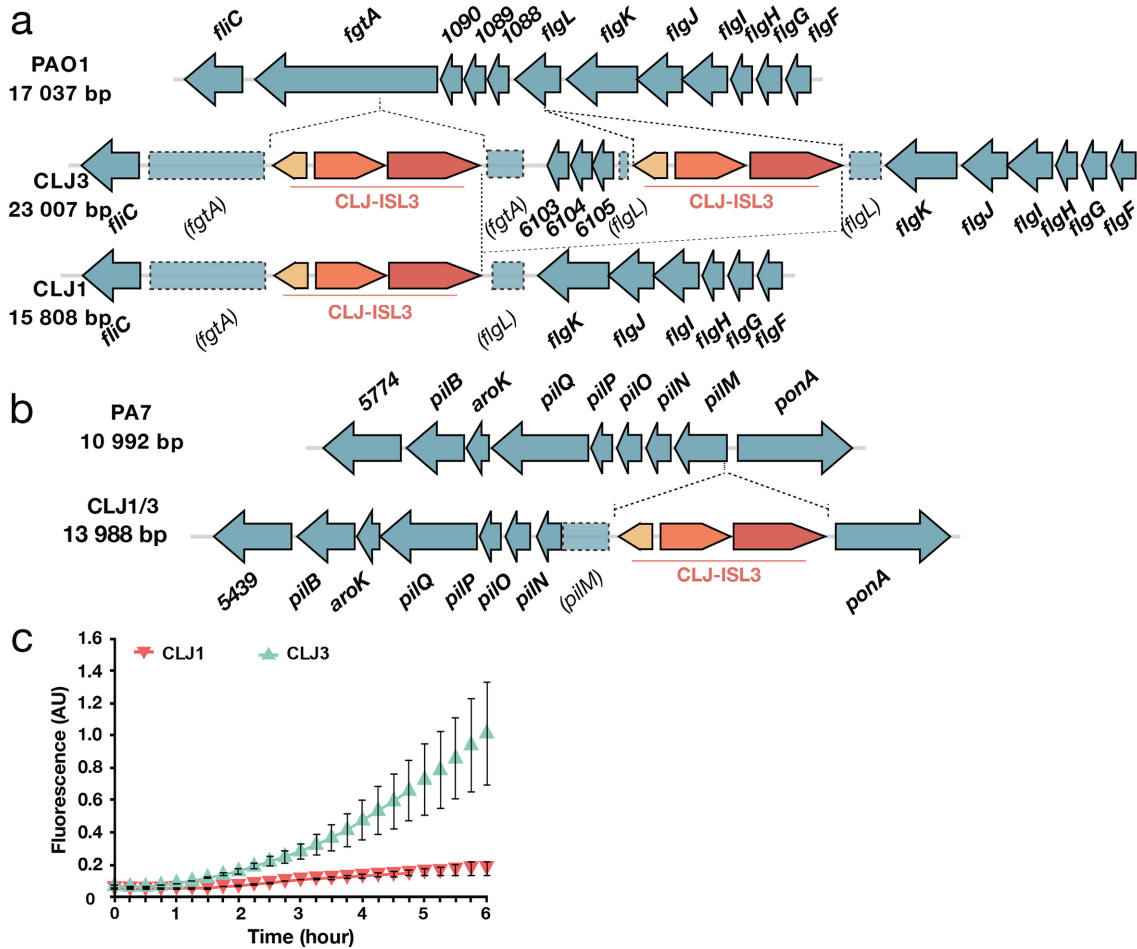


Fig. 4. Modifications to components associated with surface appendages. (a) Gene organization of the *flgL* region in PAO1 and the CLJ1 strain. Two CLJ-ISL3, interrupting *fgtA* and *flgL*, were found in the CLJ3 genome that probably recombined in CLJ1, leaving only a single copy of the IS. (b) Representation of the *pilMNOPQ* operon. CLJ-ISL3 was inserted into the *pilM* gene in both CLJ1 and CLJ3. (c) Synthesis of the adhesin CdrA is linked to high intracellular c-di-GMP levels. The c-di-GMP levels in CLJ1 and CLJ3 strains were monitored using the *pcdrA-gfp*(ASV)^c plasmid. Fluorescence was measured every 15 min over 6 h of growth. Error bars indicate SD.

secretion (TPS) systems, the predicted secreted components, some of which are annotated as haemolysins/haemagglutinins, including Exolysin (CLJ1_4479). As expected, Exolysin (ExlA) was found to be more abundant in the secretome produced by CLJ1 than in the secretome from CLJ3 (log₂FC -1.7, $P=8.24E-02$) (Table S8). CdrA and CdrB (CLJ1_4999 and CLJ1_5000) were significantly over-represented in the CLJ3 strain according to proteomics and RNA-Seq analyses (Tables S8 and S9). In the PAO1 strain, the adhesin CdrA is regulated by the secondary messenger c-di-GMP, and its expression increases in biofilm-growing conditions [68]. In the strains studied here, we assessed the cellular levels of c-di-GMP using a reporter based on the c-di-GMP-responsive *cdrA* promoter transcriptionally fused to a gene encoding unstable GFP [36]. The *pcdrA-gfp* (ASV)^c monitoring plasmid clearly revealed higher levels of the second messenger in CLJ3 during growth (Fig. 4c), suggesting that CLJ3 may have adapted to host conditions by

switching to the biofilm lifestyle. Another TpsA protein detected in CLJ secretomes is CLJ1_4560, an HMW-like adhesin named PdtA in the PAO1 strain. PdtA plays a role in *P. aeruginosa* virulence, as demonstrated in the *Caenorhabditis elegans* model of infection [69]. The production of five TPSs, including the protease LepA (CLJ1_4911) [70] and at least one contact-dependent inhibition protein Cdi (CLJ1_2745) [71, 72], in CLJ strains (Table S8) indicates that this family of proteins may play an important role during colonization and infection, but their respective contributions to adhesion, cytotoxicity or inter-bacterial competition during the infectious process will need to be investigated.

Other putative virulence factors, phages and metabolism

RNA-Seq results, supported by proteomics data, showed increased expression of the enzymes HcnB (CLJ1_2955) and HcnC (CLJ1_2954) in the CLJ1 strain (Table S10).

Inspection of the *hcn* operon revealed that the CLJ-ISL3 element was inserted into the 5' part of the *hcnB* gene in the CLJ3 genome (Fig. 5a), which explains the lack of expression measured by RT-qPCR (Fig. 5b). The *hcn* genes encode the subunits of hydrogen cyanide (HCN) synthase, which produce a toxic secondary metabolite [73]. The HCN produced by the strains was detected using a standard method (see Material and Methods). In agreement with proteomics data, CLJ1 produced HCN in higher quantities than CLJ3 (Fig. 5b, [22]). Many *P. aeruginosa* isolates from individuals with CF produce high levels of HCN [74], and the molecule has even been detected in the sputum of *P. aeruginosa*-infected CF and bronchiectasis patients [75, 76]. HCN also plays a regulatory role, inducing and repressing the expression of other genes [77], including the PA4129-PA4134 gene cluster in PAO1. This seven-gene cluster (*CLJ1_0701-CLJ1_0702*, *CLJ1_0704-CLJ1_0708*) is expressed at higher levels in CLJ1 compared to CLJ3 (Fig. 1, Tables S8 and S9). These results were confirmed for *ccoG2* and *ccoN4* by RT-qPCR (Fig. 5c). *ccoG2* codes for a cytochrome *c* oxidase accessory protein and *ccoN4* for a cytochrome *c* oxidase subunit, both products being involved in aerobic respiration. The *ccoN4* gene belongs to the *ccoN4Q4* operon, one of the two *ccoNQ* orphan gene clusters present in the *P. aeruginosa* genome. Its upregulation in the cyanogenic CLJ1 is in agreement with a study showing that, although *P. aeruginosa* encodes a cyanide-insensitive oxidase CIO, isoforms of *cbb₃*-type cytochrome *c* oxidase containing the CcoN4 subunit were produced in response to cyanide, exhibiting higher tolerance towards this poisonous molecule in low-oxygen conditions [78]. Among the other genes in the cluster are found a putative sulfite reductase-encoding gene (*CLJ1_0707*) and a gene (*CLJ1_0708*) coding for an oxidoreductase probably involved in sulfite reduction; however, their exact role is unknown.

Examining the data for differential expression of putative virulence determinants indicated that CLJ3 overproduces Lipotoxin F (LptF, CLJ1_1186), an outer-membrane protein contributing to adhesion to epithelial A549 cells which is known to activate the host inflammatory response [79]. The *lptF* gene is located in a putative operon together with a gene encoding a hypothetical protein predicted to be a lipoprotein located in the periplasm (CLJ1_1187). Proteomics analysis revealed this hypothetical protein to be upregulated in CLJ3 (Table S8). As *lptF* upregulation was not detected by initial RNA-Seq analysis, we performed RT-qPCR assays. Significant overexpression of both *lptF* and *CLJ1_1187/CLJ3_1413* was detected in CLJ3 (Fig. 5c), suggesting that Lipotoxin F together with CLJ1_1187 contributed to bacterial adaptation to in-human environments, in line with increased *lptF* expression in CF isolates [80].

Finally, prophages play important roles in *P. aeruginosa* physiology, adaptation and virulence [41, 81, 82]. In the CLJ genomes, at least eight regions related to phages were identified (Table S11), five of which differ or are absent from the PA7 genome (Table S3). Transcriptomic and proteomic

approaches revealed 27 phage-related proteins from *CLJ1_0539-0556* in RGP3 and *CLJ1_4296-4314*, including CLJ-SR11, to be significantly more abundant in CLJ3 compared to CLJ1 extracts (Tables S8-S10). Interestingly, both CLJ strains lacked the genes encoding bacteriocins, in particular pyocins S2, S4, and S5. Nevertheless, a homologue of PrtN (CLJ1_0535), an activator of pyocin biosynthetic genes [83], was expressed at higher levels in CLJ3 than in CLJ1. Indeed, the *prtN* gene is located in a region encoding phage-related proteins, all of which are overexpressed in CLJ3 (Fig. 1 and Table S10). The genes for AlpR (CLJ1_4295, CLJ3_4269) and AlpA (CLJ1_4296, CLJ3_4268), transcriptional regulators of a programmed cell death pathway in PAO1 [84], were also identified in both CLJ genomes. Finally, *alpA* and all the genes in the *alpBCDE* lysis cassette were highly expressed in CLJ3 (Fig. 1 and Table S10). The *alp* genes are present in a variable, phage-related region that differs in gene composition from PAO1 and PA7 strains, but is identical to that found in three recently sequenced *exlA*⁺ isolates: AR441 (GenBank: CP029093.1), AR_0356 (GenBank: CP027169.1) and CR1 (GenBank: CP020560.1).

CLJ-ISL3 inactivates the *imu* operon encoding translesion synthesis machinery

Another location of the CLJ-ISL3 element in the CLJ1 and CLJ3 genomes was within the *imu* operon, also known as the mutagenesis cassette (Fig. 5d). The *imu* operon encodes the ImuC polymerase (formerly DnaE2) and other components of translesion synthesis (TLS), which can bypass lesions caused by DNA damage. The ImuC polymerase in *Pseudomonas* contributes to tolerance to DNA alkylation agents [85], and inactivation of the operon could limit the accumulation of mutations. Interestingly, *P. aeruginosa* isolates from patients with CF frequently display a hypermutator phenotype, primarily linked to inactivation of *mutS*. This phenotype has previously been suggested to be advantageous for bacterial adaptation to the niche in CF lungs [86]. The *mutS* gene was identical and intact in CLJ1 and CLJ3, and the predicted proteins differed from the MutS in PA7 by a single amino acid at position 593 (threonine in PA7, serine in CLJ1/CLJ3). Consequently, the physiological impact of inactivation of the TLS system is unclear. Two additional DNA-repair proteins, RecN (CLJ1_5150) and RecA (CLJ1_1263), were over-represented in CLJ3 at both the transcriptome and the proteome levels (Table S10), suggesting an interplay between different mechanisms to defend against uncontrolled mutational rates induced by a hostile environment. More than 600 SNPs were found between CLJ1 and CLJ3, a rate about six times higher than that recorded for sequential isolates in the same CF patients over 8.8 years in one study [10] and almost ten times higher than the mutations reported in a matched isolate pair, collected from a single patient with a 7.5-year interval in another study [12]. However, yet another study indicated that some strains isolated from non-CF patients could have between 176 and 736 SNPs [9]. Although we could not precisely account for the role of the SNPs detected, they may

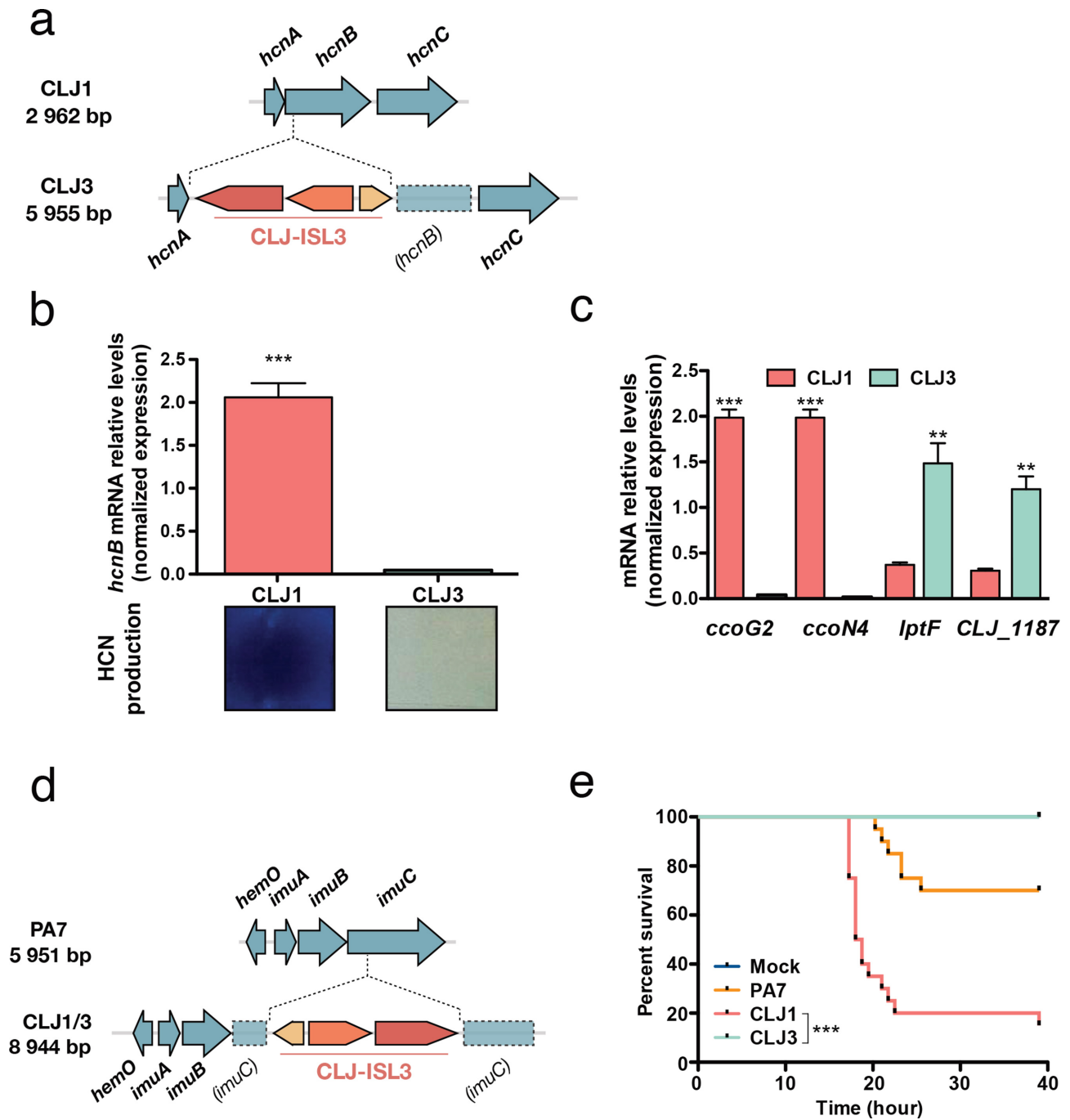


Fig. 5. Expression of virulence factors and pathogenicity. (a) The *hcn* operon in CLJ1 and insertion of CLJ-ISL3 into the *hcnB* gene in CLJ3. (b) Relative expression of *hcnB* measured by RT-qPCR and HCN production in the strains indicated. Statistical significance was determined using a *t*-test. *** $P < 0.001$. HCN production was detected by placing a paper impregnated with a reaction mixture containing Cu^{2+} ions above agar plates seeded with bacteria. A white-to-blue colour transition indicates the presence of HCN in the gas phase. (c) RT-qPCR analysis of the relative expression of *ccoG2*, *ccoN4*, *lptF* and *CLJ_1187* in CLJ1 and CLJ3 strains. Bars, SEM. Statistical significance was determined using a *t*-test. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. (d) Insertion of CLJ-ISL3 into the *imuABC* operon. (e) Survival of *Galleria* following injection of different strains. Twenty larvae were infected with 5–10 bacteria (estimated from c.f.u. counts) and their survival was monitored over the indicated period. PBS was injected as a vehicle-control. *** $P < 0.001$.

contribute to differences in gene expression between the two isolates that could not be directly attributed to ISs.

The two CLJ clones show different pathogenic potential in *G. mellonella*

To assess the overall virulence of the two strains in a whole organism, we used the wax moth (*Galleria*) infection model, and monitored the survival of infected larvae following inoculation with the different strains. Under the same infection conditions, the CLJ1 strain was found to be more virulent than the PA7 strain, and CLJ3 was unable to kill *Galleria* larvae (Fig. 5e). This result indicates that CLJ3, in the process of gaining resistance to antimicrobials, lost its virulence potential, a finding that agrees with our previous observation that CLJ3 is sensitive to serum (Fig. 3b) and less cytotoxic due to loss of its ability to secrete Exolysin [16]. More than 40 CLJ-ISL3 ISs were detected in the CLJ3 genome, some within or upstream of genes encoding hypothetical proteins or putative regulators (Table S7), and some of which may have influenced fitness of the CLJ3 strain in the *Galleria* model of infection. Thus, we found that ISs contributed significantly to the pathogenicity of the CLJ1 strain and to the multi-drug resistance of CLJ3. As the two isolates may have coexisted in the patient's lungs, we can conclude that ISs determined the overall success of the CLJ lineage in establishing lethal infection.

DISCUSSION

P. aeruginosa strains from the group of taxonomic outliers are abundant in humid environments [18, 19, 87, 88] and, based on a previous study, are considered to be innocuous [89]. Here, we present the results of a multiomics approach applied to two recent clinical isolates, CLJ1 and CLJ3, members of the same group of taxonomic outliers. The results provided insights into genome-wide modifications that provided these bacteria with the tools to successfully colonize and disseminate within the human host. We found the genomes of both strains to be highly dynamic and to evolve within the patient due to high numbers of ISs. General pathogenic and survival traits, e.g. motility, adhesion and resistance to antimicrobials, were modulated by the CLJ-ISL3 element. The later isolate, CLJ3, had acquired resistance toward antibiotics with which the patient was treated during hospitalization, and some ISs directly affected components involved in resistance. Compared to the early colonizer CLJ1, the CLJ3 strain also displayed higher intracellular levels of c-di-GMP, higher expression of the biofilm-associated adhesion protein CdrA, and had lost part of its LPS due to deletion of the *galU* gene. All these features promoted adaptation to a lifestyle associated with chronic infection. Moreover, by bioinformatics screening we identified 36 additional IS elements in the CLJ3 genome, and these probably contributed to other phenotypic changes which were not assessed in this study. In addition to previously known virulence determinants, several of the genes that were differentially expressed here were annotated as 'hypothetical' by RAST automated annotation technology.

Their contribution to *P. aeruginosa*'s adaptation to life within a human host should now be further explored.

Although the precise origin of the CLJ-ISL3 identified in the CLJ lineage is unknown, we speculate that it was acquired from another bacterial species present in the environment. Indeed, the GC content of the CLJ1-ISL3 sequence is 54.8 %, whereas in the rest of the *P. aeruginosa* genome it is 66.6 %, suggesting recent acquisition by horizontal transfer. Initial disruption of the genes encoding flagellar components and pili by this sequence may have allowed the CLJ strain to evade the patient's immune defences. By increasing its capacity to secrete the pore-forming toxin Exolysin, the strain acquired an additional advantage allowing it to further damage the host epithelium and endothelial tissues to promote its dissemination.

Previous studies have indicated that the contribution of ISs to the adaptation of *P. aeruginosa* to the environment in patients with CF is low, with limited numbers of transposition events occurring during chronic infection [90]. This finding contrasts with reports on *in vitro* evolution experiments with *E. coli* [91, 92]. A search of the *Pseudomonas* database [28] with the nucleotide sequence of the CLJ1-ISL3 fragment revealed a total of 12 strains bearing 100 % identical fragments. Eight of these strains were isolated at Copenhagen University Hospital [93], and the four others in a Seattle-based hospital intensive care units [94]. The precise positions of CLJ-ISL3 in those genomes and the phenotypes produced by the disrupted gene(s) are currently unknown, but this knowledge could provide insights into whether and how the CLJ-ISL3 sequence contributes to the colonization process and the adaptation of those strains to a particular infectious niche. More recent genomic characterization of environmental *P. aeruginosa* isolates from dental unit waterlines showed that, in addition to the OSA loci, ISPa11 altered the genes for two master regulators, LasR and GacS, supporting the idea of a potential for ecological adaptation of *P. aeruginosa* through the integration of mobile elements [95]. Thus, in addition to small nucleotide changes in pathoadaptive genes, mobile genetic elements could drive the emergence of phenotypic traits allowing *P. aeruginosa* to adapt to the niche they encounter, and undoubtedly contribute to strain-specific pathogenicity. The overall contribution of ISs to the increase in the bacterial pathogenic arsenal is quite likely to be underestimated as we currently have limited access to closed bacterial genomes. New DNA sequencing technologies accessing genome fragments measuring tens or even hundreds of kilobases should shed light on the overall impact of mobile elements throughout bacterial evolution.

Funding information

This work was supported by grants from the French National Research Agency (ANR-15-CE11-0018-01), the Laboratory of Excellence GRAL (ANR-10-LABX-49-01) and the Fondation pour la Recherche Médicale (Team FRM 2017, DEQ20170336705). Proteomics experiments were partly supported by the Proteomics French Infrastructure (ANR-10-INBS-08-01). We further acknowledge support from CNRS, INSERM, CEA and University Grenoble Alpes. Work in S.

L.'s laboratory was supported by a grant from the Cystic Fibrosis Foundation. A.B.'s PhD research was funded by a fellowship from the CEA Irtelis programme. The funding bodies played no part in the design of the study, the collection, analysis or interpretation of data or in writing the manuscript. Funding for open access charges: French National Research Agency (ANR-15-CE11-0018-01).

Acknowledgements

The authors thank Maria Guillermina Casabona for early proteomics experiments on CLJ strains, and Yves Vandenbrouck (CEA, Grenoble), Frédéric Boyer (UGA, Grenoble) and François Lebreton (HMS, Boston) for advice on genome analysis. We express our particular thanks to Mylène Robert-Genthon and Florian Chenavier for RT-qPCR and PCR experiments and to Peter Panchev for performing the *Galleria* infection assays. We are grateful to Tim Tolker-Nielsen for the gift of the pUCP22-pcdRA-gfp(ASV)^c plasmid.

Author contributions

E. S. performed all the bioinformatics analyses of the data presented in this paper. P. B., A. B., G. B., Y. C. and A. A. performed experiments. S. L. provided materials. S. E. and I. A. designed the study and performed experiments. Y. C., S. E. and I. A. analysed the data. S. E. and I. A. wrote the manuscript. All authors participated in figure and table preparation and revision of the final version of the manuscript.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 2008;451:990–993.
- Bartoli C, Roux F, Lamichhane JR. Molecular mechanisms underlying the emergence of bacterial pathogens: an ecological perspective. *Mol Plant Pathol* 2016;17:303–310.
- Diard M, Hardt WD. Evolution of bacterial virulence. *FEMS Microbiol Rev* 2017;41:679–697.
- Aujoulat F, Roger F, Bourdier A, Lotthé A, Lamy B et al. From environment to man: genome evolution and adaptation of human opportunistic bacterial pathogens. *Genes* 2012;3:191–232.
- Silby MW, Winstanley C, Godfrey SA, Levy SB, Jackson RW. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35:652–680.
- Xin XF, Kvitko B, He SY. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2018;16:316–328.
- Cullen L, McClean S. Bacterial adaptation during chronic respiratory infections. *Pathogens* 2015;4:66–89.
- Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O et al. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* 2012;10:841–851.
- Hilliam Y, Moore MP, Lamont IL, Bilton D, Haworth CS et al. *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and diversification in the non-cystic fibrosis bronchiectasis lung. *Eur Respir J* 2017;49:1602108.
- Marvig RL, Damkiær S, Khademi SM, Markussen TM, Molin S et al. Within-host evolution of *Pseudomonas aeruginosa* reveals adaptation toward iron acquisition from hemoglobin. *mBio* 2014;5:e00966–00914.
- Marvig RL, Johansen HK, Molin S, Jelsbak L. Genome analysis of a transmissible lineage of *Pseudomonas aeruginosa* reveals patho-adaptive mutations and distinct evolutionary paths of hypermutators. *PLoS Genet* 2013;9:e1003741.
- Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR et al. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *PNAS USA* 2006;103:8487–8492.
- Kos VN, Déraspe M, McLaughlin RE, Whiteaker JD, Roy PH et al. The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:427–436.
- Thrane SW, Taylor VL, Freschi L, Kukavica-Ibrulj I, Boyle B et al. The widespread multidrug-resistant serotype O12 *Pseudomonas aeruginosa* clone emerged through concomitant horizontal transfer of serotype antigen and antibiotic resistance gene clusters. *mBio* 2015;6:e01396–01315.
- Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:654–665.
- Elsen S, Huber P, Bouillot S, Couté Y, Fournier P et al. A type III secretion negative clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* employs a two-partner secreted exolysin to induce hemorrhagic pneumonia. *Cell Host Microbe* 2014;15:164–176.
- Roy PH, Tetu SG, Larouche A, Elbourne L, Tremblay S et al. Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PLoS One* 2010;5:e8842.
- Selezska K, Kazmierczak M, Mücken M, Garbe J, Schober M et al. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited under environmental focus: impact of water quality and phage pressure. *Environ Microbiol* 2012;14:1952–1967.
- Wiehlmann L, Cramer N, Tümmler B. Habitat-associated skew of clone abundance in the *Pseudomonas aeruginosa* population. *Environ Microbiol Rep* 2015;7:955–960.
- Huber P, Basso P, Reboud E, Attrée I. *Pseudomonas aeruginosa* renews its virulence factors. *Environ Microbiol Rep* 2016;8:564–571.
- Reboud E, Basso P, Maillard AP, Huber P, Attrée I. Exolysin shapes the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clonal outliers. *Toxins* 2017;9:364.
- Reboud E, Elsen S, Bouillot S, Golovkine G, Basso P et al. Phenotype and toxicity of the recently discovered *exlA*-positive *Pseudomonas aeruginosa* strains collected worldwide. *Environ Microbiol* 2016;18:3425–3439.
- Basso P, Wallet P, Elsen S, Soleilhac E, Henry T et al. Multiple *Pseudomonas* species secrete exolysin-like toxins and provoke Caspase-1-dependent macrophage death. *Environ Microbiol* 2017;19:4045–4064.
- Huber P, Basso P, Reboud E, Attrée I. *Pseudomonas aeruginosa* renews its virulence factors. *Environ Microbiol Rep* 2016;8:564–571.
- Bouillot S, Munro P, Gallet B, Reboud E, Cretin F et al. *Pseudomonas aeruginosa* Exolysin promotes bacterial growth in lungs, alveolar damage and bacterial dissemination. *Sci Rep* 2017;7:2120.
- Choi KH, Kumar A, Schweizer HP. A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbiol Methods* 2006;64:391–397.
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 2008;9:75.
- Winsor GL, Griffiths EJ, Lo R, Dhillon BK, Shay JA et al. Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res* 2016;44:D646–D653.
- Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R et al. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res* 2009;19:1639–1645.
- Treepong P, Guyeux C, Meunier A, Couchoud C, Hocquet D et al. panIsa: ab initio detection of insertion sequences in bacterial genomes from short read sequence data. *Bioinformatics* 2018;34:3795–3800.
- Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv* 2013:1303.3997.
- Han K, Tjaden B, Lory S. GRIL-seq provides a method for identifying direct targets of bacterial small regulatory RNA by in vivo proximity ligation. *Nat Microbiol* 2017;2:16239.
- Casabona MG, Vandenbrouck Y, Attrée I, Couté Y. Proteomic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 inner membrane. *Proteomics* 2013;13:2419–2423.
- Wieczorek S, Combes F, Lazar C, Gai Gianetto Q, Gatto L et al. DAPAR & ProStaR: software to perform statistical analyses in

- quantitative discovery proteomics. *Bioinformatics* 2017;33:135–136.
35. Vizcaíno JA, Csordas A, del-Toro N, Dianes JA, Griss J et al. 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res* 2016;44:D447–D456.
 36. Rybtke MT, Borlee BR, Murakami K, Irie Y, Hentzer M et al. Fluorescence-based reporter for gauging cyclic di-GMP levels in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 2012;78:5060–5069.
 37. Zlosnik JE, Gunaratnam LC, Speert DP. Serum susceptibility in clinical isolates of Burkholderia cepacia complex bacteria: development of a growth-based assay for high throughput determination. *Front Cell Infect Microbiol* 2012;2:67.
 38. Berry A, Han K, Trouillon J, Robert-Genthon M, Ragno M et al. cAMP and Vfr Control Exolysin Expression and Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* Taxonomic Outliers. *J Bacteriol* 2018; 200.
 39. Mathee K, Narasimhan G, Valdes C, Qiu X, Matewish JM et al. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *PNAS USA* 2008;105:3100–3105.
 40. Smith DJ, Park J, Tiedje JM, Mohn WW. A large gene cluster in *Burkholderia xenovorans* encoding abietane diterpenoid catabolism. *J Bacteriol* 2007;189:6195–6204.
 41. Kung VL, Ozer EA, Hauser AR. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010;74:621–641.
 42. Klockgether J, Cramer N, Wiehlmann L, Davenport CF, Tümmler B. *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Front Microbiol* 2011;2:150.
 43. Kus JV, Tullis E, Cvitkovitch DG, Burrows LL. Significant differences in type IV pilin allele distribution among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis (CF) versus non-CF patients. *Microbiology* 2004;150:1315–1326.
 44. Sana TG, Berni B, Bleves S. The T6SSs of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PA01 and Their Effectors: Beyond Bacterial-Cell Targeting. *Front Cell Infect Microbiol* 2016;6:61.
 45. Giraud C, Bernard CS, Calderon V, Yang L, Filloux A et al. The PprA-PprB two-component system activates CupE, the first non-archetypal *Pseudomonas aeruginosa* chaperone-usher pathway system assembling fimbriae. *Environ Microbiol* 2011;13:666–683.
 46. Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P et al. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;57:81–91.
 47. Siguier P, Perochon J, Lestrade L, Mahillon J, Chandler M. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res* 2006;34:D32–D36.
 48. Castro-Jaimes S, Salgado-Camargo AD, Graña-Miraglia L, Lozano L, Bocanegra-Ibarias P et al. Complete genome sequence of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate obtained from a mexican hospital (sequence type 422). *Genome Announc* 2016;4.
 49. Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L, He J, Lanczycki CJ et al. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res* 2017;45:D200–D203.
 50. Siguier P, Gourbeyre E, Chandler M. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol Rev* 2014; 38:865–891.
 51. Vandecraen J, Chandler M, Aertsen A, van Houdt R. The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. *Crit Rev Microbiol* 2017;43:709–730.
 52. Martinez E, Pérez JE, Márquez C, Vilacoba E, Centrón D et al. Emerging and existing mechanisms co-operate in generating diverse β -lactam resistance phenotypes in geographically dispersed and genetically disparate *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Glob Antimicrob Resist* 2013;1:135–142.
 53. Sun Q, Ba Z, Wu G, Wang W, Lin S et al. Insertion sequence ISRP10 inactivation of the *oprD* gene in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2016;47:375–379.
 54. Vassilara F, Galani I, Souli M, Papanikolaou K, Giamarellou H et al. Mechanisms responsible for imipenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates exposed to imipenem concentrations within the mutant selection window. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017;88:276–281.
 55. Wołkiewicz T, Patzer JA, Kamińska W, Gierczyński R, Dzierżanowska D. Distribution of carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* isolates among hospitalised children in Poland: characterisation of two novel insertion sequences disrupting the *oprD* gene. *J Glob Antimicrob Resist* 2016;7: 119–125.
 56. Lindberg F, Lindquist S, Normark S. Inactivation of the *ampD* gene causes semiconstitutive overproduction of the inducible *Citrobacter freundii* beta-lactamase. *J Bacteriol* 1987;169:1923–1928.
 57. Pérez-Gallego M, Torrens G, Castillo-vera J, Moya B, Zamorano L et al. Impact of AmpC derepression on fitness and virulence: the mechanism or the pathway? *mBio* 2016;7.
 58. Lee M, Artola-Recolons C, Carrasco-López C, Martínez-Caballero S, Heseck D et al. Cell-wall remodeling by the zinc-protease AmpDh3 from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Am Chem Soc* 2013; 135:12604–12607.
 59. Vollmer W, von Rechenberg M, Höltje JV. Demonstration of molecular interactions between the murein polymerase PBP1B, the lytic transglycosylase MltA, and the scaffolding protein MipA of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1999;274:6726–6734.
 60. Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2015;28:337–418.
 61. Shah P, Swiatlo E. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Mol Microbiol* 2008;68:4–16.
 62. Dean CR, Goldberg JB. *Pseudomonas aeruginosa galU* is required for a complete lipopolysaccharide core and repairs a secondary mutation in a PA103 (serogroup O11) *wbpM* mutant. *FEMS Microbiol Lett* 2002;210:277–283.
 63. Priebe GP, Dean CR, Zaidi T, Meluleni GJ, Coleman FT et al. The *galU* Gene of *Pseudomonas aeruginosa* is required for corneal infection and efficient systemic spread following pneumonia but not for infection confined to the lung. *Infect Immun* 2004;72:4224–4232.
 64. Arora SK, Bangera M, Lory S, Ramphal R. A genomic island in *Pseudomonas aeruginosa* carries the determinants of flagellin glycosylation. *PNAS USA* 2001;98:9342–9347.
 65. Feuillet V, Medjane S, Mondor I, Demaria O, Pagni PP et al. Involvement of toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *PNAS USA* 2006;103:12487–12492.
 66. Tammam S, Sampaleanu LM, Koo J, Manoharan K, Daubaras M et al. PilMNOPQ from the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus system form a transenvelope protein interaction network that interacts with PilA. *J Bacteriol* 2013;195:2126–2135.
 67. Basso P, Ragno M, Elsen S, Reboud E, Golovkine G et al. *Pseudomonas aeruginosa* Pore-Forming exolysin and Type IV Pili cooperate to induce host cell lysis. *mBio* 2017;8.
 68. Borlee BR, Goldman AD, Murakami K, Samudrala R, Wozniak DJ et al. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesion to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol Microbiol* 2010;75:827–842.
 69. Faure LM, Garvis S, de Bentzmann S, Bigot S. Characterization of a novel two-partner secretion system implicated in the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2014;160:1940–1952.
 70. Kida Y, Higashimoto Y, Inoue H, Shimizu T, Kuwano K. A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF-kappaB through protease-activated receptors. *Cell Microbiol* 2008; 10:1491–1504.
 71. Melvin JA, Gaston JR, Phillips SN, Springer MJ, Marshall CW et al. *Pseudomonas aeruginosa* Contact-Dependent Growth

- Inhibition Plays Dual Role in Host-Pathogen Interactions. *mSphere* 2017;2.
72. Mercy C, Ize B, Salcedo SP, de Bentzmann S, Bigot S. Functional characterization of *Pseudomonas* Contact dependent growth inhibition (CDI) Systems. *PLoS One* 2016;11:e0147435.
 73. Blumer C, Haas D. Iron regulation of the hcnABC genes encoding hydrogen cyanide synthase depends on the anaerobic regulator ANR rather than on the global activator GacA in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Microbiology* 2000;146:2417–2424.
 74. Carterson AJ, Morici LA, Jackson DW, Frisk A, Lizewski SE et al. The transcriptional regulator AlgR controls cyanide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2004;186:6837–6844.
 75. Carroll W, Lenney W, Wang T, Spanel P, Alcock A et al. Detection of volatile compounds emitted by *Pseudomonas aeruginosa* using selected ion flow tube mass spectrometry. *Pediatr Pulmonol* 2005;39:452–456.
 76. Ryall B, Davies JC, Wilson R, Shoemark A, Williams HD. *Pseudomonas aeruginosa*, cyanide accumulation and lung function in CF and non-CF bronchiectasis patients. *Eur Respir J* 2008;32:740–747.
 77. Frangipani E, Pérez-Martínez I, Williams HD, Cherbuin G, Haas D. A novel cyanide-inducible gene cluster helps protect *Pseudomonas aeruginosa* from cyanide. *Environ Microbiol Rep* 2014;6:28–34.
 78. Hirai T, Osamura T, Ishii M, Arai H. Expression of multiple *ccb*₃ cytochrome *c* oxidase isoforms by combinations of multiple isosubunits in *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS USA* 2016;113:12815–12819.
 79. Firoved AM, Ornatowski W, Deretic V. Microarray analysis reveals induction of lipoprotein genes in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*: implications for inflammation in cystic fibrosis. *Infect Immun* 2004;72:5012–5018.
 80. Damron FH, Napper J, Teter MA, Yu HD. Lipotoxin F of *Pseudomonas aeruginosa* is an AlgU-dependent and alginate-independent outer membrane protein involved in resistance to oxidative stress and adhesion to A549 human lung epithelia. *Microbiology* 2009;155:1028–1038.
 81. Fortier LC, Sekulovic O. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence* 2013;4:354–365.
 82. Winstanley C, Langille MG, Fothergill JL, Kukavica-Ibrulj I, Paradis-Bleau C et al. Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Res* 2009;19:12–23.
 83. Matsui H, Sano Y, Ishihara H, Shinomiya T. Regulation of pyocin genes in *Pseudomonas aeruginosa* by positive (*prtN*) and negative (*prtR*) regulatory genes. *J Bacteriol* 1993;175:1257–1263.
 84. McFarland KA, Dolben EL, Leroux M, Kambara TK, Ramsey KM et al. A self-lysis pathway that enhances the virulence of a pathogenic bacterium. *PNAS USA* 2015;112:8433–8438.
 85. Jatsenko T, Sidorenko J, Saumaa S, Kivisaar M. DNA polymerases ImuC and DinB are involved in DNA alkylation damage tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *PLoS One* 2017;12:e0170719.
 86. Oliver A, Cantón R, Campo P, Baquero F, Blázquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 2000;288:1251–1253.
 87. Boukerb AM, Decor A, Ribun S, Tabaroni R, Rousset A et al. Genomic rearrangements and functional diversification of *lecA* and *lecB* lectin-coding regions impacting the efficacy of glycomimetics directed against *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 2016;7:811.
 88. Boukerb AM, Marti R, Cournoyer B. Genome sequences of three strains of the *Pseudomonas aeruginosa* PA7 clade. *Genome Announc* 2015;3.
 89. Hilker R, Munder A, Klockgether J, Losada PM, Chouvarine P et al. Interclonal gradient of virulence in the *Pseudomonas aeruginosa* pangenome from disease and environment. *Environ Microbiol* 2015;17:29–46.
 90. Rau MH, Marvig RL, Ehrlich GD, Molin S, Jelsbak L. Deletion and acquisition of genomic content during early stage adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to a human host environment. *Environ Microbiol* 2012;14:2200–2211.
 91. Gaffé J, McKenzie C, Maharjan RP, Coursange E, Ferenci T et al. Insertion sequence-driven evolution of *Escherichia coli* in chemostats. *J Mol Evol* 2011;72:398–412.
 92. Raeside C, Gaffé J, Deatherage DE, Tenaillon O, Briska AM et al. Large chromosomal rearrangements during a long-term evolution experiment with *Escherichia coli*. *mBio* 2014;5:e01377–01314.
 93. Marvig RL, Sommer LM, Molin S, Johansen HK. Convergent evolution and adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* within patients with cystic fibrosis. *Nat Genet* 2015;47:57–64.
 94. Roach DJ, Burton JN, Lee C, Stackhouse B, Butler-Wu SM et al. A year of infection in the intensive care unit: prospective whole genome sequencing of bacterial clinical isolates reveals cryptic transmissions and novel microbiota. *PLoS Genet* 2015;11:e1005413.
 95. Vincent AT, Freschi L, Jeukens J, Kukavica-Ibrulj I, Emond-Rheault JG et al. Genomic characterisation of environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dental unit waterlines revealed the insertion sequence ISPa11 as a chaotropic element. *FEMS Microbiol Ecol* 2017;93.

Five reasons to publish your next article with a Microbiology Society journal

1. The Microbiology Society is a not-for-profit organization.
2. We offer fast and rigorous peer review – average time to first decision is 4–6 weeks.
3. Our journals have a global readership with subscriptions held in research institutions around the world.
4. 80% of our authors rate our submission process as 'excellent' or 'very good'.
5. Your article will be published on an interactive journal platform with advanced metrics.

Find out more and submit your article at microbiologyresearch.org.

1 **Supporting Information**

2 **Insertion sequences drive the emergence of a highly adapted**
3 **human pathogen**

4 Erwin Sentausa^{1#}, Pauline Basso¹⁺, Alice Berry¹, Annie Adrait², Gwendoline
5 Bellement^{1,2∞}, Yohann Couté², Stephen Lory³, Sylvie Elsen^{1*} and Ina Attrée^{1*}

6
7 *Corresponding authors: ina.attree-delic@cea.fr; sylvie.elsen@cea.fr.

8
9 **The supplementary information includes:**

10 Supplementary Materials and Methods

11 Supplementary References

12 Supplementary Figure S1

13 Supplementary Tables S1 to S11

14

15

16

17

18 **Supplementary Materials and Methods**

19 **Genome sequencing, assembly, annotation and comparison**

20 Bacterial DNA was extracted using the EZ-10 Spin Column Bacterial Genomic DNA
21 Miniprep Kit (Bio Basic Inc., Canada). DNA extracted from CLJ1 bacteria was sequenced
22 on Illumina HiSeq 2000 systems at the Beijing Genomics Institute (China) in 2x50 base-
23 pairs (bp) paired-end mode, generating 12,333,368 reads with a genome coverage of 90-
24 100x. Reads were trimmed to remove low quality sequences (limit = 0.05) and ambiguous
25 nucleotides (maximum two nucleotides allowed). Reads were then assembled *de novo*
26 using CLC Genomics Workbench 9.0 (Qiagen, Aarhus, Denmark). In parallel, PacBio
27 (Base Clear, Leiden, Netherlands) technology was also used, providing 114,707 reads.
28 The resulting contigs were then combined with the Illumina reads using the “Join Contigs”
29 function in the CLC Genome Finishing Module version 1.6.1 (Qiagen). Contigs or
30 scaffolds consisting of fewer than 100 reads were filtered out, and BLAST [1] searches
31 were performed to identify and remove those that showed no match to *Pseudomonas*
32 sequences in GenBank [2]. CLJ3 genomic DNA was sequenced using Illumina MiSeq at
33 the Biopolymers Facility, Harvard Medical School, Boston, USA, in 150-bp single-end
34 runs, generating 2,495,173 reads. Quality trimming was performed using CLC Genomics
35 Workbench 9.0, applying the same parameters as those used for CLJ1, followed by *de*
36 *novo* assembly with a minimal contig length of 1 kb. The order of both CLJ1 and CLJ3
37 scaffolds or contigs was determined based on the genome sequence of PA7 strain using
38 the “move contigs” tool in Mauve Genome Alignment Software (version snapshot_2015-
39 02-13) [3]. Average nucleotide identity between genomes was estimated using the ANI
40 calculator tool on the enveomics collection server [4] with minimum alignment length,

41 identity, and number set to 700 bp, 70%, and 50, respectively, using a 1,000-bp window
42 size and 200-bp step size. SNPs between CLJ1 and CLJ3 genomes were detected by
43 mapping trimmed CLJ3 reads to the CLJ1 genome in CLC Genomics Workbench 9.0,
44 and then using the Basic Variant Detection 1.71 tool in the Workbench with the following
45 parameters: Ploidy = 1, Ignore positions with coverage above = 100,000, Restrict calling
46 to target regions = Not set, Ignore broken pairs = Yes, Ignore non-specific matches =
47 Reads, Minimum coverage = 10, Minimum count = 2, Minimum frequency (%) = 35.0,
48 Base quality filter = Yes, Neighborhood radius = 5, Minimum central quality = 20, Minimum
49 neighborhood quality = 15, Read direction filter = No, Relative read direction filter = Yes,
50 Significance (%) = 1.0, Read position filter = No, Remove pyro-error variants = No.
51 Clusters of Orthologous Groups (COG) annotation was performed using the WebMGA
52 server [5] with an E-value cutoff of 0.001. Subcellular localizations of PA7 proteins were
53 retrieved from the Pseudomonas Genome Database, whereas those of CLJ1 and CLJ3
54 proteins were predicted using PSORTb version 3.0.2 [6] and LocTree3 [7]. Orthologous
55 genes across the strains were identified using OrthoMCL version 2.0.9 [8], with a BLASTp
56 E-value cutoff of 1×10^{-5} and the default Markov cluster algorithm (MCL) inflation
57 parameter of 1.5.

58 **Transcriptome Analysis**

59 The Illumina libraries were prepared and sequenced at the Biopolymer Facility, Harvard
60 Medical School, Boston, USA. Illumina HiSeq 2500 was used for the sequencing with 50-
61 bp single-end runs, generating 3,225,727 and 21,633,018 reads for CLJ1 and 2,139,035
62 and 56,804,547 reads for CLJ3. For each replicate, raw RNA-Seq reads were trimmed in
63 CLC Genomics Workbench 9.0 using the same parameters as for genome sequencing

64 reads. The trimmed reads were then mapped to the annotated CLJ1 genome using the
65 RNA-Seq analysis tool. The total number of reads mapped to the genes was incorporated
66 into a table and analyzed as raw counts using the DESeq2 differential expression analysis
67 pipeline (87). DESeq2 performs internal normalization for sequencing depth and RNA
68 composition using the median of ratios method. DESeq2 then fits negative binomial
69 generalized linear models for each gene and uses the Wald test for significance testing.
70 Genes that were differentially expressed between CLJ1 and CLJ3 were identified after
71 applying a 5% False Discovery Rate (FDR) filter.

72

73 **Proteomics**

74 Sample preparation. Whole-cell extracts. Overnight cultures of CLJ1 were diluted to an
75 OD₆₀₀ of 0.1 in 30 mL culture broth and then the cultures were incubated at 37 °C under
76 shaking until they reached OD₆₀₀ 0.8. CLJ3 was left overnight at room temperature and
77 then cultured at 37 °C under shaking to OD₆₀₀ 0.8. The 30-mL bacterial cultures were
78 then centrifuged at 6,000 rpm, 4 °C for 10 min, and supernatants were filtered on 0.22-
79 µm filters. Total membranes separation. Pellets were re-suspended in 1 mL of 10 mM
80 Tris-HCl (pH8), 20% sucrose buffer supplemented with protease inhibitors cocktail (PIC,
81 Roche, Basel, Switzerland) and cells were disrupted by sonication. Intact bacteria were
82 removed by centrifugation at 8,000 rpm for 10 min at 4 °C. The total membrane fraction
83 was then collected by ultracentrifugation at 200,000 g for 1 h at 4 °C. The pelleted fraction
84 was washed twice with 1 mL of 10 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, pH8, supplemented with
85 PIC, and re-suspended in 500 µL of the same buffer. Supernatant fraction. Proteins
86 contained in supernatants were precipitated by a TCA-sarkosyl method (0.5% final

87 volume of sarkosyl and 7.5% final volume of TCA) for 2 h on ice and centrifuged at 12,000
88 rpm for 15 min at 4°C. Pellets were washed twice with tetrahydrofuran, and re-suspended
89 in 50 µL of Laemmli loading buffer. Samples prepared in triplicate were then analyzed by
90 SDS-PAGE and immunoblotting using antibodies directed against three synthetic ExIA
91 peptides ([9], 1:1 000); against RpoA (1:5 000), as a control for whole-cell; against TagQ
92 ([10], 1:10 000), to track the membrane fraction; and against DsbA (1:2 000), to monitor
93 the periplasm fraction. Antibody binding was revealed using appropriate HRP-coupled
94 secondary antibodies, anti-rabbit (1:50 000) and anti-mouse (1:5 000) (Sigma-Aldrich).
95 Western blots were developed using Luminata Crescendo Western HRP (Millipore)
96 substrate.

97 Mass spectrometry-based quantitative proteomic analyses. Protein extracts were
98 prepared as described in [11]. Briefly, proteins were stacked in the top of an SDS-PAGE
99 gel (NuPAGE 4-12%, ThermoFisher Scientific), and stained with Coomassie blue (R250,
100 Bio-Rad) before in-gel digestion using modified trypsin (Promega, sequencing grade).
101 Resulting peptides were analyzed by nanoliquid chromatography coupled to tandem
102 mass spectrometry (Ultimate 3000 coupled to LTQ-Orbitrap Velos Pro, Thermo Scientific)
103 using a 120-min gradient (2 analytical replicates per biological replicate). RAW files were
104 processed using MaxQuant [12] version 1.5.3.30. The protein contents of total,
105 membrane, and secretome proteomes from CLJ1 and CLJ3 were analyzed
106 independently. Spectra were searched against an in-house CLJ database and the
107 frequently-observed contaminants database included in MaxQuant. Trypsin was selected
108 as the enzyme, and two missed cleavages were allowed. Peptide modifications allowed
109 during the search were: carbamidomethylation (C, fixed), acetyl (Protein N-ter, variable)

110 and oxidation (M, variable). Minimum peptide length was set to seven amino acids.
111 Minimum number of peptides, razor + unique peptides and unique peptides were all set
112 to 1. Maximum FDRs - calculated by employing a reverse database strategy - were set
113 to 0.01 at peptide and protein levels. Intensity-based absolute quantification values iBAQ
114 [13] were calculated from MS intensities of unique+razor peptides. Statistical analyses
115 were performed using ProStaR [14]. Proteins identified in the reverse and contaminant
116 databases, proteins only identified by site (corresponding to proteins only identified by
117 peptides that carry one or more modified amino acids), and proteins exhibiting fewer than
118 three iBAQ values in any one condition were discarded from the list. After log₂
119 transformation, intensity values were normalized by median centering before imputing
120 missing values (missing values were replaced by the 2.5 percentile value for each
121 column); statistical testing was conducted using a *limma* t-test. Differentially-recovered
122 proteins were sorted out using a log₂(fold change) cutoff of 2 and an FDR threshold on
123 remaining p-values of 1%, applying the Benjamini-Hochberg procedure. The various lists
124 were then combined. In total, this procedure produced a list of 2,852 quantified proteins.

125 **RT-qPCR**

126 Yield, purity and integrity of RNA were evaluated on a Nanodrop device and by agarose
127 gel migration. Complementary DNA was synthesized from 3 µg of RNA using the
128 SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen), with or without SuperScript III
129 RT enzyme to check for the presence of genomic DNA. The CFX96 Real-Time system
130 (Bio-Rad) was used to amplify the cDNA, and quantification was performed using SYBR
131 green fluorescent molecules. cDNA was incubated with 5 µL of Gotaq qPCR master mix
132 (Promega), and specific reverse and forward primers were used at a final concentration

133 of 125 nM in a total volume of 10 μ L. Cycle parameters for the real-time PCR were: 95 $^{\circ}$ C
134 for 2 min, 40 cycles of 95 $^{\circ}$ C for 15 s and 60 $^{\circ}$ C for 45 s, and finally a melting curve from
135 65 $^{\circ}$ C to 95 $^{\circ}$ C by 0.5- $^{\circ}$ C increments for 5 s to assess the specificity of the amplification.
136 To generate standard curves, serial dilutions of pooled cDNA from both CLJ strains were
137 used. Experiments were performed with three biological samples for each strain, in
138 duplicate, and the results were analyzed with the CFX manager software (Bio-Rad). The
139 relative expression of mRNAs was calculated using the $\Delta\Delta$ Cq method after normalizing
140 to *rpoD* reference Cq values.

141 **Supplementary References**

- 142 1. **Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z et al.** Gapped BLAST
143 and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids*
144 *research* 1997;25(17):3389-3402.
- 145 2. **Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW.** GenBank. *Nucleic*
146 *acids research* 2016;44(D1):D67-72.
- 147 3. **Darling AC, Mau B, Blattner FR, Perna NT.** Mauve: multiple alignment of
148 conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome research* 2004;14(7):1394-
149 1403.
- 150 4. **Rodriguez-R LM, Konstantinidis KT.** The enveomics collection: a toolbox for
151 specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. *PeerJ Preprints*
152 2016;4:e1900v1.
- 153 5. **Wu S, Zhu Z, Fu L, Niu B, Li W.** WebMGA: a customizable web server for fast
154 metagenomic sequence analysis. *BMC genomics* 2011;12:444.
- 155 6. **Yu NY, Wagner JR, Laird MR, Melli G, Rey S et al.** PSORTb 3.0: improved
156 protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and
157 predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* 2010;26(13):1608-1615.
- 158 7. **Goldberg T, Hecht M, Hamp T, Karl T, Yachdav G et al.** LocTree3 prediction of
159 localization. *Nucleic acids research* 2014;42(Web Server issue):W350-355.

- 160 8. **Li L, Stoeckert CJ, Jr., Roos DS.** OrthoMCL: identification of ortholog groups for
161 eukaryotic genomes. *Genome research* 2003;13(9):2178-2189.
- 162 9. **Elsen S, Huber P, Bouillot S, Coute Y, Fournier P et al.** A type III secretion
163 negative clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* employs a two-partner secreted
164 exolysin to induce hemorrhagic pneumonia. *Cell host & microbe* 2014;15(2):164-176.
- 165 10. **Casabona MG, Robert-Genthon M, Grunwald D, Attree I.** Defining Lipoprotein
166 Localisation by Fluorescence Microscopy. *Methods in molecular biology* 2017;1615:65-
167 74.
- 168 11. **Casabona MG, Vandembrouck Y, Attree I, Coute Y.** Proteomic characterization
169 of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 inner membrane. *Proteomics* 2013;13(16):2419-
170 2423.
- 171 12. **Cox J, Mann M.** MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized
172 p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature*
173 *biotechnology* 2008;26(12):1367-1372.
- 174 13. **Schwanhauser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J et al.** Global
175 quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 2011;473(7347):337-342.
- 176 14. **Wieczorek S, Combes F, Lazar C, Gai Gianetto Q, Gatto L et al.** DAPAR &
177 ProStaR: software to perform statistical analyses in quantitative discovery proteomics.
178 *Bioinformatics* 2017;33(1):135-136.

179

180

181 Figure S1 Legend

182 **Fig. S1 Details of whole-genome comparison between PA7 and CLJ strains**

183 The outer ring shows all the genes in the strains colored according to their COG (Clusters
184 of Orthologous Groups) functional categories, as listed in the legend. The three other
185 rings represent the PA7 (orange), CLJ3 (green), and CLJ1 (red) genomes. The color code
186 was as follows: white, the gene was absent from the genome; gray, the gene or its
187 homolog was present in a different position in the genome; black in the CLJ rings

188 correspond to gaps between contigs. The inner labels indicate CLJ-specific regions,
189 whereas the outer labels are PA7-specific regions (represented in RGPs or PSPA7 locus
190 numbers) described in Table S3 and Table S4, respectively.

191 **Table S1** Genome assembly and annotation statistics

192 **Table S2** RT-qPCR primers used

193 **Table S3** Specific regions of CLJ compared to PA7

194 **Table S4** Specific regions of PA7 compared to CLJ

195 **Table S5** Genes in CLJ-SR14

196 **Table S6** BLASTN search result of CLJ-ISL3 (2985 bp) against the ISfinder database
197 with E-value of 0

198 **Table S7** Prediction of CLJ-ISL3 insertions between contigs of CLJ3, as described in
199 Materials and Methods

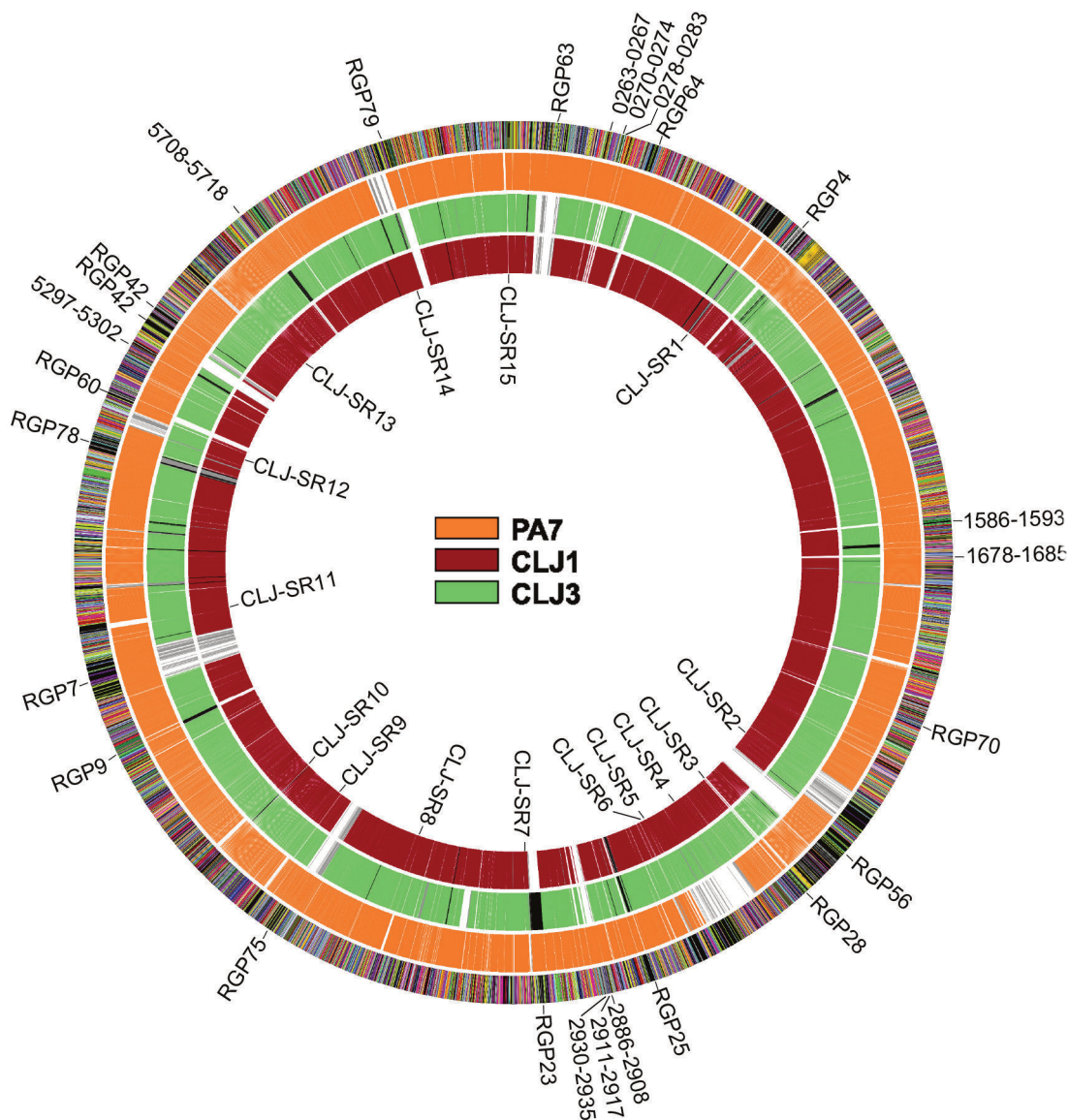
200 **Table S8** Differential proteomic analysis between CLJ1 and CLJ3 in total proteome,
201 membrane proteome, and secretome proteome

202 **Table S9** Differential gene expression analysis between CLJ1 and CLJ3

203 **Table S10** Genes/proteins that are statistically significantly differentially expressed
204 between CLJ1 and CLJ3 in both RNA-Seq and at least one of the proteomics datasets

205 **Table S11** CLJ phage-related regions

206



COG (Clusters of Orthologous Groups) functional categories

- RNA processing and modification
- Energy production and conversion
- Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
- Amino acid transport and metabolism
- Nucleotide transport and metabolism
- Carbohydrate transport and metabolism
- Coenzyme transport and metabolism
- Lipid transport and metabolism
- Translation, ribosomal structure and biogenesis
- Transcription
- Replication, recombination and repair
- Cell wall/membrane/envelope biogenesis
- Cell motility
- Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
- Inorganic ion transport and metabolism
- Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
- Signal transduction mechanisms
- Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
- Defense mechanisms
- Multiple classes
- General function prediction only
- Function unknown
- No COG

Figure S1

Table S1. Genome assembly and annotation statistics

	CLJ1	CLJ3
Number of contigs/scaffolds	68	135
Average coverage (x)	98.3	96.9
Contig/scaffold size (bp)	201-847201	1025-297138
Average contig/scaffold size (bp)	95801	47065
Contig/scaffold N50 (bp)	456227	97517
Total genome size (bp)	6514448	6353726
G+C content (%)	66.6	66.6
Protein coding sequences	6259	6107
tRNA	62	57
rRNA	9	3

Table S2. RT-qPCR primers used

Name	5'-3' sequence	Amplicon size
qPCR-hcnB-F qPCR-hcnB-R	TACGGTGATCTGCCGTTGTG GATCGCTGCAATAGCCGATG	152 bp
qPCR-pvdE-F qPCR-pvdE-R	CCAATCCCGAACCCCTACCTG TTCTCGCCGACGATGAAGAG	184 bp
qPCR-ampDH3-F qPCR-ampDH3-R	GCGACAACCTCAACGACACC CATTCTTCGGCGTCATGTCC	165 bp
qPCR-2958-F2 qPCR-2958-R2	CGGCATCGAGCACTGCTACT CCAGTTCGTGGCCGATGAT	152 bp
qPCR-ccoG2-F qPCR-ccoG2-R	GCTGGACCTGGAAAGCCTGT GGCGTCGTAGGAAACGATCA	160 bp
qPCR-ccoN4-F qPCR-ccoN4-R	TGGGCAATACCACCAAG CGGTGGTCAGGATGAACGAG	171 bp
oprD-up oprD-up	GGGTTTCATCGAAGACAGCAG TGCCTTGGGTGAAGCCGGATT	139 bp
uvrD-up uvrD-down	CATATCCTGGTGGACGAGTTCC CGCTGAACTGCTGGATGTTCTC	160 bp
rpoD-qPCR F1 rpoD-qPCR R1	GCG-CAA-CAG-CAA-TCT-CGT-CT ATC-CGG-GGC-TGT-CTC-GAA-TA	177 bp

Table S3. Specific regions of CLJ compared to PA7

Region	RGP ¹	CLJ1 locus	Number of genes	Features
CLJ-SR1	RGP66	0487-0494	8	Phage-related
CLJ-SR2	RGP29*	2128-2214	87	PAGI-2-like island
CLJ-SR3	RGP28	2316-2322	6	Mobile element proteins
CLJ-SR4	RGP27	2415-2573	160	Dit island
CLJ-SR5	RGP72	2579-2583	5	D-galactonate catabolism
CLJ-SR6	RGP26	2615-2621	7	Phage-related; lytic enzymes
CLJ-SR7	RGP23	2917-2924	7	Cup fimbria, Mobile element proteins; possible DNA helicase
CLJ-SR8		3303-3309	7	ABC transporter ATP-binding protein
CLJ-SR9		3607-3616	9	
CLJ-SR10	RGP15	3774-3784	11	Threonine dehydratase; ABC transporter proteins
CLJ-SR11		4314-4301	14	AlpBCDE-lysis cassette, phage-related
CLJ-SR12		4838-4876	39	Pyrrroloquinoline quinone synthesis proteins
CLJ-SR13		5192-5203	10	Phage related; accessory cholera enterotoxin
CLJ-SR14		5811-5871	55	Heavy metal resistance
CLJ-SR15		6156-6161	6	Phage-related

¹RGP: region of genomic plasticity, as defined in Mathee *et al.* (2008). The numbering corresponds to published RGPs. *CLJ strains do not share any genes with PA7 in the RGP.

Table S4. Specific regions of PA7 compared to CLJ

PSPA7 numbering	Number of genes	RGP ¹	Features
0069-0139	71	RGP63*	Type I restriction-modification system; mercury resistance cluster
0263-0267	5		Sulfate ester transport system
0270-0274	5		
0278-0283	6		<i>tonB2-exbB1-exbD1</i> operon
0355-0369	15	RGP64*	Phage-related
0776-0788	12	RGP4*	Phage-related
1586-1593	8		Polymyxin and cationic antimicrobial peptide resistance cluster
1678-1685	8		Sulfur starvation utilization operon
2109-2112	4	RGP70	Probable transposase
2363-2435	73	RGP56*	Phage-related
2515-2526	10	RGP28	
2790-2795	6	RGP25	Hemagglutinins
2886-2908	23		Hcp secretion island-3 encoded type VI secretion system (H3-T6SS)
2911-2917	7		Methionine ABC transporters; monooxygenases
2930-2935	6		Alkanesulfonate assimilation; nitrate and nitrite ammonification
3034-3071	37	RGP23	Pyocin killing protein; cup fimbria, phage-related
3695-3747	53	RGP75*	Conjugal transfer protein cluster; resistance genes; transcriptional regulators
4281-4289	9	RGP9	Rieske family iron-sulfur cluster-binding protein
4427-4530	103	RGP7	pKLC102-like, Type IV B pilus protein cluster
5053-5075	23	RGP78	Phage-related
5143-5160	17	RGP60*	Phage-related, type IV pilin accessory protein
5297-5302	6		Fimbrial chaperone/usher pathway E operon

5324-5357	34	RGP42	Mobile element proteins; Streptomycin phosphotransferase
5364-5378	15	RGP42	Phage-related
5708-5718	11		Arginine:pyruvate transaminase; 2-ketoarginine decarboxylase
6033-6063	31	RGP79*	Type I restriction-modification system

¹RGP: region of genomic plasticity, as defined in Mathee *et al.* (2008). The numbering corresponds to published RGPs. *PA7 does not share any genes with CLJ strains in the RGP.

Table S5. Genes in CLJ-SR14

PA7	CLJ1	CLJ3	RAST annotation
NA	CLJ1_5811	CLJ3_5608	MG(2+) CHELATASE FAMILY PROTEIN / ComM-related protein
NA	CLJ1_5814	CLJ3_5609	hypothetical protein
NA	CLJ1_5815	CLJ3_5610	hypothetical protein
NA	CLJ1_5817	CLJ3_0003	hypothetical protein
NA	CLJ1_5818	CLJ3_0004	Error-prone, lesion bypass DNA polymerase V (UmuC)
ns	CLJ1_5819	CLJ3_0005	hypothetical protein
ns	CLJ1_5820	CLJ3_0006	Mercuric ion reductase (EC 1.16.1.1)
ns	CLJ1_5821	CLJ3_0007	Mercuric transport protein, MerC
ns	CLJ1_5822	CLJ3_0008	Periplasmic mercury(+2) binding protein
ns	CLJ1_5823	CLJ3_0009	Mercuric transport protein, MerT
ns	CLJ1_5824	CLJ3_0010	Mercuric resistance operon regulatory protein
ns	CLJ1_5825	CLJ3_0011	hypothetical protein
NA	CLJ1_5826	CLJ3_0012	Sterol desaturase
NA	CLJ1_5827	CLJ3_0013	Transcriptional regulator, AraC family
NA	CLJ1_5828	CLJ3_0014	Lipoprotein signal peptidase (EC 3.4.23.36)
NA	CLJ1_5829	CLJ3_0015	hypothetical protein
NA	CLJ1_5830	CLJ3_0016	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcD
NA	CLJ1_5831	CLJ3_0017	COG3267: Type II secretory pathway, component ExeA (predicted ATPase)
NA	CLJ1_5832	CLJ3_0018	FIG131328: Predicted ATP-dependent endonuclease of the OLD family
ns	CLJ1_5833	CLJ3_0019	Mobile element protein
ns	CLJ1_5834	CLJ3_0020	Mobile element protein
NA	CLJ1_5836	CLJ3_6032	transcriptional regulator MvaT, P16 subunit, putative
ns	CLJ1_5837	CLJ3_6031	Gifsy-2 prophage protein
ns	CLJ1_5838	CLJ3_6030	Error-prone repair protein UmuD
ns	CLJ1_5839	CLJ3_6029	Error-prone, lesion bypass DNA polymerase V (UmuC)
NA	CLJ1_5840	CLJ3_6028	putative (L31491) ORF2; putative [Plasmid pTOM9]
NA	CLJ1_5841	CLJ3_6027	putative ORF1 [Plasmid pTOM9]
NA	CLJ1_5842	CLJ3_6026	NreA-like protein
NA	CLJ1_5843	CLJ3_6025	Inner membrane protein
NA	CLJ1_5844	CLJ3_6024	probable membrane protein YPO3302
NA	CLJ1_5845	CLJ3_6023	hypothetical protein
NA	CLJ1_5846	CLJ3_6022	hypothetical protein
NA	CLJ1_5847	CLJ3_6021	Chromate transport protein ChrA
NA	CLJ1_5848	CLJ3_6020	Chromate resistance protein ChrB
NA	CLJ1_5849	CLJ3_6019	Phage integrase family protein
NA	CLJ1_5851	CLJ3_6018	RuBisCO operon transcriptional regulator CbbR
NA	CLJ1_5852	CLJ3_6017	Phosphonate dehydrogenase (EC 1.20.1.1) (NAD-dependent phosphite dehydrogenase)
NA	CLJ1_5853	CLJ3_6016	Phosphonate ABC transporter permease protein phnE (TC 3.A.1.9.1)
NA	CLJ1_5854	CLJ3_6015	Phosphonate ABC transporter phosphate-binding periplasmic component (TC 3.A.1.9.1)
NA	CLJ1_5855	CLJ3_6014	Phosphonate ABC transporter ATP-binding protein (TC 3.A.1.9.1)
ns	CLJ1_5856	CLJ3_6013	FIG002188: hypothetical protein

ns	CLJ1_5857	CLJ3_6012	FIG067310: hypothetical protein
NA	CLJ1_5858	CLJ3_6011	hypothetical protein
ns	CLJ1_5859	CLJ3_6010	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase (EC 6.2.1.3)
NA	CLJ1_5860	gap	Enoyl-CoA hydratase (EC 4.2.1.17)
NA	CLJ1_5861	ns	Mobile element protein
NA	CLJ1_5862	ns	Mobile element protein
NA	CLJ1_5863	gap	transcriptional regulator, TetR family
NA	CLJ1_5864	CLJ3_5612	Error-prone, lesion bypass DNA polymerase V (UmuC)
NA	CLJ1_5866	ns	Mobile element protein
NA	CLJ1_5867	CLJ3_5613	hypothetical protein
NA	CLJ1_5868	CLJ3_5614	Mobile element protein
NA	CLJ1_5869	CLJ3_5615	hypothetical protein
NA	CLJ1_5870	CLJ3_5616	hypothetical protein
NA	CLJ1_5871	CLJ3_5617	hypothetical protein

NA: no orthologous gene is found in the corresponding genome, ns: orthologous gene(s) is/are found in other location(s) in the corresponding genome, gap: the gene location corresponds to a gap between contigs in the corresponding genome.

Table S6. BLASTN search result of CLJ-ISL3 (2985 bp) against the ISfinder database with E-value of 0.

Sequences producing significant alignments	IS Family	Origin	E-value	Identity (%)	Query length (bp)	Query coverage (%)	Gaps (%)
ISPst2	ISL3	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0,00	99,30	2984	100	0,43
ISPPu12	ISL3	<i>Pseudomonas putida</i>	0,00	99,27	3372	43	0,00
IS1396	ISL3	<i>Serratia marcescens</i>	0,00	99,27	1771	41	0,00
ISPst9	ISL3	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0,00	90,40	2472	41	0,00

Table S11. CLJ phage-related regions.

CLJ1 locus	Region	Number of genes	Corresponding PA7 locus	Mobility gene present
0462-0497	RGP66 (including CLJ-SR1)	36	PSPA7_0678-0716	Integrase
0535-0557	RGP3	23	PSPA7_0754-0775	None
2607-2624	RGP26 (including CLJ-SR6)	18	PSPA7_2648-2661	Integrase
4295-4314	Including CLJ-SR11	20	PSPA7_4602-4606	None
4778-4791	RGP78	14	PSPA7_5040-5080	Integrase
5192-5203	CLJ-SR13	12	NA	Integrase
5758-5774	Including RGP6	17	PSPA7_4699-4703	Integrase
6156-6161	CLJ-SR15	6	NA	None

NA: not applicable

Annexe 10 : Article concernant l'étude du rôle de la protéine du SST3 PscI chez *P. aeruginosa*, publié en Avril 2015 dans le journal « *Molecular Microbiology* ».

J'ai eu l'opportunité de travailler sur cette étude au cours de mon stage de Master 1 (4 mois) avec Laura Monlezun.

PscI is a type III secretion needle anchoring protein with *in vitro* polymerization capacities

Laura Monlezun,^{1,2,3,4} David Liebl,^{1,2,3,4}
Daphna Fenel,^{5,6,7} Teddy Grandjean,⁸ Alice Berry,^{1,2,3,4}
Guy Schoehn,^{5,6,7,9} Rodrigue Dessein,⁸
Eric Faudry^{1,2,3,4} and Ina Attree^{1,2,3,4*}

¹INSERM, UMR-S 1036, Biology of Cancer and Infection, Grenoble, France.

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

³Université Grenoble Alpes, F-38041 Grenoble, France.

⁴CEA, DSV/IRTSV, F-38054 Grenoble, France.

⁵Université Grenoble Alpes, Institut de Biologie Structurale (IBS), 71 avenue des Martyrs, 38044 Grenoble, France.

⁶CNRS and ⁷CEA, IBS, F-38044, Grenoble, France.

⁸Groupe de Recherche Translationnelle de la Relation Hôte-Pathogène, Faculté de Médecine de l'Université de Lille, 59000 Lille, France.

⁹Unit for Virus Host Cell Interactions UMI 3265 (UJF-EMBL-CNRS), 38027 Grenoble, France.

Summary

The export of bacterial toxins across the bacterial envelope requires the assembly of complex, membrane-embedded protein architectures. *Pseudomonas aeruginosa* employs type III secretion (T3S) injectisome to translocate exotoxins directly into the cytoplasm of a target eukaryotic cell. This multiprotein channel crosses two bacterial membranes and extends further as a needle through which the proteins travel. We show in this work that PscI, proposed to form the T3S system (T3SS) inner rod, possesses intrinsic properties to polymerize into flexible and regularly twisted fibrils and activates IL-1 β production in mouse bone marrow macrophages *in vitro*. We also found that point mutations within C-terminal amphipathic helix of PscI alter needle assembly *in vitro* and T3SS function in cell infection assays, suggesting that this region is essential for an efficient needle assembly. The overexpression of PscF partially compensates for the absence of the inner rod in PscI-deficient mutant by forming a secretion-proficient injectisome. All together, we propose that the polymerized PscI in

P. aeruginosa optimizes the injectisome function by anchoring the needle within the envelope-embedded complex of the T3S secretome and – contrary to its counterpart in *Salmonella* – is not involved in substrate switching.

Introduction

Many Gram-negative pathogens employ type III secretion systems (T3SS) to inject toxic proteins, named effectors, directly into the host cells cytoplasm (Galan *et al.*, 2014). Various bacteria causing infectious diseases such as plague (*Yersinia pestis*), typhoid fever (*Salmonella typhimurium*) or bacillary dysentery (*Shigella dysenteriae*) use these machineries to facilitate colonization and tissue invasion. *Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic human pathogen responsible for diverse acute and chronic infections in immunocompromised patients, is able to inject four exotoxins (ExoS, ExoT, ExoY and ExoU) by the T3SS machinery. Because of the T3SS-dependent virulence (Lee *et al.*, 2005; Vance *et al.*, 2005) and the increasing resistance of clinical strains to a broad range of antibiotics, T3SS components have been pointed out as promising antibacterial targets, and anti-virulence strategies are finding their way in academic and private research developments (Goure *et al.*, 2005; Aiello *et al.*, 2010; Warrener *et al.*, 2014).

The T3SS machinery, also called the injectisome, is a multiprotein membrane-embedded complex composed of more than 20 proteins organized in three subassemblies dubbed the basal body, the secretory needle and the translocon. The major progress in the understanding of the step-by-step injectisome assembly was achieved by the use of transmission electron microscopy of purified injectisomes from *Salmonella* (Kimbrough and Miller, 2000; Sukhan *et al.*, 2001; Schraidt *et al.*, 2010) and recently using fluorescent fusion proteins in *Y. enterocolitica* (Diepold *et al.*, 2010; 2011; 2012). The formation of the basal body begins in the outer membrane and continues with the assembly of inner membrane components that associate with cytosolic proteins. It is assumed that this structure spanning the inner and outer membrane needs to be completely assembled for the formation of the needle channel to begin. The needle itself is composed of a single protein that polymerizes on the bacterial surface (Kubori

Accepted 22 January, 2015. *For correspondence. E-mail ina.attree-delic@cea.fr; Tel. (+33) 438783483; Fax (+33) 438784499.

Fig. 1. PscI is an α helical protein with a conserved C terminal region.

A. Alignments of C-terminal parts of PscI homologs and of the amphipathic part of PscI and PscF done with ClustalW2 and formatted with ESPript 3.0. Conserved residues are highlighted in red; mutated amino acids are marked with arrows whereas the deletion of the last 19 amino acids is indicated by a bracket. Additional information on identity and similarity are given in Supplementary Fig. S1. In PscI-PscF alignment, conserved hydrophobic character of amino acids is indicated by stars.

B. A model of PscI made by i-TASSER (<http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/i-TASSER/about.html>) (Zhang, 2008; Roy *et al.*, 2010). PscI representation was achieved with PyMOL software 0.99rc6 version (DeLano Scientific LLC). On the right panel, only the fourth helix is represented with lateral chains of amino acids mutated in this study drawn in red stick representation. In the last 19 amino acids deleted in this study, charged residues are drawn as green stick representations, whereas hydrophobic residues are highlighted in blue. The colored amino acids are summarized in a table below the helix.

C. Circular dichroism profiles in far-UV (190–250 nm) of PscI^{WT} and PscI^{1–93} at 10 μ M (0.1 mg ml⁻¹) after refolding. The upper panel represents the mean CD profiles of 15 measurements per protein, after analysis with the online Dichroweb server (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>) (Whitmore and Wallace, 2004; 2008). The lower panel contains raw data (mean of 15 accumulations) of the buffer alone and of the two proteins, represented by colored lines, whereas the standard deviation (SD) is represented in gray.

et al., 2000; Tamano *et al.*, 2000; Pastor *et al.*, 2005). When the needle reaches a certain length (50–80 nm) (Mota *et al.*, 2005; Pastor *et al.*, 2005), a pentameric tip complex docks at the top of the needle and senses the presence of the host target cell (Mueller *et al.*, 2005; Broz *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2007). A set of proteins forming the translocon are then secreted and inserted in the target membrane (Mattei *et al.*, 2011) prior the secretion of effectors begins. Formation of a fully functional T3SS capable of an efficient delivery of the effectors into the host cytoplasm thus requires a precise spatio-temporal control of this hierarchy. Several components, including the T3SS ATPase (Akedo and Galan, 2005; Sorg *et al.*, 2006), a ‘master’ chaperone (Cherradi *et al.*, 2014) and several structural elements of the machinery have been proposed to participate to this function (Lara-Tejero *et al.*, 2011). In addition, different bacteria may employ different strategies to build up a functional injectisome.

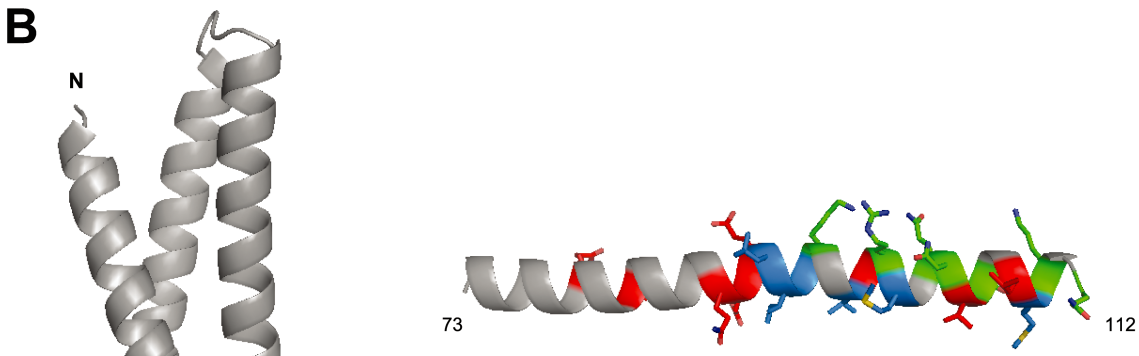
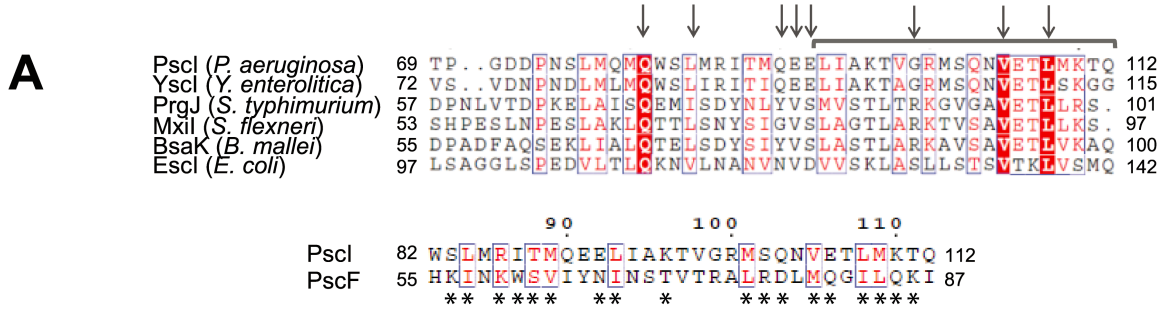
Pseudomonas aeruginosa T3SS belongs to the ‘Ysc’ phylogenetic family of T3S machineries (Troisfontaines and Cornelis, 2005) named after the archetypal Ysc (for Yop secretion) injectisome from *Yersinia* spp. Although all protein components of T3SS in *P. aeruginosa* have been identified, the structure–function relationship for a number of them still remains open. In the present study, we combine biochemistry, *in vitro* infection assays and immunofluorescence imaging to investigate the structure and the function of the yet uncharacterized protein PscI. Based on the structural data obtained by high resolution microscopy of whole isolated injectisomes from *Salmonella* (Marlovits *et al.*, 2006), the PscI/PrgJ family of proteins should be localized within the membrane-embedded secretome and have been named the inner rod proteins. Some previous work, using *in vivo* crosslinking, suggested that PrgJ (*Salmonella*) and YscI (*Yersinia*) may polymerize and play a role in switching between different substrates (Wood *et al.*, 2008; Lefebvre and Galan, 2014) during the secretion by T3SS. In this work, we demonstrate that PscI displays an intrinsic capacity to polymerize, reminiscent to the needle protein PscF (Quinaud *et al.*, 2005). However,

the fibers of PscI are flexible and structurally different from the straight fibers observed for PscF. We used three different cellular assays to evaluate the role of PscI in the injectisome function: i.e., the translocon-dependent pore formation in J774 macrophages, the injection of the toxin ExoU or the ExoS-Bla reporter in epithelial A549 cells and the ExoS/ExoT-dependent endothelial cell (HUVECs) cytotoxicity. We found that, despite its orthology to PrgJ of *Salmonella* (Lefebvre and Galan, 2014), PscI does not play a role in substrate switching but allows the optimal formation of stable and secretion-competent needles. Indeed, we show that the overexpression of the needle component PscF in a PscI-deficient strain allows the formation of functional injectisomes with the ability to export the needle component (early substrate), the translocators (middle substrates) and the toxins (late substrates). Based on the proposed membrane localization of PscI within the T3SS basal body, we conclude that the PscI ladder acts as an ‘adaptor’ for PscF by anchoring it within the basal body and promoting its stability.

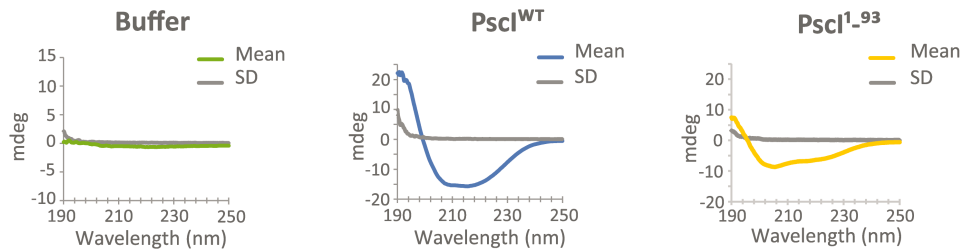
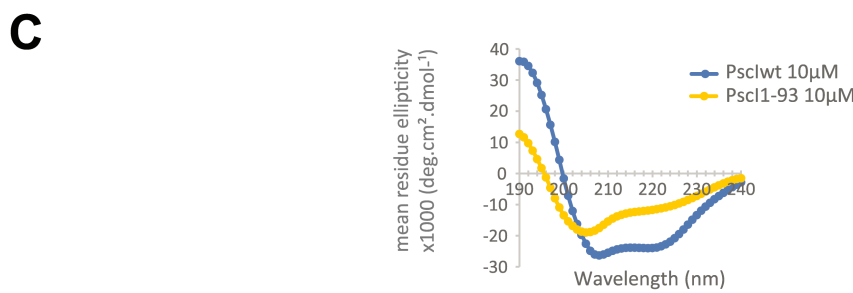
Results

Recombinant PscI folds into a functional α -helical protein

PscI is encoded by a gene belonging to the *exsDpscCDEF-GHIJKL* operon, together with the T3SS needle-forming protein PscF, and two PscF chaperones, PscE and PscG (Quinaud *et al.*, 2005; 2007). PscI is a 12 kDa protein of unknown structure but with a C-terminal sequence highly conserved among species (37–77% similarity, 17–73% identity) (Fig. 1A and Supplementary Fig. S1). Interestingly, our sequence analysis of the full length and the C-terminal part of putative inner rod-proteins from different pathogens (Supplementary Fig. S1) confirmed the existence of three distinct families of T3SS (Troisfontaines and Cornelis, 2005), PscI being closely related to YscI, whereas MxI, PrgJ and BsaK form a second family and EscI is apart from these two groups. We used the



amino acids mutated in this study	Q81	L84	Q90	E91	E92	G99	V105	L108
C terminal polar residues	K96	R100	Q103	N104	E106	K110	Q112	
C terminal non-polar residues	L93	I94	A95	V98	G99	M101	V105	M109 L108



i-TASSER server to create a model of PscI, and the proposed model harbored a confidence score (C score) above the recommended cutoff of 1.5 (Roy *et al.*, 2010). PscI was predicted by threading to fold into four α -helices where three long helices are organized in a coiled-coil and one short helix is connecting the two long ones (Fig. 1B). Interestingly, the algorithm selected nine templates to generate this model, and these templates correspond to five structures of T3SS needle proteins (PrgI, MxiH and BsaL) (PDB Id: 2kv7, 2ca5, 2v6l, 2g0u, 3zqe) and four structures of spectrin-repeats proteins (PDB Id: 3uum, 3uun, 3uua). By rank of the best Z-score and the best identity, four needles templates arrived at top positions with values between 1.14 and 1.06 for Z-score and 16–13% for identity in the threading region (Supplementary Fig. S2), indicating a structural similarity between needle and inner rod proteins at the monomeric level at least.

In order to get further insights into the structural properties of PscI, the *pscl* gene was expressed in *Escherichia coli* and the His-tagged protein purified from inclusion bodies. After purification on a Ni²⁺ column, the refolding was performed either by dialysis or by flash dilution, as described in *Material and methods*, and subsequently analyzed by size-exclusion chromatography. With both refolding methods, PscI was eluted in the void volume of a Superdex200 column (Supplementary Fig. S3). To evaluate PscI refolding and to discriminate between amorphous aggregates and large oligomers, we analyzed the purified protein by circular dichroism (CD) measurements and by electron microscopy. The CD spectrum of PscI was typical for an α -helical conformation with characteristic minima peaks near 208 and 220 nm, which is in agreement with our model (Fig. 1C, upper panel). The standard deviation (SD) of CD measurements only increased below 195 nm, and this was also observed with the control buffer alone (Fig. 1C, lower left and middle panels) implying that the protein is not aggregated. Moreover, electron microscopy (EM) images of negative-stained sample prepared at the same protein concentration showed that PscI formed long, well-defined and flexible fibrils with a discernable regular twist (Fig. 2).

The functionality of the recombinant refolded protein was assessed on murine peritoneal macrophages for its capacity to induce the secretion of IL-1 β as previously described (Miao *et al.*, 2010). We found that PscI induced IL-1 β secretion from murine peritoneal macrophages to the same extent as the flagellin protein FlhC (Fig. 3). Moreover, the stimulation with increasing concentrations of PscI induced a dose-dependent secretion of IL-1 β (data not shown). Conversely, other T3SS components (PopB and PopD) failed to induce IL-1 β secretion, demonstrating the specificity of the induction of IL-1 β secretion by PscI. To ensure that the correctly folded structure of PscI is important for this activation, we compared the heat-denatured

PscI with the native protein. The heat-denatured protein induced significantly lower levels of IL-1 β secretion. Furthermore, a truncated PscI form (PscI^{1–93}) with structural features distinct from PscI^{WT} (see below) also induced significantly lower levels of secreted IL-1 β in comparison with the wild-type protein.

These results indicated that the refolding of PscI is efficient and that the structural features of the protein are essential for its impact on peritoneal macrophages.

PscI polymerizes into stable fibers through its C-terminal region

Modeling with i-TASSER predicted the C-terminal part (94–112) of PscI to be amphipathic (Fig. 1B, right panel) similar to the C-terminal part of the needle-forming protein PscF. In addition, the alignment of C-terminal sequences of these two proteins showed that hydrophobic residues share similar positions (Fig. 1A). Because it has been shown that the C-terminal amphipathic helix of PscF participates in needle assembly and protein polymerization *in vitro* (Quinaud *et al.*, 2007), we generated two truncated forms of PscI to compare their capacities with polymerize. Truncated PscI^{1–72} was lacking the entire fourth helix, whereas PscI^{1–93} only lost the amphipathic part of the C-terminal helix. Both truncated proteins were purified and analyzed by size exclusion chromatography, CD and electron microscopy. Interestingly, PscI^{1–72}, in contrast to the wild-type protein, was found in the soluble fraction of *E. coli* extract. After purification of the protein on the Ni²⁺ column under nondenaturing conditions, the oligomeric state of the protein was analyzed by size-exclusion chromatography (SEC). Under these conditions, PscI^{1–72} behaves as a 500 kDa globular protein (Supplementary Fig. S3). PscI^{1–72} was further analyzed by CD measurements in far-UV and by electron microscopy. The CD spectrum only showed a pronounced peak around 200 nm, and the EM images revealed only aggregates of the protein (Supplementary Fig. S4) suggesting that the truncation of the entire fourth helix likely resulted in a complete loss of secondary and quaternary structures. These data show that the fourth helix of PscI is essential for proper folding of the protein and that the deletion of the helix induces structural changes that compromise further structural analysis of PscI^{1–72}. In contrast, PscI^{1–93} was purified from inclusion bodies as was PscI^{WT} but eluted from SEC in two peaks after refolding; the first one (corresponding to the polymerized and/or aggregated form) eluted in the void volume and the second one with an elution volume corresponding to the size of a trimer (Supplementary Fig. S3). Consistent with these data, the EM images showed that PscI^{1–93} formed few fibers yet their size and structure were distinct from those composed of the wild-type protein (Fig. 2). The oligomers were shorter (less than 150 nm), rarely circularized and a number of

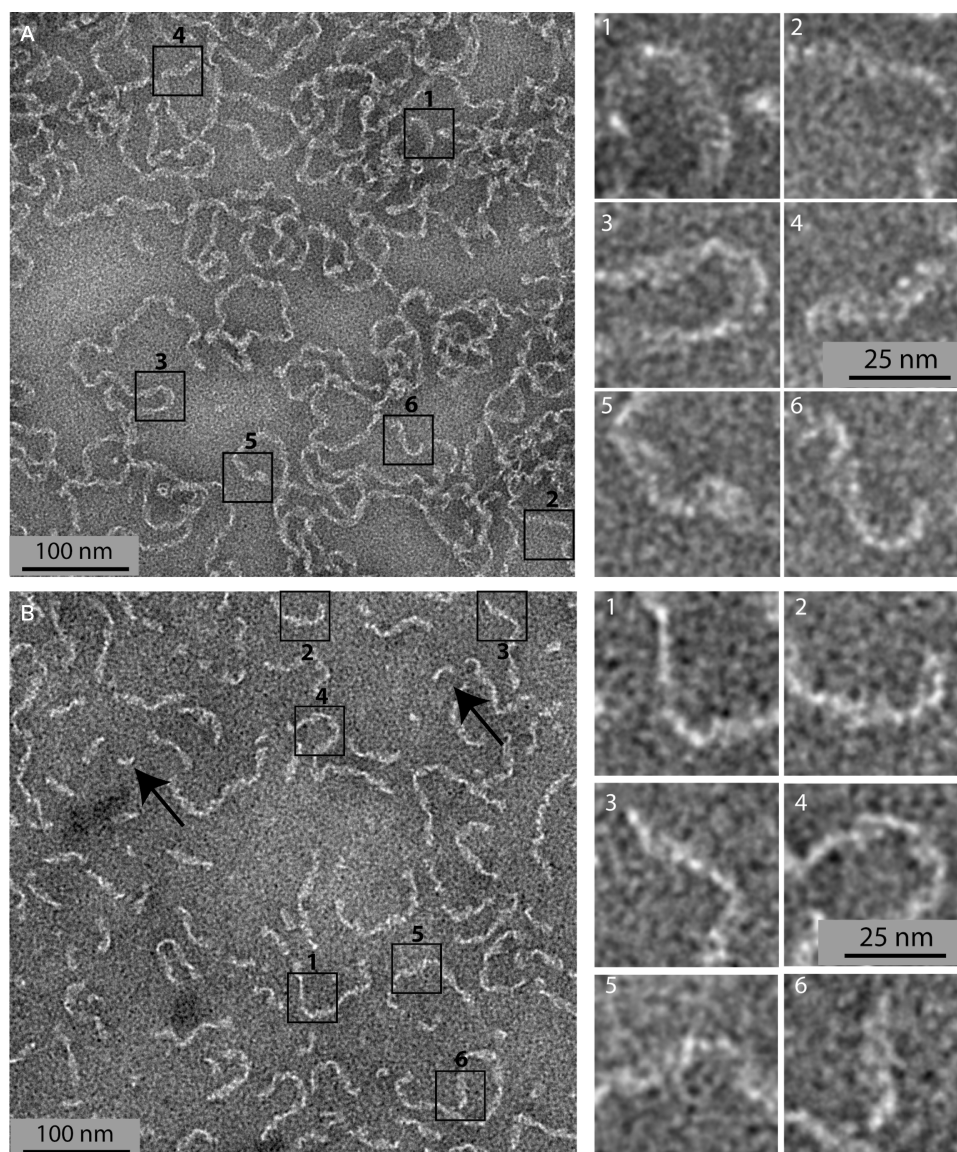


Fig. 2. PscI forms flexible fibrils.

A. Negative staining images of wild-type PscI oligomers.

B. Negative staining images of PscI¹⁻⁹³ oligomers. The oligomers are much shorter than the wild type (arrows). The different scale bars are indicated. Representative images are shown with enlarged details (right panel).

small oligomers (8–30 nm in length) was found in the sample (arrow in Fig. 2). Thus, the deletion of the amphipathic part of the fourth helix induced a shortening of the oligomer. Secondary structure of PscI¹⁻⁹³ was further assessed by CD in far-UV spectra. The CD spectra of PscI¹⁻⁹³ revealed a more pronounced minima near 208 nm signifying a larger proportion of unfolded stretches in comparison with PscI^{WT} (Fig. 1C, upper and lower panels). The prediction of secondary structures of PscI^{WT} and PscI¹⁻⁹³ was made by the Dichroweb server (Whitmore and Wallace, 2004; 2008) and interpreted as a number of residues involved either in helices and strands (Supple-

mentary Fig. S5), showing that the main change between the wild-type protein and this mutant is the reduction in the number of residues involved in α -helices (from 28 to 14 amino acids), which is in an agreement with the deletion of 19 residues in the fourth helix.

To assess the impact of this particular deletion on polymer stability, we monitored ternary and quaternary structure modifications in response to a denaturing agent (urea) by fluorescence anisotropy measurements. To evaluate tertiary structures, we employed intrinsic fluorescence and followed the exposure of the unique Trp residue of PscI (Trp 82) in presence of urea concentrations ranging

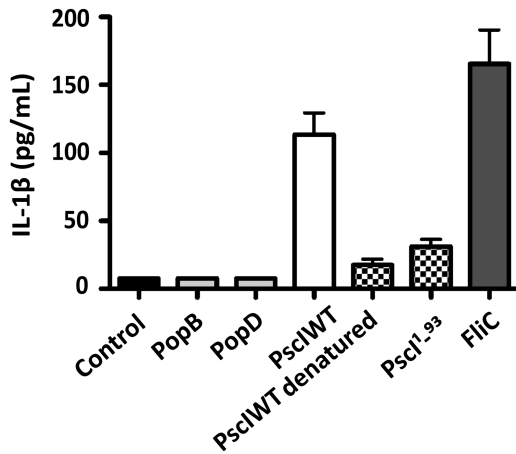


Fig. 3. PscI induces IL-1 β secretion in murine peritoneal macrophages. ELISA of IL-1 β from murine peritoneal macrophages stimulated with purified protein or its variants after LPS priming. FliC was used as positive control.

from 0.0 to 7.5M. In the absence of urea, the PscI¹⁻⁹³ displayed a higher λ_{\max} than PscI^{WT} (346 nm vs. 337 nm), which reflects a larger exposure of the Trp residue in PscI¹⁻⁹³ likely due to the C-terminal deletion or to partially folded stretches, in agreement with CD spectra (Fig. 1C). In addition, as expected, when urea concentration increased, λ_{\max} increased and $I_{320\text{nm}}/I_{360\text{nm}}$ ratio decreased (Fig. 4A and B). Moreover, even if the starting points were different, the two proteins adopt similar fluorescence profile in an increasing urea gradient. After 5 M urea, λ_{\max} and $I_{320\text{nm}}/I_{360\text{nm}}$ values for PscI^{WT} and PscI¹⁻⁹³ were identical because the proteins were completely unfolded.

Finally, we determined fluorescence anisotropy of the proteins in the presence of urea and conditions similar to those used for intrinsic fluorescence. We observed (Fig. 4C) that at 25°C without urea, PscI^{WT} exhibits a higher anisotropy value ($r = 0.098$) than PscI¹⁻⁹³ ($r = 0.056$), which is in agreement with their polymerization properties observed by electron microscopy (Fig. 2). Upon an increase in urea concentration, the anisotropy of both proteins decreased in a similar manner that indicates their depolymerization. Both proteins reached similar anisotropy values ($r = 0.027$) at concentrations higher than 5M, which seems to correspond to the value of the monomeric form. In order to rule out a possibility that viscosity of urea is responsible for the observed decline of anisotropy, we analyzed this parameter for both proteins in a presence of sucrose at concentrations reaching the same viscosity values as concentrations of urea used in this study. Anisotropy values of both proteins remained nearly constant throughout all tested concentrations of sucrose (Supplementary Fig. S6), and we thus argue that the decline of the anisotropy value observed in the Fig. 4C is the result of the denaturation effect of urea and consequently its capacity to

induce the depolymerization of PscI. These results suggest that the principal difference between PscI^{WT} and PscI¹⁻⁹³ occurs at the level of ternary and quaternary structures showing that the amphipathic C-terminal region is important for PscI polymerization *in vitro*. Moreover, the use of the PscI¹⁻⁹³ mutant to analyze the polymerization of the inner rod thus remains relevant because the deletion does not affect drastically the structure but only the polymerization capacities of the protein, at least in comparison with the PscI¹⁻⁷² mutant.

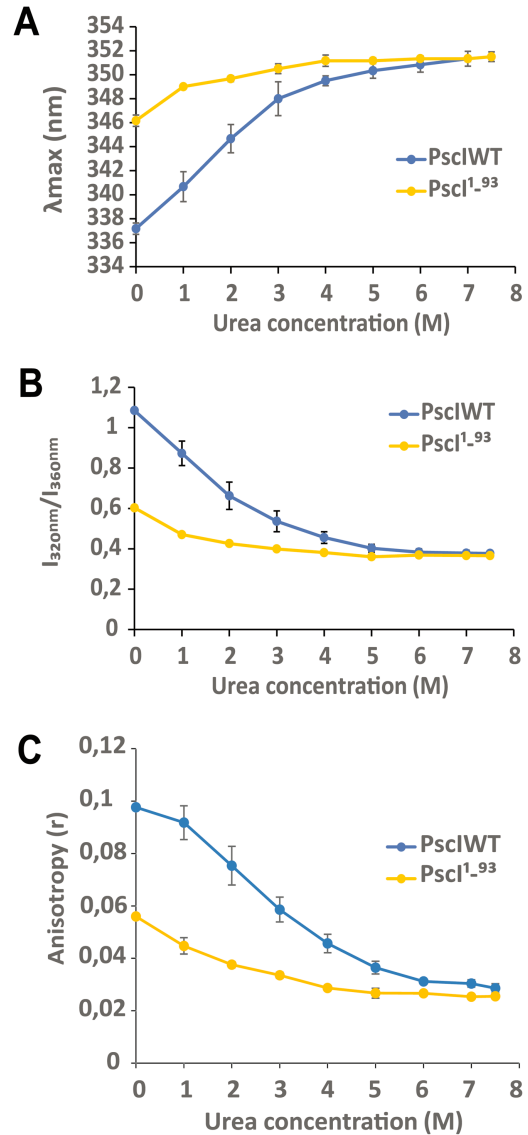


Fig. 4. PscI¹⁻⁹³ unfolding differs from PscI^{WT}. A. Evolution of the λ_{\max} of PscI^{WT} and PscI¹⁻⁹³ upon treatment with urea. B. Measurement of the ratio between fluorescence at 320 nm and 360 nm of PscI^{WT} and PscI¹⁻⁹³. C. Measurement of the anisotropy of PscI^{WT} and PscI¹⁻⁹³.

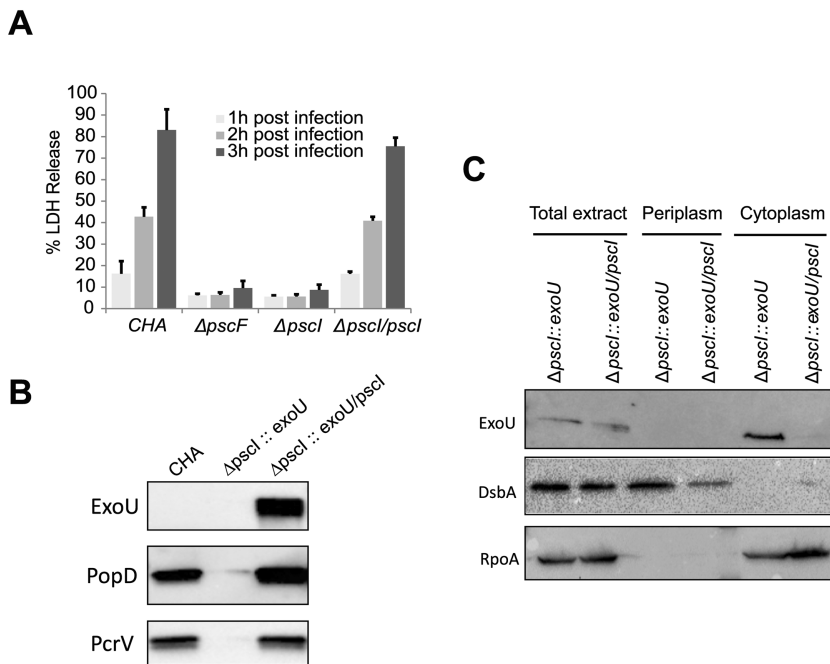


Fig. 5. PscI is required for T3SS function.

A. Cytotoxicity to macrophage line J774 was assessed by measuring the release of LDH into cell culture supernatants. The 100% value represents noninfected cells treated with 1% Triton. The Δ pscF strain (Pastor *et al.*, 2005) was used as a negative control. **B.** *In vitro* secretion of intermediate and late T3SS substrates. Supernatants from indicated strains grown to mid-exponential phase were analyzed by Western blot with anti-PcrV, anti-PopD and anti-ExoU antibodies. **C.** Fractionation experiment showing ExoU localization. Whole bacterial cells fractionated into the periplasm and the cytoplasm and immunoblotted with anti-ExoU antibody. RpoA and DsbA were used as cytoplasmic and periplasmic markers respectively.

Because the importance of hydrophobic residues in the C-terminal part has been already shown for proteins that assemble into type IV pilus or flagellum (Yonekura *et al.*, 2003; Craig *et al.*, 2006) as well as for the needle protein PscF (Quinaud *et al.*, 2007), we also generated point-mutations within PscI to substitute conserved nonpolar residues (V105K and/or L108K). However, no visible change in polymerization or in intrinsic fluorescence was detected (data not shown) for other tested mutants with single amino acid substitutions (L84A, Q81A and V105K; see below) (data not shown).

In conclusion, the C-terminal part of PscI is essential for a proper folding of the protein, and the amphipathic end is important for both PscI polymerization *in vitro* and its capacity to activate the inflammasome in cell-infection assay.

Single amino acid mutants in the C-terminus of PscI reduce bacterial cytotoxicity

To investigate the link between polymerization properties of PscI and its function within the T3SS machinery, we first generated a *pscI*-deficient mutant of *P. aeruginosa* (CHA Δ pscI) and characterized the strain for protein secretion *in vitro* and for cytotoxicity in eukaryotic cell-infection assays. The CHA Δ pscI strain derived from the T3SS-proficient clinical isolate CHA (Toussaint *et al.*, 1993; Dacheux *et al.*, 2000; Sall *et al.*, 2014) and was first tested on the macrophage infection model. The cytotoxic effect of *P. aeruginosa* on macrophages depends essentially on the insertion of the T3SS-associated trans-

locon proteins PopB/PopD into the macrophage membrane (Dacheux *et al.*, 2001), which can be monitored by measuring the lactate dehydrogenase (LDH) release from these cells. In comparison with the wild-type strain of CHA, the CHA Δ pscI displayed substantially a reduced cytotoxicity toward macrophages. However, the complementation by the wild-type *pscI* fully restored the cytotoxic phenotype of Δ pscI/pscI (Fig. 5A). This result shows that PscI is essential for the delivery of translocon proteins. Next, we investigated whether PscI is also essential for the secretion of the cytolytic toxin ExoU, which follows the secretion of the translocon proteins PopB/PopD. To this end, we used the Δ pscI::exoU-spcU strain (Gendrin *et al.*, 2012) and infected pulmonary epithelial cells A549 for measurement of the LDH release as a measure of the ExoU-induced membrane disruption (Finck-Barbancon *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2003). We found that the deletion of *pscI* in Δ pscI::exoU-spcU resulted in a loss of the cytotoxic phenotype compared with the complemented strain Δ pscI::exoU-spcU/pscI (see below). This suggests that the presence of PscI is essential also for the second stage of the secretion through the injectisome – the secretion of toxins – that is triggered after the secretion of the translocon proteins PopB/PopD. Analysis of the T3SS secretion under inducing conditions *in vitro* using Ca²⁺ depletion showed that neither the translocon proteins (PcrV and PopD) nor the toxins (ExoU) (Fig. 5B) were secreted by the Δ pscI strain, even though they were still detected in the corresponding bacterial total extracts (data not shown). Because PscI is expected to localize in the periplasm,

we investigated whether the deletion of PscI resulted in the retention of toxins in the cytosol of bacteria or their leakage in the periplasm. *P. aeruginosa* cells were fractionated in cytosolic and periplasmic extracts, and the localization of ExoU was analyzed by immunoblotting. In the $\Delta pscI$ strain, the ExoU was found exclusively in the cytoplasmic fraction while the complementation of PscI resulted in the depletion of the cytoplasmic pool of ExoU likely due to its efficient secretion. The periplasm was devoid of ExoU in both, $\Delta pscI$ strain and complemented $\Delta pscI::exoU/pscI$ strain (Fig. 5C). Altogether these results further confirm that the presence of PscI is necessary for the efficient secretion of toxins via the T3SS syringe.

Because the C-terminal part of inner rod proteins is highly conserved between T3SS (Fig. 1A) and the deletion of 19 residues at the C-terminal region alters polymerization capacities of PscI, we introduced single amino acid changes in this region to determine their impact on the function of the T3SS. Residues were chosen on the basis of their degree of conservation in orthologs (Fig. 1A): three strictly conserved (Q81A, V105K and L108K), one conserved in three out of five PscI-like proteins (L84A) and four conserved only between *P. aeruginosa* and *Y. enterocolitica* (Q90A, E91K, E92K and G99A). To analyze the impact of these mutations on T3SS function, we expressed mutant genes in $CHA\Delta pscI$ background. The truncated mutant PscI¹⁻⁹³ lacking 19 C-terminal residues was also tested and compared with the $CHA\Delta pscI$ strain complemented by the wild-type *pscI* (Fig. 6). Four mutants, namely E91K, V105K, L108K and PscI¹⁻⁹³, displayed a substantially reduced cytotoxicity toward macrophages in the LDH release assay (Fig. 6A), similarly to the PscI-deficient strain; Q81A and G99A were found as cytotoxic as the wild-type strain, and the remaining mutants (Q90A, L84A and E92K) displayed 35–52% reduction in cytotoxicity, showing an intermediate profile between the wild-type and the PscI-deficient strains (Fig. 6A). A similar trend was found in the LDH release assay using the epithelial cells A549 infected with identical strains that expressed the ExoU toxin (Fig. 6B) or in the HUVECs cells' retraction assay (Huber et al., 2014) (Supplementary Fig. S7). The immunodetection of the translocator (PcrV) and the toxin (ExoU) in each particular strain correlated with strain toxicity levels in the LDH release assay (Fig. 6C).

Taken together, these results show that some specific discrete mutations within the C-terminal region important for protein polymerization have substantial impact on the bacterial capacity to secrete T3SS components and consequently impair bacterial cytotoxicity. We thus speculated that not only the presence of PscI but also its capacity to assemble into a polymeric structure is important for the formation of fully functional injectisomes.

PscI mutants are impaired in needle assembly

The external part of the functional injectisome is composed of at least two components, PscF forming a needle *per se* (Pastor et al., 2005) and PcrV that assembles into a pentamer on the tip of a needle (Broz et al., 2007; Gebus et al., 2008). According to the current view of T3SS assembly, the positioning of PcrV pentamer at the tip of the needle is the final assembly step for this complex machinery and a prerequisite for toxin secretion through the needle.

In order to evaluate the capacity of PscI mutants to form PcrV-containing injectisomes, we set up an assay using indirect immunofluorescence to detect PcrV on nonpermeabilized bacteria with polyclonal anti-PcrV serum (Fig. 7). Microscopic imaging detected discrete PcrV-positive spots associated with the surface of bacterial cells and their numbers increased substantially in cells induced by calcium depletion (to activate T3SS) suggesting the specificity of the assay. Induced cells exhibited a fourfold increase in the average amount of PcrV spots/cell (data not shown) indicating that a single PcrV spot may be representative of an individual T3SS injectisome. The amount of PcrV-positive spots per cell within a cell population ranged between 0 and 5 with an average of 0.6 ± 0.1 needles per cell in the wild-type CHA strain (Fig. 7). No PcrV-positive spots were detected in strains deficient for PscI (Fig. 7) or PscF (Fig. 8) even though PcrV was readily expressed and accumulated within the bacterial cytoplasm in these strains (Fig. 6C). Consistent with cytotoxicity data, no PcrV was detected for E91K, E92K, V105K, L108K and PscI¹⁻⁹³ mutants. PscI^{L84A} and PscI^{Q90A} displayed 96% and 80% reduction of PcrV-positive spots per cell in comparison with the wild type, respectively, whereas the assembly of PcrV-positive injectisomes in PscI^{G99A} mutant bacteria reached 65% of the wild-type and approximately the same levels as in the complemented $\Delta pscI/pscI$ strain. These data demonstrate that altered T3SS-dependent phenotypes of PscI mutants are directly linked to the ability of the mutants to correctly assemble the functional injectisomes, at least to the stage when PcrV pentamer is assembled at the tip of the PscF needle.

Interplay between inner rod and needle proteins

PscF and PscI are both small helical proteins with similar coiled-coil regions and are considered as paralogs forming a unique channel from the inner membrane to the bacterial surface (Marlovits et al., 2006). To examine the possible interplay between the two proteins, we engineered trans-complemented $\Delta pscF$ and $\Delta pscI$ strains carrying medium-copy plasmids expressing PscI and PscF respectively. Surprisingly, Western blot analysis revealed

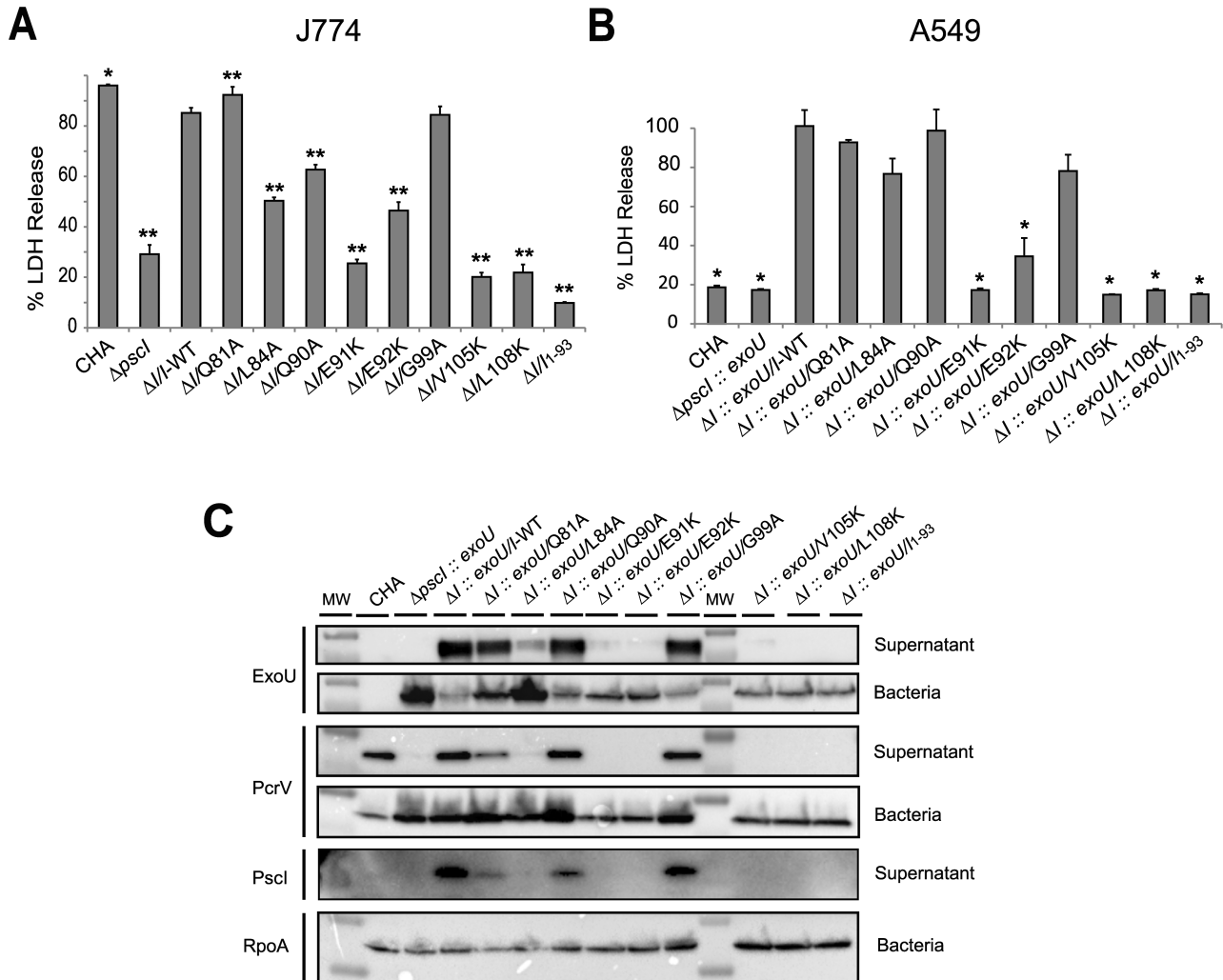


Fig. 6. Point mutations in C-terminal region of PscI affect T3SS function.

A. Cytotoxicity assay on macrophages were done as described in Fig. 5. The Tukey test was done to establish statistic differences with Δ pscl/pscl (** $P < 0.001$; * $P < 0.005$).

B. Cytotoxicity on A549 epithelial cells was measured as for J774 macrophages. Student' statistical differences ($P < 0.05$) were established with Δ pscl::exoU/pscl-WT (*).

C. *In vitro* secretion and expression of T3SS substrates. Bacterial extracts and supernatants from indicated strains grown to mid-exponential phase were analyzed by Western blot with anti-ExoU, anti-PcrV and anti-PscI antibodies. RpoA was used as loading control.

that in Δ pscl/psclF, the PscF protein was detected in both bacterial cytoplasm and in culture supernatants even if the quantity of the secreted form is lower than in the parental strain (Fig. 8A). As PscF is secreted in the supernatant of Δ pscl/psclF, we were interested in whether PscF sub-units could be assembled in a full surface-anchored structure. Labeling of PcrV by indirect immunofluorescence showed that the injectisome was most likely fully assembled in this Δ pscl/psclF complemented mutant. However, the average number of PcrV-positive injectisomes per cell was about 26% of those scored for the Δ pscl/pscl control strain (Fig. 8B). Having in hand a strain that lacks solely PscI, but still assembles the needles, we

could investigate the contribution of PscI in the switch between the secretion of translocators and toxins. Indeed, the *Salmonella* protein PrgJ, and Mxil in *Shigella*, two orthologues of PscI, were shown to be essential players in this process (Cherradi *et al.*, 2013; Lefebvre and Galan, 2014). To that purpose, we examined the Δ pscl/psclF strain in different cytotoxic assays that rely on translocon pore formation (J774 macrophages) or on toxin injection (epithelial A549 and endothelial HUVECs cells). Although the PscI protein was unable to *trans*-complement Δ psclF, the overexpression of PscF could partially substitute for the absence of PscI in the J774 cytotoxicity assay (Fig. 8C) where Δ pscl/psclF strain retained the ability to

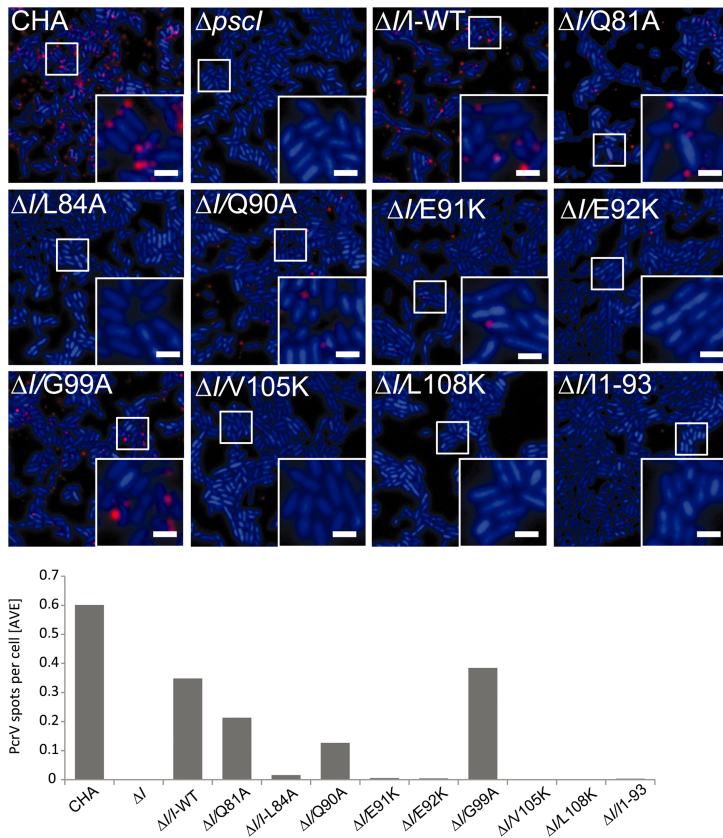


Fig. 7. Effect of PscI mutants on needle assembly. Detection and quantification of PcrV-positive spots in wild-type and mutant strains. Representative images are shown with enlarged details. Bars = 2 μm. In the quantitation, values represent average number of spot(s) per cell.

induce membrane pores in host cell membranes via the insertion of the translocon proteins PopB/PopD. Furthermore, to verify that the functional complementation of PscI by PscF was specific, we used the same plasmid to complement the $\Delta pscC$ strain that lacks the outer membrane protein component of T3SS, the PscC secretin. We found that $\Delta pscC/pscF$ was not cytotoxic on J774 macrophages and that toxins were not secreted *in vitro* (data not shown) in this complemented strain.

In order to detect low levels of secreted and injected substrates, we introduced a sensitive toxin-translocation reporter, ExoS_{GAP}-Bla, into the strains and monitored the activity of translocated beta-lactamase (Bla) within A549 cells (Verove *et al.*, 2012). This assay allows a real-time quantification of enzyme-coupled toxin(s) delivery into the cytosol of the target epithelial cells that were preloaded with a cell-permeable substrate CCF2 used for fluorescent ratio measurements (Charpentier and Oswald, 2004) (Fig. 8D). The strain CHA::exoS-bla/pIApG (vector only) was used as a positive control and the strain without translocon $\Delta popBD::exoS-bla$ as a negative control. As expected, the $\Delta pscI::exoS-bla$ strain was unable to inject ExoS-Bla fusion in A549 cells with resulting fluorescent ratio levels similar to the negative control. The complemented strain $\Delta pscI::exoS-bla/pscI$ restored a level of injection similar to CHA::exoS-bla/pIApG. Clearly, this

assay showed that the complementation of $\Delta pscI::exoS-bla$ with *pscF* also allowed a full injection of the chimeric toxin. The efficient secretion of the chimeric protein by $\Delta pscI::exoS-bla/pscF$ directly into the medium was also confirmed using a beta-lactamase substrate nitrocefin *in vitro* (data not shown). Finally, we used a recently developed assay to assess the impact of ExoS activity on a confluent monolayer of polarized HUVECs (Huber *et al.*, 2014). In this assay, the extent of the host cell retraction is directly proportional to the amount of native ExoS delivered to the cells by injection during early stages of infection. As shown in Fig. 8E, the retraction of HUVEC cells induced by $\Delta pscI/pscI$ and $\Delta pscF/pscF$ strains was similar to that induced by the wild-type CHA strain, whereas the $\Delta pscF$, $\Delta pscI$ and cross-complemented $\Delta pscF/pscI$ had an insignificant impact on the integrity of the HUVECs monolayer. In contrast, the $\Delta pscI/pscF$ strain induced a substantial cell retraction, which corresponded to 58% of retraction induced by the $\Delta pscI/pscI$ strain. Consistent with these results, secreted ExoS was readily detected in the supernatant of the $\Delta pscI/pscF$ strain (data not shown).

Thus, we conclude that the cross-complementation of $\Delta pscI$ with *pscF* allows the injection of toxins into the host cells. This finding also implies that even if $\Delta pscI/pscF$ assembles few needles as measured by immunofluorescence on *in vitro* cultures, these needles are competent in

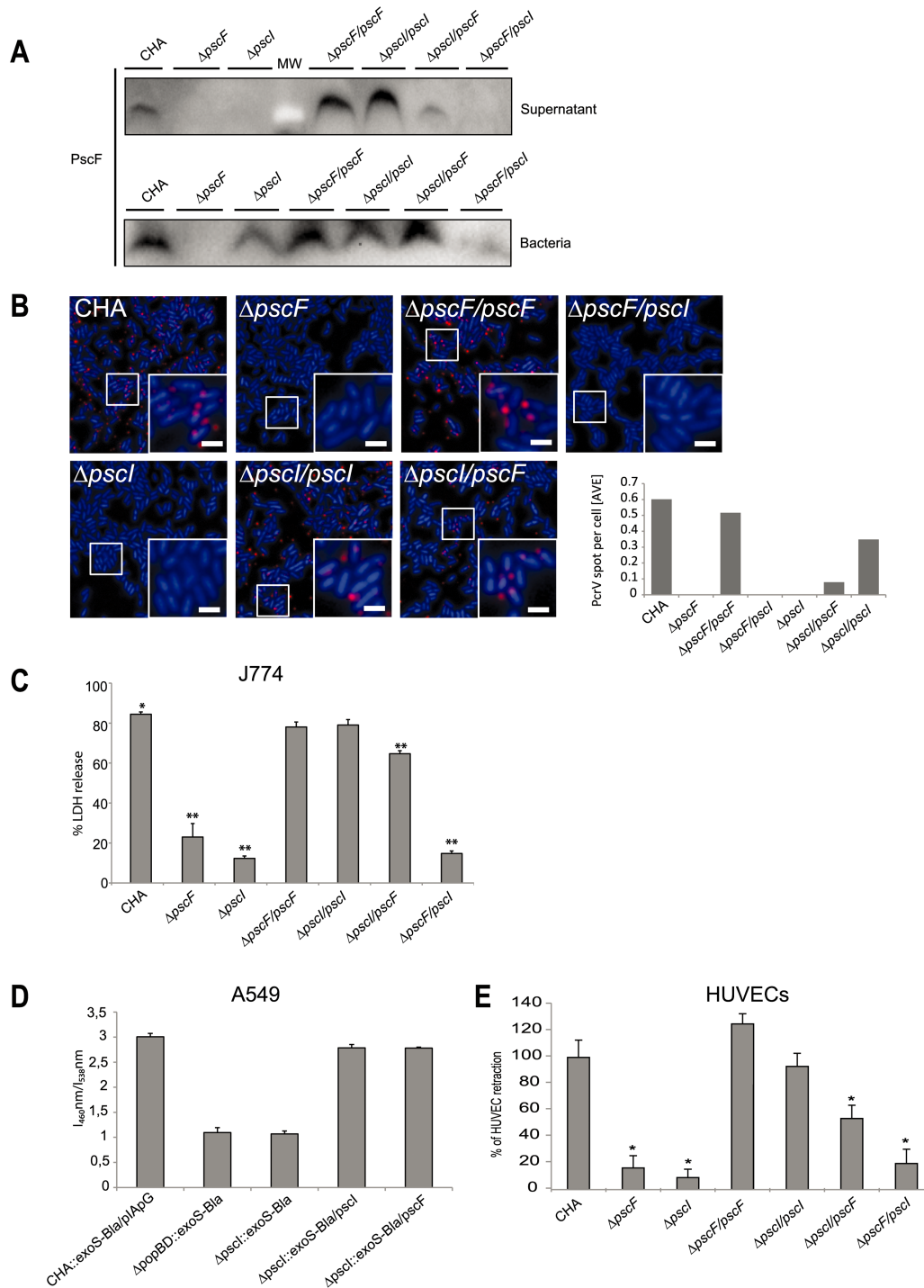


Fig. 8. Overexpression of PscF compensates the absence of PscI for needles formation and promotes eukaryotic cell cytotoxicity.

A. *In vitro* secretion of T3SS substrates. Bacterial extracts and supernatants from indicated strains grown to mid-exponential phase were analyzed by Western blot with anti-PscF antibodies.

B. Detection and quantification of PcrV-positive spots on indicated strains were performed as described in Fig. 7.

C. Cytotoxicity assay on macrophages J774 was done as described in Fig. 5. The Tukey test was done to establish statistical differences with $\Delta pscI/pscI$ (** $P < 0.001$; * $P = 0.012$).

D. ExoS-Bla injection in A549 cells was evaluated by the measurement of CCF2 fluorescence in cells. The ratio between fluorescence at 460 nm and 538 nm reflects the % of CCF2 cleaved in A549 cells by the ExoS-Bla fusion.

E. HUVECs were infected with indicated strains. The histogram represents the percentage of retraction in infected cells normalized versus the CHA strain values, which is considered as 100% of retraction. Statistical differences with the strains were established with the Tukey test (* $P < 0.001$).

toxin translocation in the context of bacteria–cell interaction and that PscI is not necessary for the switch between the secretion of translocators and effectors (toxins).

Together, these data show that PscI participates to the formation of a stable and efficient injectisome. However, increasing intracellular levels of the needle protein PscF by ectopic expression could compensate for the lack of PscI and leads to the establishment of an entire, translocation-competent injectisome.

Discussion

In this study, we focused on functional and structural analysis of the *P. aeruginosa* T3SS protein, PscI, in order to get insight into its role in T3SS injectisome assembly. We found that the recombinant PscI formed fibrils that are different from those formed by PscF (Quinaud *et al.*, 2005). Indeed, contrary to the straight PscF fibers observed by Quinaud *et al.* (Quinaud *et al.*, 2005), PscI fibers are more flexible and regularly twisted. Interestingly, the polymerized fibers of PscI, predicted to form the T3SS inner rod, are reminiscent of fibers formed by flagellar inner rod proteins, notably FliE and FlgB that fold into flexible filamentous objects with a diameter of 60 and 100 Å respectively (Saijo-Hamano *et al.*, 2004). PscI polymers were folded and preferentially helical, as determined by structure modeling and CD spectra; this observation differs from the results of Zhong *et al.* (2012) in which PrgJ was found as essentially unfolded and required the use of TFE (trifluoroethanol) to induce α -helical formation (Zhong *et al.*, 2012). We assume that the folding differences may be caused by the size of the proteins as *Salmonella* and *Shigella* homologues are shorter than PscI of *P. aeruginosa*. Moreover, contrary to observations made by Darboe *et al.* (Darboe *et al.*, 2006) on the *Salmonella* and *Shigella* needle components (PrgI and MxiH respectively), *Pseudomonas* inner rod fibers are not aggregated and are relatively stable. Because the use of denaturing reagent to recover the protein from inclusion bodies and the refolding of the protein could lead to physiologically irrelevant structures, we verified its functionality by measuring its capacity to induce IL-1 β secretion as was previously described for other inner rod proteins (Miao *et al.*, 2010). Interestingly, we found that only polymerized PscI forms induced a significant increase in IL-1 β release from mouse peritoneal macrophages highlighting for the first time the importance of the protein polymerization and/or folding in its capacity to promote IL-1 β production.

In order to gain knowledge on PscI polymerization, we deleted its amphipathic C terminus (PscI^{1–93}), based on a design of PscI similarity with the needle protein PscF and a report showing that the deletion of this amphipathic region impairs PscF polymerization *in vitro* as well as the secretion through the injectisome *per se* (Quinaud *et al.*,

2007). Contrary to Zhong *et al.*, who purified a soluble PrgJC Δ 20 form (Zhong *et al.*, 2012), the truncated mutant PscI^{1–93} (C Δ 19), analyzed in this work, was still insoluble but showed a clear defect in polymerization. A longer truncation PscI^{1–72} (C Δ 40) was isolated in the soluble fraction but in this case the protein lost secondary structures and formed small aggregates. Indeed, its CD spectrum (Supplementary Fig. S4A) could indicate that these amorphous aggregates could result from intersubunit β structures formed upon the loss of the stable secondary structures observed in the full-length protein. Even if the amphipathic C terminal part of the protein was found important for fibers formation, we found that, contrary to the T3SS needle formation, conserved hydrophobic residues in this region are not involved in this polymerization. Nevertheless, as noted by Wilharm *et al.* (Wilharm *et al.*, 2007), to date, there is no evidence that the inner rod adopts the same helical assembly of the needle component. Because the PscI model generated by i-TASSER was based on both needle protein and spectrin protein folds, it will be interesting to test whether PscI assembly is governed by interactions similar to spectrin oligomers in which the junction between the helix C and the helix A of the following repeat in a uninterrupted helical structure is responsible for the formation of oligomers (Kusunoki *et al.*, 2004a,b).

Based on our structural characterization and the fact that the C-terminal part of the inner rods of T3SS is highly conserved between pathogens, we generated various PscI mutations in this region (region 80–112) and tested their impact on *P. aeruginosa* T3SS-dependent cytotoxicity. First, we confirmed that the PscI protein was required for needle assembly and cytotoxicity and that so called intermediate substrates (translocators PopB, PopD and PcrV) and late substrates (toxins) are retained in the bacterial cytoplasm in the PscI-deficient strain. Phenotypic analysis of the single-amino acid mutants showed a correlation between cytotoxicity, *in vitro* secretion and needle assembly. The degree of residues' conservation did not directly correlate with the effect of the corresponding mutations. Indeed, from three strictly conserved residues in the C-terminal part (Q81A, V105K and L108K), only two (V105K and L108K) induced a loss of T3SS function phenotype, whereas the last one (Q81A) induced only a slight decrease in secretion yet without an effect on cytotoxicity. Interestingly, three mutants (Q81A, L84A and Q90A) were as cytotoxic as the PscI^{WT} but displayed a decrease in the amount of PcrV-capped needles at the bacterial surface, as estimated by PcrV labeling. This implies that assembled injectisomes in these mutants are either fully capable of secretion but either more fragile to preservation for immunolabeling on intact bacterial cells, or that the amount of assembled injectisomes is not always proportional to the cytotoxic effect for yet unknown

reasons. Particular positions within PscI may also be involved in interactions with other secretome components. For example, *E. coli* protein EscI, in addition of self-association, interacts with the outer membrane secretin EscC and integral membrane protein EscU, involved in substrate switching (Sal-Man *et al.*, 2012). Moreover, Cherradi *et al.* noticed that the interaction between MxiI and the gatekeeper MxiC (the PopN homolog) may sequester effectors prior to secretion (Cherradi *et al.*, 2013).

A recent publication on the *Salmonella* inner rod (Lefebvre and Galan, 2014) described the formation of an elongated needle in several PrgJ mutants, including the PrgJ Q71A mutant, which correspond to Q84A in *P. aeruginosa*. As *P. aeruginosa* injectisomes cannot be successfully purified (I. Attree, personal observations), we analyzed needles directly by EM-negative staining on bacteria to verify if such a phenotype is also observable with our mutants. None of the engineered mutants including PscI^{Q84A} displayed significantly elongated needles (data not shown), suggesting different molecular functions of the inner rods of *P. aeruginosa* and *Salmonella*.

Based on our data and the relative positions of PscF and PscI within the injectisome, we propose that PscI could act as an optimizer of PscF needle assembly. Notably, although PscI could not substitute for PscF, the overexpression of PscF in a strain lacking PscI results in the formation of PcrV-containing needles at the bacterial surface, albeit at lower amounts. This is in agreement with the report from Marlovits *et al.* (Marlovits *et al.*, 2006) where the mutant Δ InvJ can produce needles even in the absence of the inner rod structure within the basal body. In addition, they noticed that in this case needles are more fragile than in wild-type strains, an observation similar to our finding that fewer needles are present at the bacterial surface of the Δ pscI/pscF strain. Moreover, despite very low amounts of assembled needles in the Δ pscI/pscF strain, we showed that it is sufficient to induce macrophage lysis suggesting that the functional translocon has been assembled in the absence of PscI. Finally, the injection of a toxin reporter and the HUVEC retraction assay that accounts for ExoS/ExoT activity (Huber *et al.*, 2014) confirmed that the Δ pscI/pscF strain assembles fully functional injectisomes able to insert the translocon within the host membranes and inject toxins. Notably, the partial compensation of the cytotoxicity by the overexpressed needle protein has been observed previously, where the absence of one of the two chaperones of PscF, PscE, could be overridden by the overexpression of pscF-pscG in tandem (Ple *et al.*, 2010).

All these results bring us to the conclusion that PscI, similarly to the needle protein PscF, possesses the capacity to polymerize. It is essential for a stable establishment of the T3SS needle in the wild-type genetic

background and for the full toxin secretion. However, in *P. aeruginosa*, the inner rod seems not to be involved in substrate switching; rather it acts as an 'adaptor protein' for PscF, ensuring a proper anchoring of the needle that may be sufficient even in the absence of the inner rod. Future challenges will be to establish whether the needle and the inner rod directly interact and to gain more detailed structural information on this complex essential for bacterial virulence.

Experimental procedures

Bacterial strains and growth conditions

The cytotoxic *P. aeruginosa* cystic fibrosis isolate CHA was used as the parental strain, and all mutants were isogenic to it. All strains used in this study are described in Supplementary Table S1. *P. aeruginosa* strains were grown in Pseudomonas Isolation Agar (Difco) plates or in Luria Broth (LB) supplemented with antibiotics when needed, at 37°C with agitation. Antibiotics used were ampicillin (100 µg ml⁻¹), tetracycline (10 µg ml⁻¹) and kanamycin (25 µg ml⁻¹) for *E. coli* and carbenicillin (300 µg ml⁻¹) and tetracycline (200 µg ml⁻¹) for *P. aeruginosa*. For *in vitro* T3SS induction, *P. aeruginosa* overnight cultures were diluted to an optical density (OD) at 600 nm of 0.1 in LB containing 5 mM Ethylene Glycol Tetraacetic Acid (EGTA) pH 8 and 20 mM MgCl₂. Incubation at 37°C was prolonged until the cultures reached an OD₆₀₀ of 1.

Escherichia coli Top10 cells were used for standard cloning, and *E. coli* BL21(DE3)Star (Invitrogen) cells were used for all His-tagged recombinant proteins.

Cell cultures

Macrophages cell lines J774 were cultured in DMEM medium (Gibco) supplemented with 10% FCS (Gibco) and 100 U ml⁻¹ penicillin and 100 µg ml⁻¹ streptomycin (Gibco), whereas the epithelial lung carcinoma cell line A549 was cultured in RPMI 1640 with 2.0 mM L-Glutamine (Gibco) containing 10% FCS (Gibco). Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated according to previously described protocols (Huber *et al.*, 2014). HUVECs were cultured in Endothelial-Basal-Medium (EBM-2, Lonza) supplemented as recommended by the manufacturer. Cells were maintained in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. For infection, the day before, cells were washed once with the appropriate medium without antibiotic and seeded in 48-well tissue culture plates (Falcon) at 3.10⁵ cells/well for J774 cells or 1.10⁵ cells/well for A549 cells and in 24-well plates for HUVEC cells at 1.10⁵ cells/well.

Genetic constructions

The genetic construct used to delete PscI (from the amino acid 8 to the amino acid 105) was obtained by splice overlap extension polymerase chain reaction (SOE-PCR) and cloned into pEX100T digested by *Sma*I. The deletion of PscF was made as previously described (Pastor *et al.*, 2005). pEX100T

vectors carrying deletions were introduced into the CHA strain using pRK2013 as a helper plasmid for homologous recombination. Strains that were carbenicillin sensitive and sucrose resistant were checked by PCR for the correct double recombination events.

All strains were complemented in *trans* by the wild-type or the mutated gene inserted in a pApG plasmid using *NdeI*-*HindIII* digestion. The expression of the ExoU toxin or the ExoS-Bla fusion in CHA derivatives strains were also performed by the insertion of genes in CHA Δ *pscl* and CHA Δ *pscF* strains with miniCTX-*exoU*-*spcU* (Gendrin *et al.*, 2012) and miniCTX-*exoS*-*bla* (Verove *et al.*, 2012), respectively, which were integrated in the chromosome as previously described (Hoang *et al.*, 2000).

For overexpression in *E. coli*, the *pscl* gene was PCR amplified from CHA genomic DNA and inserted in a pET30b plasmid after digestion with *NdeI* and *XhoI*. Site-directed mutagenesis was performed on pET30b-*pscl**wt* with Quik-Change II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent). Sequences of primers are given in Supplementary Table S1. All the constructs were checked by DNA sequencing.

Protein production, purification and refolding

Wild-type PscI and mutant proteins were produced from pET30b/PscI* in *E. coli* BL21(DE3)Star. The proteins all have the 6 X His tag at their C-terminus. Protein production was induced by IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside; 1 mM) in 500 ml of LB broth for 3 h at 37°C. PscI^{WT} and PscI¹⁻⁹³ proteins are produced in inclusion bodies, whereas PscI¹⁻⁷² is produced in the soluble fraction of the *E. coli* extract. Cultures were centrifuged at 8000 \times rpm for 10 min at 4°C and the pellet resuspended in 25 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl supplemented with protease inhibitor cocktail (EDTA Free, Roche). The bacterial suspensions were then broken in a Microfluidizer (<http://www.microfluidicscorp.com>). For the soluble mutant, after ultracentrifugation at 42 000 \times rpm for 30 min at 4°C the supernatant was directly loaded on a Ni²⁺ affinity column (His-Trap HP 1 ml, GE Healthcare). For inclusion bodies, after ultracentrifugation at 42 000 \times rpm for 30 min at 4°C, the pellet was washed with Triton X-100 1%, and then resuspended in urea 8 M. The solubilized fractions were loaded onto a Ni²⁺ affinity column. Finally all proteins were eluted using increasing imidazole concentrations (20, 60 and 200 mM).

Proteins were concentrated on Amicon (10 or 3 kDa cutoff, Millipore) and refolded if necessary (PscI^{WT} and PscI¹⁻⁹³) by flash dilution or by dialysis in 25 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl (or 150 mM NaF for CD) overnight at 4°C. Proteins were then analyzed by size-exclusion chromatography (Superdex200 10/300GL, GE Healthcare) in the same buffer. Proteins purifications were performed on an ÄKTA purifier system (GE Healthcare).

Circular dichroism

Circular dichroism spectra were recorded on a JASCO J-815 spectrophotometer in far-UV (190–250 nm) on proteins prepared at 10 μ M (0.1 mg ml⁻¹) in 25 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaF. Spectra were recorded at 25°C on 1 mm quartz cells at a speed of 100 nm min⁻¹ with a data interval of 0.2 nm. The

mean of the 15 acquisitions and the SD were then calculated. Buffer spectrum was subtracted from the proteins' spectrum, and the resulting spectrum was analyzed with the online Dichroweb server (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>) (Whitmore and Wallace, 2004; 2008).

Negative staining for protein electron microscopy imaging

Proteins at a concentration of about 0.1 mg ml⁻¹ were applied on the clean side of carbon on mica (carbon/mica interface) and negatively stained with 2% of sodium silicon tungstate pH 7.0. A grid was placed on top of the carbon film, which was subsequently air dried. Charge-Coupled Device (CCD) frames were taken with a FEI T12 microscope operating at 120 kV and a nominal magnification of 45 000.

Peritoneal macrophages isolation

Peritoneal macrophages were harvested from specific-pathogen-free C57BL/6J mice, 6–8 weeks old, by injecting intraperitoneally 2.0 ml of 4% Brewer thioglycolate medium (Sigma Aldrich Saint-Louis, Missouri, USA). Peritoneal macrophages were then collected by peritoneal lavage using ice-cold PBS and plated with Iscove's Dulbecco's Media (IMDM) supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U ml⁻¹ penicillin G. Nonadherent cells were removed 6 h later. All experiments were conducted with institutional animal care and use committee approval.

Peritoneal macrophages stimulation

Stimulation experiments were performed on adherent peritoneal macrophages which were primed by 100 ng ml⁻¹ LPS Ultrapure (Invivogen, France) for 4 h before being stimulated by purified proteins for 20 h.

IL-1 β assay

IL-1 β secretion was determined on culture supernatant by ELISA (e-Bioscience, San Diego, CA, USA) according to manufacturer's recommendation. Purified FliC protein from *P. aeruginosa* used in control was obtained from Invivogen (France).

Intrinsic fluorescence and fluorescent anisotropy

Fluorescence anisotropy measurements were made on a JASCO FP-8500 spectrofluorimeter (JASCO France sarl, Bouguenais, France) and were performed with an excitation wavelength of 280 nm whereas the emission was monitored between 320 and 360 nm. Proteins were prepared at 2.5 μ M in 25 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, and containing different urea concentrations ranking from 0 to 7.5 M.

The intrinsic fluorescence and the maximum emission wavelength (λ_{\max}) of each protein was determined first at 25°C without the polarizer. The ratio between fluorescence

intensities at 320 nm and 360 nm and the λ_{\max} were then plotted as a function of urea concentration.

Fluorescence anisotropy spectra were then measured with excitation and emission polarizers in the four directions (0.0, 0.90, 90.90 and 90.0). Fluorescent intensities ($I_{90,0}$, $I_{0,90}$, $I_{0,0}$ and $I_{90,90}$) for the determination of the anisotropy were recorded at the λ_{\max} during all the experiments. Each point corresponds to the mean value of three independent measurements (each measurement being the result of three accumulations) acquired on 10 mm quartz cells at a rate of 100 nm min⁻¹. Anisotropy (r) was calculated as described by the manufacturer ($r = (I_{90,90} - G \times I_{0,90}) / (I_{90,90} + 2 \times G \times I_{0,90})$) with $G = I_{0,90} / I_{0,0}$) and allowed us to obtain information on the quaternary structure of PscI proteins, as this parameter reflects the size of a protein.

T3SS secretion assays

Bacteria (T3SS induced) exponentially grown (OD₆₀₀ = 1) were centrifuged at 12 000 × rpm for 1 min. Supernatants containing the secreted proteins were precipitated with trichloroacetic acid (TCA) 20% (w/v). TCA precipitates were centrifuged at 12 000 × g and 4°C for 30 min and after two washes with cold acetone, pellets were air dried and resuspended in 40 µl of 50 mM Tris-HCl pH 8 and 10 µl of 5X sample buffer. Cell pellet fractions were resuspended in sodium dodecyl sulfate (SDS) 1% (w/v) with 5X sample buffer. Equal amounts of culture supernatant and cell pellet fractions were separated by SDS-PAGE prior to immunoblotting. Samples were generally loaded on 12% or 15% SDS-PAGE gels or on 15% Tris-tricine gels when PscF detection was required.

PscI antibodies production and purification

Antibodies were raised in rabbits for the purified PscI (as reported before) by Biotem as described by the manufacturer (<http://www.biotem.fr/>). Specific anti-PscI antibodies were affinity purified from the serum by using preactivated CH Sepharose 4B gel (GE Healthcare) coupled with the recombinant purified PscI, as described in the manufacturer's protocol.

Immunoblotting analysis

Western blotting analyses were done on Hybond LFP-polyvinylidene difluoride (PVDF) transfer membranes (GE Healthcare) after electrotransfer in Laemmli buffer without SDS and containing 20% ethanol. The membranes were blocked with 5% nonfat dry milk before incubation with primary antibodies. Dilutions of polyclonal antibodies in Phosphate Buffer Saline (PBS) + Tween 1% (v/v) were anti-PopB and anti-PopD at 1:10 000, anti-PcrV and anti-PscF at 1:1000; the four antibodies are described in Goure *et al.* (2004). Anti-ExoU from Gendrin *et al.* (Gendrin *et al.*, 2012) was used at 1:5000, anti-RpoA (NeoClone) at 1:5000, anti-DsbA at 1:10 000 (obtained from R. Voulhoux, CNRS, Marseille, France). The secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies against rabbit or mouse were obtained from Sigma and used at a dilution of 1:40 000 and 1:10 000 respectively. Detection was performed with a Luminata Western HRP substrate kit (Millipore).

Fractionation of *P. aeruginosa*

Fractionation of bacterial cells was performed using exponentially grown cultures (OD₆₀₀ = 1). The pellet was resuspended in 1 ml buffer A (10 mM Tris-HCl, 200 mM MgCl₂, pH 8) in the presence of protease inhibitor cocktail (Complete, Roche) and 0.5 mg ml⁻¹ lysozyme and incubated for 30 min at 4°C with gentle agitation. The periplasmic fraction was recovered after centrifugation at 8000 × g and 4°C for 15 min. After one wash, the pellet, resuspended in 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, pH 8, was disrupted by sonication. Unbroken bacteria were eliminated by centrifugation at 8000 × g for 15 min. Then, the supernatant was ultracentrifuged at 200 000 × g and 4°C for 45 min (TLA120 Beckman rotor) to obtain the cytosolic fraction (supernatant) and the total membrane fraction. All fractions were resuspended in 4 × SDS-PAGE loading buffer and incubated for 5 min at 100°C before Western blotting. RNA polymerase (RpoA) and disulfide oxydoreductase (DsbA) were used as internal markers for cytosolic and periplasmic fractions respectively.

Cytotoxicity assays

For cytotoxicity assays mutant and control strains were harvested when they reached an OD₆₀₀ of 1 and were added to macrophages cell line J774 (3.10⁵ cells per well) or epithelial cell lines A549 (1.10⁵ cells per well) at a multiplicity (MOI) of 5 or 1. Eukaryotic cell death was assessed at 3 h or 4 h postinfection by using the cytotoxicity LDH detection kit (Roche) as previously described (Dacheux *et al.*, 2001).

Immunofluorescence microscopy analysis and quantification

Assembly of complete T3SS needles in bacteria has been assessed by indirect immunofluorescence using anti-PcrV antibody on nonpermeabilized cells to detect the extracellularly exposed pentamer of PcrV on the tip of the T3SS needle. Briefly, overnight bacterial cultures were subcultured to OD = 0.1 and grown to OD = 1.0 under inducing conditions (EGTA, MgCl₂). Bacteria were fixed in 4% paraformaldehyde, washed in PBS, preincubated in 0.5% BSA in PBS and processed for immunolabeling with a rabbit anti-PcrV antibody (from Goure *et al.*, 2004; 1:200) followed by a goat-anti-rabbit secondary antibody coupled with Cy3 (Jackson ImmunoResearch; 1:1000). DNA was labeled by Hoechst. Labeled cells were immobilized by application on agarose pads (1.5% agarose in PBS) and observed under a Zeiss Axioplan Wide-field fluorescence/DIC upright microscope equipped with 100×NA1.25 oil CHROPLAN objective (ZEISS, Germany). Images were recorded by a digital CCD camera (Diagnostic Instruments RTKE slider) using fixed exposure time and gain and operated by SPOT 4.7 software (Silicon Graphic).

Assembled T3SS needles (PcrV-positive spots) were quantified by semi-automated image-based analysis using the thresholding, segmentation filtering and Analyze Particles tool in ImageJ 1.45s software (Wayne Rasband, NIH, USA). Briefly, after background subtraction, a threshold mask of bacterial cells (blue channel) and mask of PcrV spots (red channel) was generated, closely attached objects were segmented by watershed filtering and resulting particles were

quantified by the Analyze Particles command using size and circularity exclusion filter. All images were processed identically using a batch processing macro and measured values were exported to MS Excel for statistical analysis to calculate average number of PcrV-positive spots per cell. For each sample, several images were analyzed (4000–8000 cells in total).

ExoS- β -lactamase detection

After 3 h of infection, cells were incubated with freshly prepared 6 \times CCF2/AM solution (1 μ M final concentration; Invitrogen). The percentage of cells that received reporter fusions was quantified by the measurement of the ratio between blue (460 nm) and green (538 nm) fluorescence monitored during 120 min on a Multiscan EX fluorometer (Thermo).

HUVEC cell retraction analysis

For the cell retraction assay, cells were fixed in methanol at -20°C for 10 min and labeled for actin and with Hoechst dye for cell counting. Images were captured with a low magnification objective (16 \times) and treated with ImageJ software (Huber *et al.*, 2014). Briefly, images of actin staining were binarized, and the total cell surface was calculated for each image ($n = 10$).

Acknowledgements

We would like to thank Michel Ragno for his help with antibody characterization and affinity purifications; Stéphanie Bouillot and Philippe Huber for HUVECs preparation and data analysis; François Cretin for his help with ExoS-Bla experiments; and Sylvie Elsen for discussions. I.A. thanks Thomas J. Dougherty (Department of Microbiology and Immunobiology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA) for his critical reading of the manuscript.

L.M. is a post-doctoral fellow from the AVIESAN grant and D.L. received a LabEx GRAL fellowship. The work was supported by the AVIESAN-CEA collaborative program and by the LabEx GRAL grants (ANR-10-LABX-49-01). The work used the platforms of the Grenoble Instruct Centre (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). The electron microscope facility is supported by the Rhône-Alpes Region, the Fondation Recherche Medicale (FRM), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the University of Grenoble, EMBL and the GIS-Infrastructures en Biologie Sante et Agronomie (IBISA).

L.M., D.L., D.F., T.G. and A.B. performed the experiments. E.F., R.D. and G.S. contributed reagents, L.M., D.L., R.D., G.S., E.F. and I.A. analyzed the data. L.M. and I.A. designed the project and wrote the manuscript.

References

Aiello, D., Williams, J.D., Majgier-Baranowska, H., Patel, I., Peet, N.P., Huang, J. *et al.* (2010) Discovery and characterization of inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 1988–1999.

Akeda, Y., and Galan, J.E. (2005) Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**: 911–915.

Broz, P., Mueller, C.A., Muller, S.A., Philippsen, A., Sorg, I., Engel, A., and Cornelis, G.R. (2007) Function and molecular architecture of the *Yersinia* injectisome tip complex. *Mol Microbiol* **65**: 1311–1320.

Charpentier, X., and Oswald, E. (2004) Identification of the secretion and translocation domain of the enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector Cif, using TEM-1 beta-lactamase as a new fluorescence-based reporter. *J Bacteriol* **186**: 5486–5495.

Cherradi, Y., Schiavolin, L., Moussa, S., Meghraoui, A., Meksem, A., Biskri, L., *et al.* (2013) Interplay between predicted inner-rod and gatekeeper in controlling substrate specificity of the type III secretion system. *Mol Microbiol* **87**: 1183–1199.

Cherradi, Y., Hachani, A., and Allaoui, A. (2014) Spa13 of *Shigella flexneri* has a dual role: chaperone escort and export gate-activator switch of the type III secretion system. *Microbiology* **160**: 130–141.

Craig, L., Volkmann, N., Arvai, A.S., Pique, M.E., Yeager, M., Egelman, E.H., and Tainer, J.A. (2006) Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions. *Mol Cell* **23**: 651–662.

Dacheux, D., Toussaint, B., Richard, M., Brochier, G., Croize, J., and Attree, I. (2000) *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun* **68**: 2916–2924.

Dacheux, D., Goure, J., Chabert, J., Usson, Y., and Attree, I. (2001) Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Mol Microbiol* **40**: 76–85.

Darboe, N., Kenjale, R., Picking, W.L., Picking, W.D., and Middaugh, C.R. (2006) Physical characterization of MxiH and PrgI, the needle component of the type III secretion apparatus from *Shigella* and *Salmonella*. *Protein Sci* **15**: 543–552.

Diepold, A., Amstutz, M., Abel, S., Sorg, I., Jenal, U., and Cornelis, G.R. (2010) Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome. *EMBO J* **29**: 1928–1940.

Diepold, A., Wiesand, U., and Cornelis, G.R. (2011) The assembly of the export apparatus (YscR,S,T,U,V) of the *Yersinia* type III secretion apparatus occurs independently of other structural components and involves the formation of an YscV oligomer. *Mol Microbiol* **82**: 502–514.

Diepold, A., Wiesand, U., Amstutz, M., and Cornelis, G.R. (2012) Assembly of the *Yersinia* injectisome: the missing pieces. *Mol Microbiol* **85**: 878–892.

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

Galan, J.E., Lara-Tejero, M., Marlovits, T.C., and Wagner, S. (2014) Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annu Rev Microbiol* **68**: 415–438.

- Gebus, C., Faudry, E., Bohn, Y.S., Elsen, S., and Attree, I. (2008) Oligomerization of PcrV and LcrV, protective antigens of *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia pestis*. *J Biol Chem* **283**: 23940–23949.
- Gendrin, C., Contreras-Martel, C., Bouillot, S., *et al.* (2012) Structural basis of cytotoxicity mediated by the type III secretion toxin ExoU from *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* **8**: e1002637.
- Goure, J., Pastor, A., Faudry, E., Chabert, J., Dessen, A., and Attree, I. (2004) The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes. *Infect Immun* **72**: 4741–4750.
- Goure, J., Broz, P., Attree, O., Cornelis, G.R., and Attree, I. (2005) Protective anti-V antibodies inhibit *Pseudomonas* and *Yersinia* translocon assembly within host membranes. *J Infect Dis* **192**: 218–225.
- Hoang, T.T., Kutchma, A.J., Becher, A., and Schweizer, H.P. (2000) Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid* **43**: 59–72.
- Huber, P., Bouillot, S., Elsen, S., and Attree, I. (2014) Sequential inactivation of Rho GTPases and Lim kinase by *Pseudomonas aeruginosa* toxins ExoS and ExoT leads to endothelial monolayer breakdown. *Cell Mol Life Sci* **71**: 1927–1941.
- Johnson, S., Roversi, P., Espina, M., *et al.* (2007) Self-chaperoning of the type III secretion system needle tip proteins IpaD and BipD. *J Biol Chem* **282**: 4035–4044.
- Kimbrough, T.G., and Miller, S.I. (2000) Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11008–11013.
- Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S.I., and Galan, J.E. (2000) Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 10225–10230.
- Kusunoki, H., MacDonald, R.I., and Mondragon, A. (2004a) Structural insights into the stability and flexibility of unusual erythroid spectrin repeats. *Structure* **12**: 645–656.
- Kusunoki, H., Minasov, G., Macdonald, R.I., and Mondragon, A. (2004b) Independent movement, dimerization and stability of tandem repeats of chicken brain alpha-spectrin. *J Mol Biol* **344**: 495–511.
- Lara-Tejero, M., Kato, J., Wagner, S., Liu, X., and Galan, J.E. (2011) A sorting platform determines the order of protein secretion in bacterial type III systems. *Science* **331**: 1188–1191.
- Lee, V.T., Smith, R.S., Tummler, B., and Lory, S. (2005) Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the type III secretion system in vitro and during infection. *Infect Immun* **73**: 1695–1705.
- Lefebvre, M.D., and Galan, J.E. (2014) The inner rod protein controls substrate switching and needle length in a *Salmonella* type III secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 817–822.
- Marlovits, T.C., Kubori, T., Lara-Tejero, M., Thomas, D., Unger, V.M., and Galan, J.E. (2006) Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectosome. *Nature* **441**: 637–640.
- Mattei, P.J., Faudry, E., Job, V., Izore, T., Attree, I., and Dessen, A. (2011) Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon. *FEBS J* **278**: 414–426.
- Miao, E.A., Mao, D.P., Yudkovsky, N., *et al.* (2010) Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 3076–3080.
- Mota, L.J., Journet, L., Sorg, I., Agrain, C., and Cornelis, G.R. (2005) Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Science* **307**: 1278.
- Mueller, C.A., Broz, P., Muller, S.A., *et al.* (2005) The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectosome needles. *Science* **310**: 674–676.
- Pastor, A., Chabert, J., Louwagie, M., Garin, J., and Attree, I. (2005) PscF is a major component of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion needle. *FEMS Microbiol Lett* **253**: 95–101.
- Ple, S., Job, V., Dessen, A., and Attree, I. (2010) Cochaperone interactions in export of the type III needle component PscF of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **192**: 3801–3808.
- Quinaud, M., Chabert, J., Faudry, E., *et al.* (2005) The PscE-PscF-PscG complex controls type III secretion needle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **280**: 36293–36300.
- Quinaud, M., Ple, S., Job, V., Contreras-Martel, C., Simorre, J.P., Attree, I., and Dessen, A. (2007) Structure of the heterotrimeric complex that regulates type III secretion needle formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 7803–7808.
- Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* **5**: 725–738.
- Saijo-Hamano, Y., Uchida, N., Namba, K., and Oosawa, K. (2004) In vitro characterization of FlgB, FlgC, FlgF, FlgG, and FliE, flagellar basal body proteins of *Salmonella*. *J Mol Biol* **339**: 423–435.
- Sal-Man, N., Deng, W., and Finlay, B.B. (2012) EscI: a crucial component of the type III secretion system forms the inner rod structure in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Biochem J* **442**: 119–125.
- Sall, K.M., Casabona, M.G., Bordi, C., Huber, P., de Bentzmann, S., Attree, I., and Elsen, S. (2014) A gacS deletion in *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate CHA shapes its virulence. *PLoS ONE* **9**: e95936.
- Sato, H., Frank, D.W., Hillard, C.J., *et al.* (2003) The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J* **22**: 2959–2969.
- Schraidt, O., Lefebvre, M.D., Brunner, M.J., *et al.* (2010) Topology and organization of the *Salmonella typhimurium* type III secretion needle complex components. *PLoS Pathog* **6**: e1000824.
- Sorg, J.A., Blaylock, B., and Schneewind, O. (2006) Secretion signal recognition by YscN, the *Yersinia* type III secretion ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 16490–16495.
- Sukhan, A., Kubori, T., Wilson, J., and Galan, J.E. (2001) Genetic analysis of assembly of the *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* type III secretion-associated needle complex. *J Bacteriol* **183**: 1159–1167.
- Tamano, K., Aizawa, S., Katayama, E., *et al.* (2000) Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion

- machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *EMBO J* **19**: 3876–3887.
- Toussaint, B., Delic-Attree, I., and Vignais, P.M. (1993) *Pseudomonas aeruginosa* contains an IHF-like protein that binds to the algD promoter. *Biochem Biophys Res Commun* **196**: 416–421.
- Troisfontaines, P., and Cornelis, G.R. (2005) Type III secretion: more systems than you think. *Physiology (Bethesda)* **20**: 326–339.
- Vance, R.E., Rietsch, A., and Mekalanos, J.J. (2005) Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in vivo. *Infect Immun* **73**: 1706–1713.
- Verove, J., Bernarde, C., Bohn, Y.S., Boulay, F., Rabiet, M.J., Attree, I., and Cretin, F. (2012) Injection of *Pseudomonas aeruginosa* Exo toxins into host cells can be modulated by host factors at the level of translocon assembly and/or activity. *PLoS ONE* **7**: e30488.
- Warrener, P., Varkey, R., Bonnell, J.C., et al. (2014) A novel anti-PcrV antibody providing enhanced protection against *Pseudomonas aeruginosa* in multiple animal infection models. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 4384–4391.
- Whitmore, L., and Wallace, B.A. (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* **32**: W668–W673.
- Whitmore, L., and Wallace, B.A. (2008) Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* **89**: 392–400.
- Wilharm, G., Dittmann, S., Schmid, A., and Heesemann, J. (2007) On the role of specific chaperones, the specific ATPase, and the proton motive force in type III secretion. *Int J Med Microbiol* **297**: 27–36.
- Wood, S.E., Jin, J., and Lloyd, S.A. (2008) YscP and YscU switch the substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system by regulating export of the inner rod protein YscI. *J Bacteriol* **190**: 4252–4262.
- Yonekura, K., Maki-Yonekura, S., and Namba, K. (2003) Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* **424**: 643–650.
- Zhang, Y. (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9**: 40.
- Zhong, D., Lefebvre, M., Kaur, K., et al. (2012) The *Salmonella* type III secretion system inner rod protein PrgJ is partially folded. *J Biol Chem* **287**: 25303–25311.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

On Full-length proteins		Similarity (%)					
		PscI	YscI	PrgJ	MxII	BsaK	EscI
Identity (%)	PscI		53	28,1	31,3	41,2	30,3
	YscI	45,2		29,9	30,2	34,2	26,1
	PrgJ	14,9	16,2		44,6	44,1	21,8
	MxII	13,4	18,1	31,7		51	22,5
	BsaK	24,6	20,5	28,4	37		26,8
	EscI	11,3	12,7	13,4	13,4	16,2	

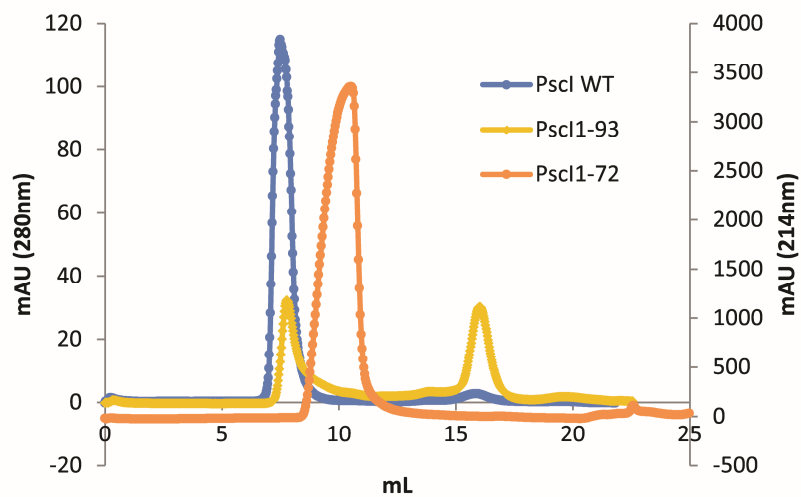
On C-ter parts aligned		Similarity (%)					
		PscI	YscI	PrgJ	MxII	BsaK	EscI
Identity (%)	PscI		77,3	37	41,3	47,8	45,7
	YscI	72,7		37	39,1	39,1	43,5
	PrgJ	17,4	17,4		53,3	60,9	34,8
	MxII	23,9	28,3	44,4		67,4	39,1
	BsaK	28,3	23,9	45,7	58,7		41,3
	EscI	17,4	17,4	19,6	23,9	26,1	

Supplementary Figure S1 Summary of the identity and similarity scores between inner rod proteins on full length proteins (upper table) or on their C terminal part (lower table). Similarity and identity scores were calculated by AlignX, a component of the Vector NTI Advance 11.5.2 software.

Rank	PDB Hit	Template Protein Structure	Identity in threading region	Identity in whole template	Coverage of threading alignment	Normalized Z-score
1	2kv7A	soluble PrgI needle protein mutant	0,13	0,11	0,62	1,09
2	2ca5A	monomeric MxiH needle protein	0,15	0,12	0,54	1,14
3	2v6lA	model of T3SS needle	0,13	0,16	0,61	1,06
4	3g0uA	monomeric BsaL needle protein	0,16	0,09	0,46	1,12
5	3uumA	first spectrin repeat of utrophin	0,08	0,20	0,95	1,00
6	3uunA	first spectrin repeat of dystrophin	0,10	0,19	0,99	0,78
7	3uunA	first spectrin repeat of dystrophin	0,10	0,19	0,92	1,00
8	4bj1A	Sacc. cerevisiae RIF2	0,10	0,12	0,96	0,68
9	3uulA	first spectrin repeat of utrophin	0,07	0,20	1,00	0,75
10	3zqeA	PrgI-SipD needle-tip complex	0,14	0,14	0,62	0,80

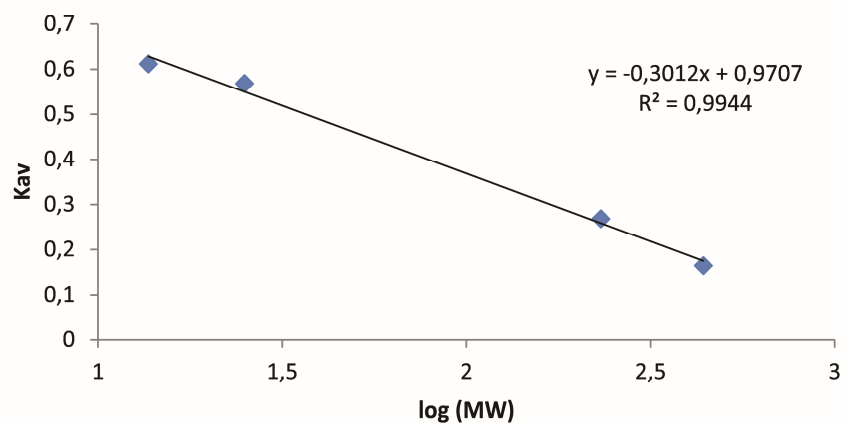
Supplementary Figure S2 Summary of the 10 templates used by i-TASSER for PscI modeling.

A



B

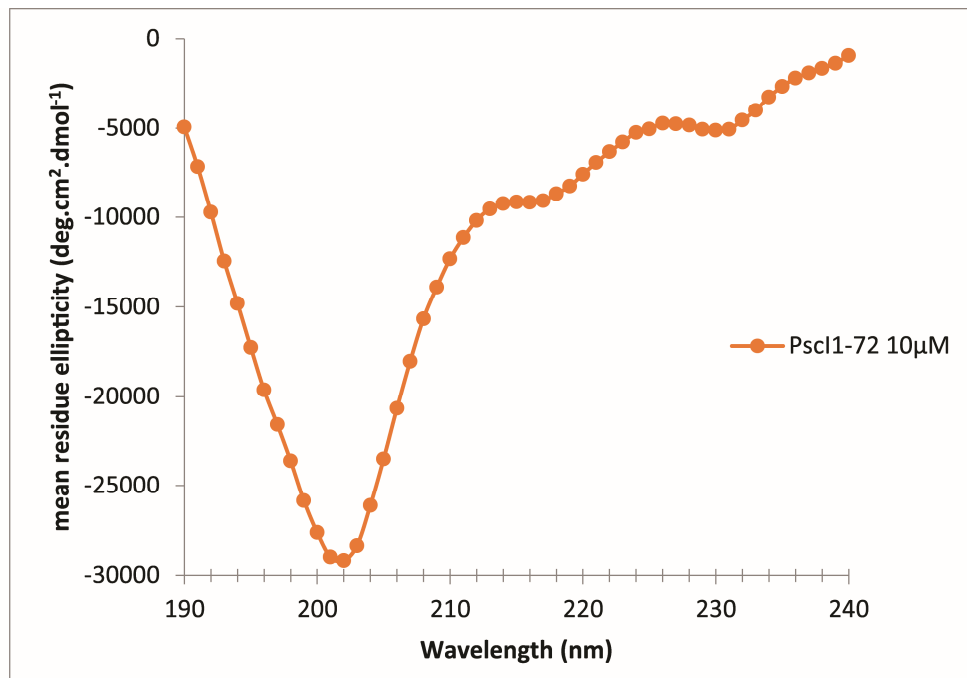
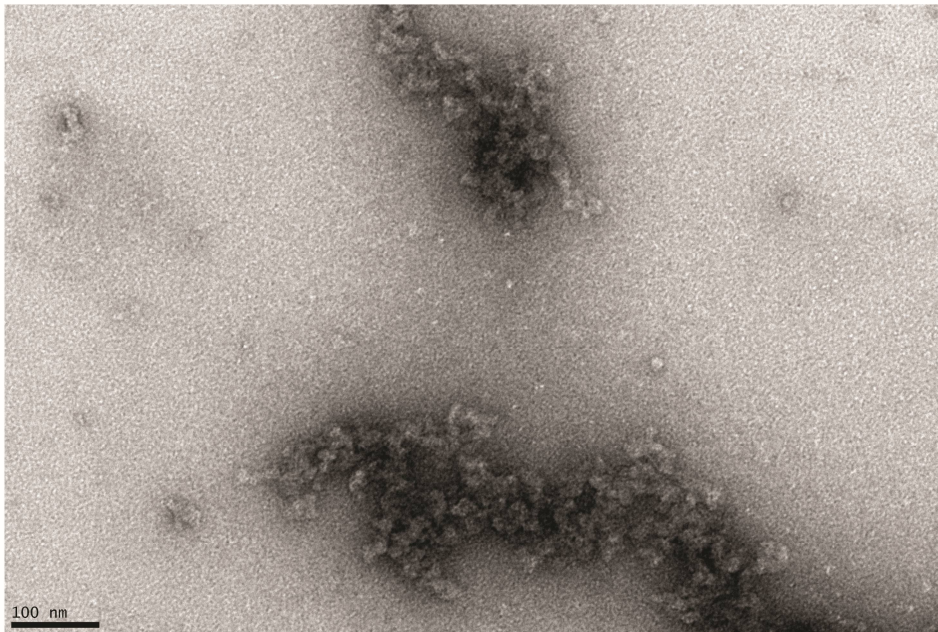
S200 10/300GL Calibration



	MW th (kDa)	Ve (mL)	log MW	Kav
Ribonuclease A	13,7	17,785	1,13672057	0,6115625
Chymotrypsinogen A	25	17,085	1,39794001	0,5678125
Catalase	232	12,282	2,36548798	0,267625
Ferritin	440	10,619	2,64345268	0,1636875

	MW exp (kDa)	Ve (mL)	log MW	Kav
PscI1-93 peak n°2	36,17	16,021	1,55839143	0,5013125
PscI1-72 peak n°1	501,03	10,52	2,6998672	0,1575

Supplementary Figure S3 Analysis of PscI proteins on Superdex200 10/300 GL gel filtration column. (A) PscI^{WT}, PscI¹⁻⁷² and PscI¹⁻⁹³ elution profiles are represented in blue, orange and yellow respectively. PscI^{WT} and PscI¹⁻⁹³ elution were recorded at 280nm whereas PscI¹⁻⁷² elution was monitored at 214nm due to the absence of Trp residue (B) Calibration of the column to determine the MW of PscI¹⁻⁷² peak and the second peak of PscI¹⁻⁹³.

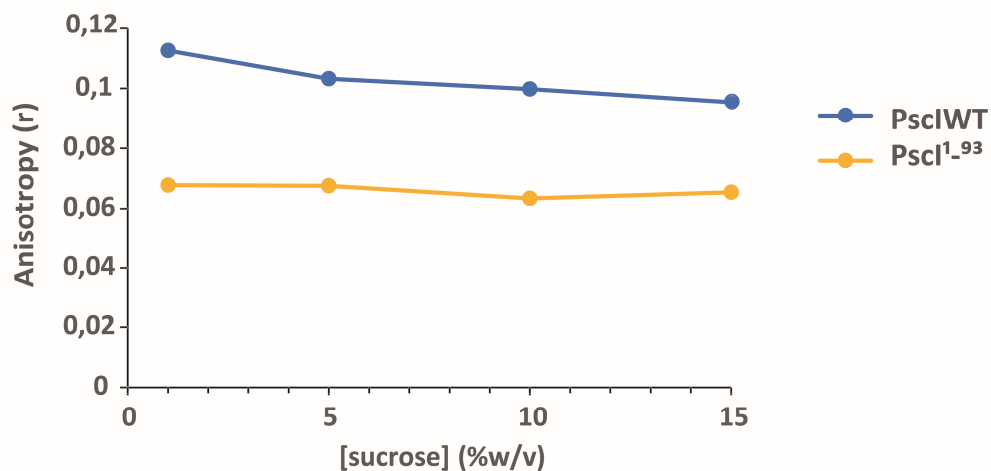
A**B**

Supplementary Figure S4 Analysis of PscI¹⁻⁷² by circular dichroism and electron microscopy. (A) PscI¹⁻⁷² was prepared at 0.1mg/mL and analyzed by circular dichroism in far-UV (190-240nm) and (B) by electron microscopy after negative staining.

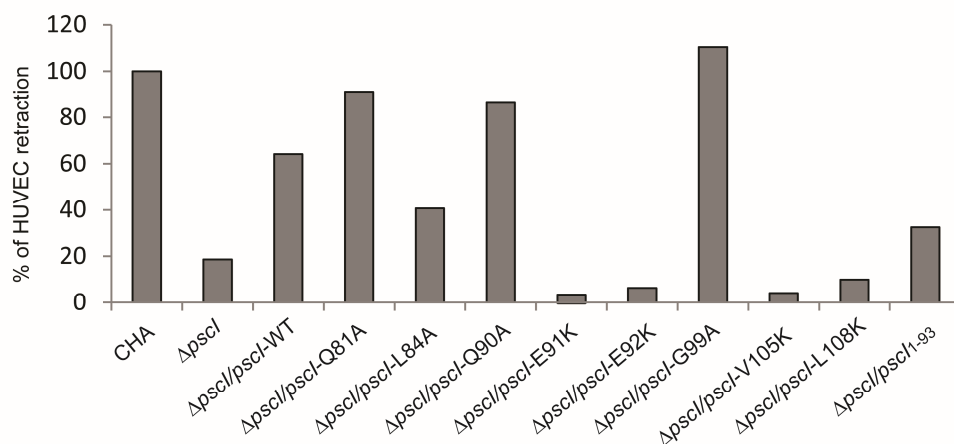
	NRMSD	% Regular Helix	% Distorted Helix	% Regular Strand	% Distorted Strand	% Turns	% Unordered
PscIwt	0,092	15,2	9,6	13,9	9,6	20,5	31,2
PscI1-93	0,145	6,4	8,6	19,1	10,4	21,2	34,4

		Helix	Strand	Turns	Unordered
PscIwt	nb residues	28	26	23	35
PscI1-93		14	27	20	32

Supplementary Figure S5 Summary of the secondary structures prediction done by Dichroweb. Percentage of each type of secondary structure is given in the upper table whereas the number of amino acids involved in these structures (normalized by the length of the protein) is calculated in the lower table.



Supplementary Figure S6 Evolution of the anisotropy value of PscI^{WT} and PscI¹⁻⁹³ upon sucrose gradient.



Supplementary Figure S7 Measurement of HUVECs cell retraction after infection with PscI mutants.

STRAINS	Characteristics	Origin
CHA	Mucoid CF isolate	Toussaint <i>et al.</i> , 1993
Δ pscF	CHA deleted of the <i>pscF</i> gene	Pastor <i>et al.</i> , 2005
Δ pscF/ <i>pscF</i>	Δ pscF complemented with pIAPG- <i>pscF</i>	Pastor <i>et al.</i> , 2005
Δ pscF/ <i>pscl</i>	Δ pscF complemented with pIAPG- <i>pscl</i>	This study
Δ pscl	CHA deleted of the <i>pscl</i> gene	This study
Δ pscl/ <i>pscl</i>	Δ pscl complemented with pIAPG- <i>pscl</i>	This study
Δ pscl/ <i>pscF</i>	Δ pscl complemented with pIAPG- <i>pscF</i>	This study
Δ pscl/ <i>pscl</i> Q81A	Δ pscl complemented with pIAPG- <i>pscl</i> Q81A	This study
Δ pscl/ <i>pscl</i> L84A	Δ pscl complemented with pIAPG- <i>pscl</i> L84A	This study
Δ pscl/ <i>pscl</i> Q90A	Δ pscl complemented with pIAPG- <i>pscl</i> Q90A	This study
Δ pscl/ <i>pscl</i> E91K	Δ pscl complemented with pIAPG- <i>pscl</i> E91K	This study
Δ pscl/ <i>pscl</i> E92K	Δ pscl complemented with pIAPG- <i>pscl</i> E92K	This study
Δ pscl/ <i>pscl</i> G99A	Δ pscl complemented with pIAPG- <i>pscl</i> G99A	This study
Δ pscl/ <i>pscl</i> V105K	Δ pscl complemented with pIAPG- <i>pscl</i> V105K	This study
Δ pscl/ <i>pscl</i> L108K	Δ pscl complemented with pIAPG- <i>pscl</i> L108K	This study
Δ pscl/ <i>pscl</i> ¹⁻⁹³	Δ pscl complemented with pIAPG- <i>pscl</i> ¹⁻⁹³	This study
Δ pscl:: <i>exoU</i> - <i>spcU</i>	Δ pscl with <i>exoU</i> - <i>spcU</i> genes inserted in the chromosome	This study
Δ pscl:: <i>exoU</i> - <i>spcU</i> / <i>pscl</i>	Δ pscl:: <i>exoU</i> - <i>spcU</i> complemented with pIAPG- <i>pscl</i>	This study
Δ pscl:: <i>exoU</i> - <i>spcU</i> / <i>pscl</i> Q81A	Δ pscl:: <i>exoU</i> - <i>spcU</i> complemented with pIAPG- <i>pscl</i> Q81A	This study
Δ pscl:: <i>exoU</i> - <i>spcU</i> / <i>pscl</i> L84A	Δ pscl:: <i>exoU</i> - <i>spcU</i> complemented with pIAPG- <i>pscl</i> L84A	This study
Δ pscl:: <i>exoU</i> - <i>spcU</i> / <i>pscl</i> Q90A	Δ pscl:: <i>exoU</i> - <i>spcU</i> complemented with pIAPG- <i>pscl</i> Q90A	This study
Δ pscl:: <i>exoU</i> - <i>spcU</i> / <i>pscl</i> E91K	Δ pscl:: <i>exoU</i> - <i>spcU</i> complemented with pIAPG- <i>pscl</i> E91K	This study
Δ pscl:: <i>exoU</i> - <i>spcU</i> / <i>pscl</i> E92K	Δ pscl:: <i>exoU</i> - <i>spcU</i> complemented with pIAPG- <i>pscl</i> E92K	This study
Δ pscl:: <i>exoU</i> - <i>spcU</i> / <i>pscl</i> G99A	Δ pscl:: <i>exoU</i> - <i>spcU</i> complemented with pIAPG- <i>pscl</i> G99A	This study
Δ pscl:: <i>exoU</i> - <i>spcU</i> / <i>pscl</i> V105K	Δ pscl:: <i>exoU</i> - <i>spcU</i> complemented with pIAPG- <i>pscl</i> V105K	This study
Δ pscl:: <i>exoU</i> - <i>spcU</i> / <i>pscl</i> L108K	Δ pscl:: <i>exoU</i> - <i>spcU</i> complemented with pIAPG- <i>pscl</i> L108K	This study
Δ pscl:: <i>exoU</i> - <i>spcU</i> / <i>pscl</i> ¹⁻⁹³	Δ pscl:: <i>exoU</i> - <i>spcU</i> complemented with pIAPG- <i>pscl</i> ¹⁻⁹³	This study
CHA:: <i>exoS</i> - <i>Bla</i> /pIAPG	CHA:: <i>exoS</i> - <i>Bla</i> transformed with pIAPG plasmid	This study
CHA Δ <i>popBD</i> :: <i>exoS</i> - <i>Bla</i>	CHA deleted of <i>popBD</i> genes and with <i>exoS</i> - <i>Bla</i> fusion inserted in the chromosome	Gouré <i>et al.</i> , 2004
Δ pscl:: <i>exoS</i> - <i>Bla</i>	Δ pscl with <i>exoS</i> - <i>Bla</i> fusion inserted in the chromosome	This study
Δ pscl:: <i>exoS</i> - <i>Bla</i> / <i>pscl</i>	Δ pscl:: <i>exoS</i> - <i>Bla</i> complemented with pIAPG- <i>pscl</i>	This study
Δ pscl:: <i>exoS</i> - <i>Bla</i> / <i>pscl</i> Q81A	Δ pscl:: <i>exoS</i> - <i>Bla</i> complemented with pIAPG- <i>pscl</i> Q81A	This study
Δ pscl:: <i>exoS</i> - <i>Bla</i> / <i>pscl</i> L84A	Δ pscl:: <i>exoS</i> - <i>Bla</i> complemented with pIAPG- <i>pscl</i> L84A	This study
Δ pscl:: <i>exoS</i> - <i>Bla</i> / <i>pscl</i> Q90A	Δ pscl:: <i>exoS</i> - <i>Bla</i> complemented with pIAPG- <i>pscl</i> Q90A	This study
Δ pscl:: <i>exoS</i> - <i>Bla</i> / <i>pscl</i> E91K	Δ pscl:: <i>exoS</i> - <i>Bla</i> complemented with pIAPG- <i>pscl</i> E91K	This study
Δ pscl:: <i>exoS</i> - <i>Bla</i> / <i>pscl</i> E92K	Δ pscl:: <i>exoS</i> - <i>Bla</i> complemented with pIAPG- <i>pscl</i> E92K	This study
Δ pscl:: <i>exoS</i> - <i>Bla</i> / <i>pscl</i> G99A	Δ pscl:: <i>exoS</i> - <i>Bla</i> complemented with pIAPG- <i>pscl</i> G99A	This study
Δ pscl:: <i>exoS</i> - <i>Bla</i> / <i>pscl</i> V105K	Δ pscl:: <i>exoS</i> - <i>Bla</i> complemented with pIAPG- <i>pscl</i> V105K	This study
Δ pscl:: <i>exoS</i> - <i>Bla</i> / <i>pscl</i> L108K	Δ pscl:: <i>exoS</i> - <i>Bla</i> complemented with pIAPG- <i>pscl</i> L108K	This study
Δ pscl:: <i>exoS</i> - <i>Bla</i> / <i>pscl</i> ¹⁻⁹³	Δ pscl:: <i>exoS</i> - <i>Bla</i> complemented with pIAPG- <i>pscl</i> ¹⁻⁹³	This study
PLASMIDS	Characteristics	Origin
pET30b- <i>pscl</i>	NdeI XhoI PCR fragment <i>pscl</i> cloned into pET30b	This study
pET30b- <i>pscl</i> ¹⁻⁷²	pET30b- <i>pscl</i> deleted of the region coding for the last 40 amino acids	This study
pET30b- <i>pscl</i> ¹⁻⁹³	pET30b- <i>pscl</i> deleted of the region coding for the last 19 amino acids	This study
pIAPG	pUCP20 derivated plasmid by fusion between the pcrGVH- <i>popBD</i> promoter (pG) and GFP	Gouré <i>et al.</i> , 2004
pIAPG- <i>pscF</i>	NdeI HindIII PCR fragment <i>pscF</i> cloned into pIAPG	Pastor <i>et al.</i> , 2005
pIAPG- <i>pscl</i>	NdeI HindIII PCR fragment <i>pscl</i> cloned into pIAPG	This study
pIAPG- <i>pscl</i> Q81A	NdeI HindIII PCR fragment <i>pscl</i> Q81A cloned into pIAPG	This study
pIAPG- <i>pscl</i> L84A	NdeI HindIII PCR fragment <i>pscl</i> L84A cloned into pIAPG	This study
pIAPG- <i>pscl</i> Q90A	NdeI HindIII PCR fragment <i>pscl</i> Q90A cloned into pIAPG	This study
pIAPG- <i>pscl</i> E91K	NdeI HindIII PCR fragment <i>pscl</i> E91K cloned into pIAPG	This study
pIAPG- <i>pscl</i> E92K	NdeI HindIII PCR fragment <i>pscl</i> E92K cloned into pIAPG	This study
pIAPG- <i>pscl</i> G99A	NdeI HindIII PCR fragment <i>pscl</i> G99A cloned into pIAPG	This study
pIAPG- <i>pscl</i> V105K	NdeI HindIII PCR fragment <i>pscl</i> V105K cloned into pIAPG	This study
pIAPG- <i>pscl</i> L108K	NdeI HindIII PCR fragment <i>pscl</i> L108K cloned into pIAPG	This study
pIAPG- <i>pscl</i> ¹⁻⁹³	NdeI HindIII PCR fragment <i>pscl</i> ¹⁻⁹³ cloned into pIAPG	This study
miniCTX- <i>exoU</i> - <i>spcU</i>	<i>exoU</i> - <i>spcU</i> genes inserted in the miniCTX integrative plasmid	Gendrin <i>et al.</i> , 2013
miniCTX- <i>exoS</i> - <i>Bla</i>	<i>exoS</i> _{EAP} - <i>Bla</i> fusion inserted in the miniCTX integrative plasmid	Gouré <i>et al.</i> , 2004
PRIMERS	Sequence	Characteristic
PscI-SOE-F1	tgacaccgggtgctgcccaggtgaggaca	deletion of <i>pscl</i> by SOE-PCR
PscI-SOE-R1	agggttgcgccatccgagagatc	deletion of <i>pscl</i> by SOE-PCR
PscI-SOE-F2	ggcgcaacctgatgaagaccacat	deletion of <i>pscl</i> by SOE-PCR
PscI-SOE-R2	tggtccggccgatgcccggaggactc	deletion of <i>pscl</i> by SOE-PCR
PscI 5' NdeI	gcctgacatattgatctctcggatggg	<i>pscl</i> cloning in pIAPG and pET30b
PscI 3' HindIII	cggactaagcttctcattggcttccatcaggg	<i>pscl</i> cloning in pIAPG
PscI 3' XhoI	ctcraagtggctctccaccagg	<i>pscl</i> cloning in pET30b
PscI1-72 3' XhoI	cggactctcaggtgctcggcgctgcacagct	<i>pscl</i> ¹⁻⁷² cloning in pET30b
PscI1-93 3' XhoI	cggactctcagagctctctcctcggatgctgc	<i>pscl</i> ¹⁻⁹³ cloning in pET30b
PscI-Q81A-F	caacagctgatgcagatggctgctcgtgatgcgcatc	<i>pscl</i> mutagenesis on amino acid Q81
PscI-Q81A-R	gatgcgcatcagcaccaccatcgcattcagcctgttg	<i>pscl</i> mutagenesis on amino acid Q81
PscI-L84A-F	cagatgcagtgctgcgaatgcgcatcaccatg	<i>pscl</i> mutagenesis on amino acid L84
PscI-L84A-R	catggtgatgcgattgccaccatcgcattc	<i>pscl</i> mutagenesis on amino acid L84
PscI-Q90A-F	ctgatgcgcatcaccatggcgaagagctgatcccaag	<i>pscl</i> mutagenesis on amino acid Q90
PscI-Q90A-R	cttggcgatcagctctccgcatggtgatgcgcatcag	<i>pscl</i> mutagenesis on amino acid Q90
PscI-E91K-F	gcatcaccatgcagaagagctgatcgc	<i>pscl</i> mutagenesis on amino acid E91
PscI-E91K-R	ggcgatcagctcttctcattgctgatgc	<i>pscl</i> mutagenesis on amino acid E91
PscI-E92K-F	catcaccatgcagaagagctgatcgcgaagac	<i>pscl</i> mutagenesis on amino acid E92
PscI-E92K-R	gtcttggcgatcagcttctcctcagtgatgatg	<i>pscl</i> mutagenesis on amino acid E92
PscI-G99A-F	ccaagaccctcgcgcatgagccag	<i>pscl</i> mutagenesis on amino acid G99
PscI-G99A-R	ctggctcatcgcgcatgagctctgg	<i>pscl</i> mutagenesis on amino acid G99
PscI-V105K-F	ggcgcatgagcagaacaagaaccctgatgaagac	<i>pscl</i> mutagenesis on amino acid V105
PscI-V105K-R	gtcttcatcaggtttcttctcgtcctcagctc	<i>pscl</i> mutagenesis on amino acid V105
PscI-L108K-F	ccagaagctcgaaccaagatgaagaccacatc	<i>pscl</i> mutagenesis on amino acid L108
PscI-L108K-R	gagttggctctcattctggtttcagcattctgg	<i>pscl</i> mutagenesis on amino acid L108
PscI1-93 3' HindIII	cggactaagcttccagctctcctcagctggtga	<i>pscl</i> deletion of 19 last amino acids

Supplementary Table S1 Summary of the strains, plasmids and primers used in this study.

RÉFÉRENCES

- Adamo, R., Sokol, S., Soong, G., Gomez, M.I., Prince, A., 2004. *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30, 627–634. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2003-02600C>
- Ali-Ahmad, A., Fadel, F., Sebban-Kreuzer, C., Ba, M., Pélissier, G.D., Bornet, O., Guerlesquin, F., Bourne, Y., Bordi, C., Vincent, F., 2017. Structural and functional insights into the periplasmic detector domain of the GacS histidine kinase controlling biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* 7, 11262. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11361-3>
- Allsopp, L.P., Wood, T.E., Howard, S.A., Maggiorcelli, F., Nolan, L.M., Wettstadt, S., Filloux, A., 2017. RsmA and AmrZ orchestrate the assembly of all three type VI secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 7707–7712. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700286114>
- Almblad, H., Harrison, J.J., Rybtke, M., Groizeleau, J., Givskov, M., Parsek, M.R., Tolker-Nielsen, T., 2015. The Cyclic AMP-Vfr Signaling Pathway in *Pseudomonas aeruginosa* Is Inhibited by Cyclic Di-GMP. *J. Bacteriol.* 197, 2190–2200. <https://doi.org/10.1128/JB.00193-15>
- Almblad, H., Rybtke, M., Hendiani, S., Andersen, J.B., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., 2019. High levels of cAMP inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation through reduction of the c-di-GMP content. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000772>
- Andersen, J.B., Sternberg, C., Poulsen, L.K., Bjorn, S.P., Givskov, M., Molin, S., 1998. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2240–2246.
- Arora, S.K., Ritchings, B.W., Almira, E.C., Lory, S., Ramphal, R., 1997. A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *J. Bacteriol.* 179, 5574–5581. <https://doi.org/10.1128/jb.179.17.5574-5581.1997>
- Azam, M.W., Khan, A.U., 2019. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discov. Today* 24, 350–359. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.07.003>
- Baker, A.E., Diepold, A., Kuchma, S.L., Scott, J.E., Ha, D.G., Orazi, G., Armitage, J.P., O'Toole, G.A., 2016. PilZ Domain Protein FlgZ Mediates Cyclic Di-GMP-Dependent Swarming Motility Control in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 198, 1837–1846. <https://doi.org/10.1128/JB.00196-16>
- Balasubramanian, D., Schneper, L., Kumari, H., Mathee, K., 2013. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Res.* 41, 1–20. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1039>
- Balczon, R., Prasain, N., Ochoa, C., Prater, J., Zhu, B., Alexeyev, M., Sayner, S., Frank, D.W., Stevens, T., 2013. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin Y-mediated tau hyperphosphorylation impairs microtubule assembly in pulmonary microvascular endothelial cells. *PloS One* 8, e74343. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074343>
- Bantinaki, E., Kassen, R., Knight, C.G., Robinson, Z., Spiers, A.J., Rainey, P.B., 2007. Adaptive divergence in experimental populations of *Pseudomonas fluorescens*. III. Mutational origins of wrinkly spreader diversity. *Genetics* 176, 441–453. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.069906>
- Bao, Y., Lies, D.P., Fu, H., Roberts, G.P., 1991. An improved Tn7-based system for the single-copy insertion of cloned genes into chromosomes of gram-negative bacteria. *Gene* 109, 167–168. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90604-A](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90604-A)
- Baraquet, C., Murakami, K., Parsek, M.R., Harwood, C.S., 2012. The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the *pel* operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic Acids Res.* 40, 7207–7218. <https://doi.org/10.1093/nar/gks384>
- Baraquet, C., Harwood, C.S., 2013. Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker A motif of the enhancer-binding protein FleQ.

- Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 18478–18483. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318972110>
- Baraquet, C., Harwood, C.S., 2016. FleQ DNA Binding Consensus Sequence Revealed by Studies of FleQ-Dependent Regulation of Biofilm Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 198, 178–186. <https://doi.org/10.1128/JB.00539-15>
- Basso, P., Ragno, M., Elsen, S., Reboud, E., Golovkine, G., Bouillot, S., Huber, P., Lory, S., Faudry, E., Attrée, I., 2017a. *Pseudomonas aeruginosa* Pore-Forming Exolysin and Type IV Pili Cooperate To Induce Host Cell Lysis. *mBio* 8. <https://doi.org/10.1128/mBio.02250-16>
- Basso, P., Wallet, P., Elsen, S., Soleilhac, E., Henry, T., Faudry, E., Attrée, I., 2017b. Multiple *Pseudomonas* species secrete exolysin-like toxins and provoke Caspase-1-dependent macrophage death. *Environ. Microbiol.* 19, 4045–4064. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13841>
- Bastaert, F., Kheir, S., Saint-Criq, V., Villeret, B., Dang, P.M.-C., El-Benna, J., Sirard, J.-C., Voulhoux, R., Sallenave, J.-M., 2018. *Pseudomonas aeruginosa* LasB Subverts Alveolar Macrophage Activity by Interfering With Bacterial Killing Through Downregulation of Innate Immune Defense, Reactive Oxygen Species Generation, and Complement Activation. *Front. Immunol.* 9, 1675. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01675>
- Baud, C., Hodak, H., Willery, E., Drobecq, H., Loch, C., Jamin, M., Jacob-Dubuisson, F., 2009. Role of DegP for two-partner secretion in *Bordetella*. *Mol. Microbiol.* 74, 315–329. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06860.x>
- Baud, C., Guérin, J., Petit, E., Lesne, E., Dupré, E., Loch, C., Jacob-Dubuisson, F., 2014. Translocation path of a substrate protein through its Omp85 transporter. *Nat. Commun.* 5, 5271. <https://doi.org/10.1038/ncomms6271>
- Baynham, P.J., Ramsey, D.M., Gvozdyev, B.V., Cordonnier, E.M., Wozniak, D.J., 2006. The *Pseudomonas aeruginosa* Ribbon-Helix-Helix DNA-Binding Protein AlgZ (AmrZ) Controls Twitching Motility and Biogenesis of Type IV Pili. *J. Bacteriol.* 188, 132–140. <https://doi.org/10.1128/JB.188.1.132-140.2006>
- Beatson, S.A., Whitchurch, C.B., Sargent, J.L., Levesque, R.C., Mattick, J.S., 2002. Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 184, 3605–3613.
- Becher, A., Schweizer, H.P., 2000. Integration-Proficient *Pseudomonas aeruginosa* Vectors for Isolation of Single-Copy Chromosomal lacZ and lux Gene Fusions. *BioTechniques* 29, 948–952. <https://doi.org/10.2144/00295bm04>
- Beckert, U., Wolter, S., Hartwig, C., Bähre, H., Kaefer, V., Ladant, D., Frank, D.W., Seifert, R., 2014. ExoY from *Pseudomonas aeruginosa* is a nucleotidyl cyclase with preference for cGMP and cUMP formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450, 870–874. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.088>
- Belete, B., Lu, H., Wozniak, D.J., 2008. *Pseudomonas aeruginosa* AlgR regulates type IV pilus biosynthesis by activating transcription of the fimU-pilVWXYZ1Y2E operon. *J. Bacteriol.* 190, 2023–2030. <https://doi.org/10.1128/JB.01623-07>
- Ben Haj Khalifa, A., Moissenet, D., Vu Thien, H., Khedher, M., 2011. [Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 69, 393–403. <https://doi.org/10.1684/abc.2011.0589>
- Bernier, S.P., Ha, D.-G., Khan, W., Merritt, J.H., O’Toole, G.A., 2011. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated group behaviors by individual amino acids through c-di-GMP signaling. *Res. Microbiol.* 162, 680–688. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.04.014>
- Bernstein, H.D., 2010. Type V Secretion: the Autotransporter and Two-Partner Secretion Pathways. *EcoSal Plus* 4. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.4.3.6>
- Berry, A., Han, K., Trouillon, J., Robert-Genthon, M., Ragno, M., Lory, S., Attrée, I., Elsen, S., 2018. cAMP and Vfr Control Exolysin Expression and Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* Taxonomic Outliers. *J. Bacteriol.* 200. <https://doi.org/10.1128/JB.00135-18>
- Bhagirath, A.Y., Pydi, S.P., Li, Y., Lin, C., Kong, W., Chelikani, P., Duan, K., 2017. Characterization of the Direct Interaction between Hybrid Sensor Kinases PA1611 and RetS That Controls

- Biofilm Formation and the Type III Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infect. Dis.* 3, 162–175. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.6b00153>
- Bleves, S., Soscia, C., Nogueira-Orlandi, P., Lazdunski, A., Filloux, A., 2005. Quorum sensing negatively controls type III secretion regulon expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 187, 3898–3902. <https://doi.org/10.1128/JB.187.11.3898-3902.2005>
- Bleves, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G.P.F., Filloux, A., Voulhoux, R., 2010. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 300, 534–543. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.08.005>
- Bleves, S., Sana, T.G., Voulhoux, R., 2014. The target cell genus does not matter. *Trends Microbiol.* 22, 304–306. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.011>
- Bordi, C., Lamy, M.-C., Ventre, I., Termine, E., Hachani, A., Fillet, S., Roche, B., Bleves, S., Méjean, V., Lazdunski, A., Filloux, A., 2010. Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 76, 1427–1443. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07146.x>
- Borlee, B.R., Goldman, A.D., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D.J., Parsek, M.R., 2010. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* 75, 827–842. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06991.x>
- Bouillot, S., Munro, P., Gallet, B., Reboud, E., Cretin, F., Golovkine, G., Schoehn, G., Attrée, I., Lemichez, E., Huber, P., 2017. *Pseudomonas aeruginosa* Exolysin promotes bacterial growth in lungs, alveolar damage and bacterial dissemination. *Sci. Rep.* 7, 2120. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02349-0>
- Boukerb, A.M., Marti, R., Cournoyer, B., 2015. Genome Sequences of Three Strains of the *Pseudomonas aeruginosa* PA7 Clade. *Genome Announc.* 3. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01366-15>
- Breidenstein, E.B.M., de la Fuente-Núñez, C., Hancock, R.E.W., 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* 19, 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>
- Brencic, A., Lory, S., 2009. Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Mol. Microbiol.* 72, 612–632. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06670.x>
- Brencic, A., McFarland, K.A., McManus, H.R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S.L., Lory, S., 2009. The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Mol. Microbiol.* 73, 434–445. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06782.x>
- Brillard, J., Duchaud, E., Boemare, N., Kunst, F., Givaudan, A., 2002. The PhlA hemolysin from the entomopathogenic bacterium *Photobacterium luminescens* belongs to the two-partner secretion family of hemolysins. *J. Bacteriol.* 184, 3871–3878.
- Broder, U.N., Jaeger, T., Jenal, U., 2016. LadS is a calcium-responsive kinase that induces acute-to-chronic virulence switch in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. Microbiol.* 2, 16184. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.184>
- Browning, D.F., Busby, S.J.W., 2016. Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 638–650. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.103>
- Brumbach, K.C., Eason, B.D., Anderson, L.K., 2007. The *Serratia*-type hemolysin of *Chromobacterium violaceum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 267, 243–250. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00566.x>
- Bruzaud, J., Tarrade, J., Coudreuse, A., Canette, A., Herry, J.-M., Taffin de Givenchy, E., Darmanin, T., Guittard, F., Guilbaud, M., Bellon-Fontaine, M.-N., 2015. Flagella but not type IV pili are involved in the initial adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to hydrophobic or superhydrophobic surfaces. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 131, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.036>
- Bucior, I., Pielage, J.F., Engel, J.N., 2012. *Pseudomonas aeruginosa* pili and flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium. *PLoS Pathog.* 8, e1002616. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002616>

- Burrowes, E., Baysse, C., Adams, C., O'Gara, F., 2006. Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiol. Read. Engl.* 152, 405–418. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28324-0>
- Burrows, L.L., 2012. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annu. Rev. Microbiol.* 66, 493–520. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150055>
- Burrows, L.L., 2013. A new route for polar navigation. *Mol. Microbiol.* 90, 919–922. <https://doi.org/10.1111/mmi.12433>
- Busby, S., Ebright, R.H., 1999. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J. Mol. Biol.* 293, 199–213. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3161>
- Buscher, A.Z., Grass, S., Heuser, J., Roth, R., Geme, J.W.S., 2006. Surface anchoring of a bacterial adhesin secreted by the two-partner secretion pathway. *Mol. Microbiol.* 61, 470–483. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05236.x>
- Cabot, G., López-Causapé, C., Ocampo-Sosa, A.A., Sommer, L.M., Domínguez, M.Á., Zamorano, L., Juan, C., Tubau, F., Rodríguez, C., Moyà, B., Peña, C., Martínez-Martínez, L., Plesiat, P., Oliver, A., 2016. Deciphering the Resistome of the Widespread *Pseudomonas aeruginosa* Sequence Type 175 International High-Risk Clone through Whole-Genome Sequencing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 7415–7423. <https://doi.org/10.1128/AAC.01720-16>
- Cadore, 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. <https://doi.org/10.1128/JB.01563-14>
- Cao, H., Krishnan, G., Goumnerov, B., Tsongalis, J., Tompkins, R., Rahme, L.G., 2001. A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 14613–14618. <https://doi.org/10.1073/pnas.251465298>
- Chaban, B., Hughes, H.V., Beeby, M., 2015. The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more. *Semin. Cell Dev. Biol.* 46, 91–103. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.032>
- Chambers, J.R., Liao, J., Schurr, M.J., Sauer, K., 2014. BrlR from *Pseudomonas aeruginosa* is a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol. Microbiol.* 92, 471–487. <https://doi.org/10.1111/mmi.12562>
- Chambonnier, G., Roux, L., Redelberger, D., Fadel, F., Filloux, A., Sivaneson, M., de Bentzmann, S., Bordi, C., 2016. The Hybrid Histidine Kinase LadS Forms a Multicomponent Signal Transduction System with the GacS/GacA Two-Component System in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet.* 12, e1006032. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006032>
- Chang, Y.-W., Rettberg, L.A., Treuner-Lange, A., Iwasa, J., Søgaard-Andersen, L., Jensen, G.J., 2016. Architecture of the type IVa pilus machine. *Science* 351, aad2001. <https://doi.org/10.1126/science.aad2001>
- Chekabab, S.M., Harel, J., Dozois, C.M., 2014. Interplay between genetic regulation of phosphate homeostasis and bacterial virulence. *Virulence* 5, 786–793. <https://doi.org/10.4161/viru.29307>
- Chen, J., Xie, J., 2011. Role and regulation of bacterial LuxR-like regulators. *J. Cell. Biochem.* 112, 2694–2702. <https://doi.org/10.1002/jcb.23219>
- Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bodilis, J., Maillot, O., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., Dufour, A., Cornelis, P., 2017. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 698–722. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux020>
- Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bazire, A., Tahrioui, A., Duchesne, R., Tortuel, D., Maillot, O., Clamens, T., Orange, N., Feuilloley, M.G.J., Lesouhaitier, O., Dufour, A., Cornelis, P., 2018. Extracytoplasmic function sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.04.008>
- Choi, K.-H., Schweizer, H.P., 2006. mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. Protoc.* 1, 153–161. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.24>

- Choi, Y., Park, H.-Y., Park, S.J., Park, S.-J., Kim, S.-K., Ha, C., Im, S.-J., Lee, J.-H., 2011. Growth phase-differential quorum sensing regulation of anthranilate metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Cells* 32, 57–65. <https://doi.org/10.1007/s10059-011-2322-6>
- Chou, S.-H., Galperin, M.Y., 2016. Diversity of Cyclic Di-GMP-Binding Proteins and Mechanisms. *J. Bacteriol.* 198, 32–46. <https://doi.org/10.1128/JB.00333-15>
- Chua, S.L., Tan, S.Y.-Y., Rybtke, M.T., Chen, Y., Rice, S.A., Kjelleberg, S., Tolker-Nielsen, T., Yang, L., Givskov, M., 2013. Bis-(3'-5')-cyclic dimeric GMP regulates antimicrobial peptide resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2066–2075. <https://doi.org/10.1128/AAC.02499-12>
- Cianciotto, N.P., White, R.C., 2017. Expanding Role of Type II Secretion in Bacterial Pathogenesis and Beyond. *Infect. Immun.* 85. <https://doi.org/10.1128/IAI.00014-17>
- Coggan, K.A., Wolfgang, M.C., 2012. Global regulatory pathways and cross-talk control *pseudomonas aeruginosa* environmental lifestyle and virulence phenotype. *Curr. Issues Mol. Biol.* 14, 47–70.
- Comolli, J.C., Hauser, A.R., Waite, L., Whitchurch, C.B., Mattick, J.S., Engel, J.N., 1999. *Pseudomonas aeruginosa* gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity in vitro and virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect. Immun.* 67, 3625–3630.
- Conrad, J.C., Gibiansky, M.L., Jin, F., Gordon, V.D., Motto, D.A., Mathewson, M.A., Stopka, W.G., Zelasko, D.C., Shrout, J.D., Wong, G.C.L., 2011. Flagella and pili-mediated near-surface single-cell motility mechanisms in *P. aeruginosa*. *Biophys. J.* 100, 1608–1616. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.02.020>
- Cooley, R.B., Smith, T.J., Leung, W., Tierney, V., Borlee, B.R., O'Toole, G.A., Sondermann, H., 2016. Cyclic Di-GMP-Regulated Periplasmic Proteolysis of a *Pseudomonas aeruginosa* Type Vb Secretion System Substrate. *J. Bacteriol.* 198, 66–76. <https://doi.org/10.1128/JB.00369-15>
- Cope, L.D., Yogev, R., Muller-Eberhard, U., Hansen, E.J., 1995. A gene cluster involved in the utilization of both free heme and heme:hempoxin by *Haemophilus influenzae* type b. *J. Bacteriol.* 177, 2644–2653.
- Cornelis, P., Matthijs, S., Van Oeffelen, L., 2009. Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 22, 15–22. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9193-0>
- Croda-García, G., Grosso-Becerra, V., Gonzalez-Valdez, A., Servín-González, L., Soberón-Chávez, G., 2011. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* rhlR: role of the CRP orthologue Vfr (virulence factor regulator) and quorum-sensing regulators LasR and RhlR. *Microbiol. Read. Engl.* 157, 2545–2555. <https://doi.org/10.1099/mic.0.050161-0>
- Cullen, L., McClean, S., 2015. Bacterial Adaptation during Chronic Respiratory Infections. *Pathog. Basel Switz.* 4, 66–89. <https://doi.org/10.3390/pathogens4010066>
- da Mata Madeira, P.V., Zouhir, S., Basso, P., Neves, D., Laubier, A., Salacha, R., Bleves, S., Faudry, E., Contreras-Martel, C., Dessen, A., 2016. Structural Basis of Lipid Targeting and Destruction by the Type V Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* 428, 1790–1803. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.03.012>
- Dal Peraro, M., van der Goot, F.G., 2016. Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 77–92. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.3>
- D'Argenio, D.A., Gallagher, L.A., Berg, C.A., Manoel, C., 2001. *Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J. Bacteriol.* 183, 1466–1471. <https://doi.org/10.1128/JB.183.4.1466-1471.2001>
- D'Argenio, D.A., Miller, S.I., 2004. Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiol. Read. Engl.* 150, 2497–2502. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27099-0>
- Davenport, P.W., Griffin, J.L., Welch, M., 2015. Quorum Sensing Is Accompanied by Global Metabolic Changes in the Opportunistic Human Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 197, 2072–2082. <https://doi.org/10.1128/JB.02557-14>
- Delattre, A.-S., Saint, N., Clantin, B., Willery, E., Lippens, G., Loch, C., Villeret, V., Jacob-Dubuisson, F., 2011. Substrate recognition by the POTRA domains of TpsB transporter FhaC. *Mol. Microbiol.* 81, 99–112. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07680.x>

- Di Venanzio, G., Stepanenko, T.M., García Vescovi, E., 2014. *Serratia marcescens* ShlA pore-forming toxin is responsible for early induction of autophagy in host cells and is transcriptionally regulated by RcsB. *Infect. Immun.* 82, 3542–3554. <https://doi.org/10.1128/IAI.01682-14>
- Dobler, L., de Carvalho, B.R., Alves, W. de S., Neves, B.C., Freire, D.M.G., Almeida, R.V., 2017. Enhanced rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing estA in a simple medium. *PLoS One* 12, e0183857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183857>
- Dubnau, D., Losick, R., 2006. Bistability in bacteria. *Mol. Microbiol.* 61, 564–572. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05249.x>
- Duong, F., Bonnet, E., Géli, V., Lazdunski, A., Murgier, M., Filloux, A., 2001. The AprX protein of *Pseudomonas aeruginosa*: a new substrate for the Apr type I secretion system. *Gene* 262, 147–153.
- Dutta, T., Srivastava, S., 2018. Small RNA-mediated regulation in bacteria: A growing palette of diverse mechanisms. *Gene* 656, 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.02.068>
- Elborn, J.S., 2016. Cystic fibrosis. *Lancet Lond. Engl.* 388, 2519–2531. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00576-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00576-6)
- Elsen, S., Huber, P., Bouillot, S., Couté, Y., Fournier, P., Dubois, Y., Timsit, J.-F., 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. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.003>
- El-Solh, A.A., Hattemer, A., Hauser, A.R., Alhajhusain, A., Vora, H., 2012. Clinical outcomes of type III *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Crit. Care Med.* 40, 1157–1163. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3182377906>
- Endoh, T., Engel, J.N., 2009. CbpA: a Polarly Localized Novel Cyclic AMP-Binding Protein in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 191, 7193–7205. <https://doi.org/10.1128/JB.00970-09>
- Fan, E., Fiedler, S., Jacob-Dubuisson, F., Müller, M., 2012. Two-partner secretion of gram-negative bacteria: a single β -barrel protein enables transport across the outer membrane. *J. Biol. Chem.* 287, 2591–2599. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.293068>
- Fan, E., Chauhan, N., Udatha, D.B.R.K.G., Leo, J.C., Linke, D., 2016. Type V Secretion Systems in Bacteria. *Microbiol. Spectr.* 4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0009-2015>
- Fatima, S., Anjum, T., 2017. Identification of a Potential ISR Determinant from *Pseudomonas aeruginosa* PM12 against *Fusarium Wilt* in Tomato. *Front. Plant Sci.* 8, 848. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00848>
- Faure, L.M., Llamas, M.A., Bastiaansen, K.C., de Bentzmann, S., Bigot, S., 2013. Phosphate starvation relayed by PhoB activates the expression of the *Pseudomonas aeruginosa* *ovrE* ECF factor and its target genes. *Microbiol. Read. Engl.* 159, 1315–1327. <https://doi.org/10.1099/mic.0.067645-0>
- Faure, L.M., Garvis, S., de Bentzmann, S., Bigot, S., 2014. Characterization of a novel two-partner secretion system implicated in the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Read. Engl.* 160, 1940–1952. <https://doi.org/10.1099/mic.0.079616-0>
- Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H., Prince, A., 1998. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect. Immun.* 66, 43–51.
- Feltman, H., Schulert, G., Khan, S., Jain, M., Peterson, L., Hauser, A.R., 2001. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Read. Engl.* 147, 2659–2669. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-10-2659>
- Figurski, D.H., Helinski, D.R., 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 1648.
- Filloux, A., 2011. Protein Secretion Systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An Essay on Diversity, Evolution, and Function. *Front. Microbiol.* 2, 155. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00155>
- Finkel, S.E., Johnson, R.C., 1992. The Fis protein: it's not just for DNA inversion anymore. *Mol. Microbiol.* 6, 3257–3265.

- Finn, R.D., Clements, J., Eddy, S.R., 2011. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res.* 39, W29-37. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr367>
- Fisher, R.A., Gollan, B., Helaine, S., 2017. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 453-464. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.42>
- Fleckenstein, J.M., Roy, K., Fischer, J.F., Burkitt, M., 2006. Identification of a two-partner secretion locus of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 74, 2245-2258. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.4.2245-2258.2006>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623-633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Folkesson, A., Jelsbak, L., Yang, L., Johansen, H.K., Ciofu, O., Høiby, N., Molin, S., 2012. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 841-851. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2907>
- Fournier, C., Smith, A., Delepelaire, P., 2011. Haem release from haemopexin by HxuA allows *Haemophilus influenzae* to escape host nutritional immunity. *Mol. Microbiol.* 80, 133-148. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07562.x>
- Fox, A., Haas, D., Reimann, C., Heeb, S., Filloux, A., Voulhoux, R., 2008. Emergence of secretion-defective sublines of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 resulting from spontaneous mutations in the *vfr* global regulatory gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1902-1908. <https://doi.org/10.1128/AEM.02539-07>
- Francis, V.I., Stevenson, E.C., Porter, S.L., 2017. Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 364. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx104>
- Francis, V.I., Waters, E.M., Finton-James, S.E., Gori, A., Kadioglu, A., Brown, A.R., Porter, S.L., 2018. Multiple communication mechanisms between sensor kinases are crucial for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. Commun.* 9, 2219. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04640-8>
- Frank, D.W., 1997. The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 26, 621-629.
- Fraser, G.M., Claret, L., Furness, R., Gupta, S., Hughes, C., 2002. Swarming-coupled expression of the *Proteus mirabilis* hpmBA haemolysin operona. *Microbiology* 148, 2191-2201. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-7-2191>
- Freeman, W.M., Walker, S.J., Vrana, K.E., 1999. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential. *BioTechniques* 26, 112-125. <https://doi.org/10.2144/99261rv01>
- Freschi, L., Jeukens, J., Kukavica-Ibrulj, I., Boyle, B., Dupont, M.-J., Laroche, J., Larose, S., Maaroufi, H., Fothergill, J.L., Moore, M., Winsor, G.L., Aaron, S.D., Barbeau, J., Bell, S.C., Burns, J.L., Camara, M., Cantin, A., Charette, S.J., Dewar, K., Déziel, É., Grimwood, K., Hancock, R.E.W., Harrison, J.J., Heeb, S., Jelsbak, L., Jia, B., Kenna, D.T., Kidd, T.J., Klockgether, J., Lam, J.S., Lamont, I.L., Lewenza, S., Loman, N., Malouin, F., Manos, J., McArthur, A.G., McKeown, J., Milot, J., Naghra, H., Nguyen, D., Pereira, S.K., Perron, G.G., Pirnay, J.-P., Rainey, P.B., Rousseau, S., Santos, P.M., Stephenson, A., Taylor, V., Turton, J.F., Waglechner, N., Williams, P., Thrane, S.W., Wright, G.D., Brinkman, F.S.L., Tucker, N.P., Tümmler, B., Winstanley, C., Levesque, R.C., 2015. Clinical utilization of genomics data produced by the international *Pseudomonas aeruginosa* consortium. *Front. Microbiol.* 6, 1036. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01036>
- Freschi, L., Bertelli, C., Jeukens, J., Moore, M.P., Kukavica-Ibrulj, I., Emond-Rheault, J.-G., Hamel, J., Fothergill, J.L., Tucker, N.P., McClean, S., Klockgether, J., de Soya, A., Brinkman, F.S.L., Levesque, R.C., Winstanley, C., 2018. Genomic characterisation of an international *Pseudomonas aeruginosa* reference panel indicates that the two major groups draw upon distinct mobile gene pools. *FEMS Microbiol. Lett.* 365. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny120>
- Freschi, L., Vincent, A.T., Jeukens, J., Emond-Rheault, J.-G., Kukavica-Ibrulj, I., Dupont, M.-J., Charette, S.J., Boyle, B., Levesque, R.C., 2019. The *Pseudomonas aeruginosa* Pan-Genome Provides New Insights on Its Population Structure, Horizontal Gene Transfer, and Pathogenicity. *Genome Biol. Evol.* 11, 109-120. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy259>

- Frey, J., Krisch, H.M., 1985. Omega mutagenesis in gram-negative bacteria: a selectable interposon which is strongly polar in a wide range of bacterial species. *Gene* 36, 143–150.
- Fuchs, E.L., Brutinel, E.D., Jones, A.K., Fulcher, N.B., Urbanowski, M.L., Yahr, T.L., Wolfgang, M.C., 2010a. The *Pseudomonas aeruginosa* Vfr regulator controls global virulence factor expression through cyclic AMP-dependent and -independent mechanisms. *J. Bacteriol.* 192, 3553–3564. <https://doi.org/10.1128/JB.00363-10>
- Fuchs, E.L., Brutinel, E.D., Klem, E.R., Fehr, A.R., Yahr, T.L., Wolfgang, M.C., 2010b. In vitro and in vivo characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* cyclic AMP (cAMP) phosphodiesterase CpdA, required for cAMP homeostasis and virulence factor regulation. *J. Bacteriol.* 192, 2779–2790. <https://doi.org/10.1128/JB.00168-10>
- Fulcher, N.B., Holliday, P.M., Klem, E., Cann, M.J., Wolfgang, M.C., 2010. The *Pseudomonas aeruginosa* Chp chemosensory system regulates intracellular cAMP levels by modulating adenylate cyclase activity. *Mol. Microbiol.* 76, 889–904. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07135.x>
- Gallegos, M.T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., Ramos, J.L., 1997. Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 61, 393–410.
- Gama, J.A., Abby, S.S., Vieira-Silva, S., Dionisio, F., Rocha, E.P.C., 2012. Immune Subversion and Quorum-Sensing Shape the Variation in Infectious Dose among Bacterial Pathogens. *PLoS Pathog.* 8, e1002503. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002503>
- Gancedo, J.M., 2013. Biological roles of cAMP: variations on a theme in the different kingdoms of life. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 88, 645–668. <https://doi.org/10.1111/brv.12020>
- Gangaiah, D., Labandeira-Rey, M., Zhang, X., Fortney, K.R., Ellinger, S., Zwickl, B., Baker, B., Liu, Y., Janowicz, D.M., Katz, B.P., Brautigam, C.A., Munson, R.S., Hansen, E.J., Spinola, S.M., 2014. *Haemophilus ducreyi* Hfq contributes to virulence gene regulation as cells enter stationary phase. *mBio* 5, e01081-01013. <https://doi.org/10.1128/mBio.01081-13>
- Garcia, M., Morello, E., Garnier, J., Barrault, C., Garnier, M., Burucoa, C., Lecron, J.-C., Si-Tahar, M., Bernard, F.-X., Bodet, C., 2018. *Pseudomonas aeruginosa* flagellum is critical for invasion, cutaneous persistence and induction of inflammatory response of skin epidermis. *Virulence* 9, 1163–1175. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1480830>
- Garnett, J.A., Muhl, D., Douse, C.H., Hui, K., Busch, A., Omisore, A., Yang, Y., Simpson, P., Marchant, J., Waksman, G., Matthews, S., Filloux, A., 2015. Structure-function analysis reveals that the *Pseudomonas aeruginosa* Tps4 two-partner secretion system is involved in CupB5 translocation. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 24, 670–687. <https://doi.org/10.1002/pro.2640>
- Gellatly, S.L., Hancock, R.E.W., 2013. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog. Dis.* 67, 159–173. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>
- Gicquel, G., Bouffartigues, E., Bains, M., Oxaran, V., Rosay, T., Lesouhaitier, O., Connil, N., Bazire, A., Maillot, O., Bénard, M., Cornelis, P., Hancock, R.E.W., Dufour, A., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., Déziel, E., Chevalier, S., 2013. The extra-cytoplasmic function sigma factor sigX modulates biofilm and virulence-related properties in *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS One* 8, e80407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080407>
- Goethals, K., Van Montagu, M., Holsters, M., 1992. Conserved motifs in a divergent nod box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveal a common structure in promoters regulated by LysR-type proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 1646–1650.
- Goldstein, J.D., Godleski, J.J., Balikian, J.P., Herman, P.G., 1982. Pathologic patterns of *Serratia marcescens* pneumonia. *Hum. Pathol.* 13, 479–484.
- Golovkine, G., Faudry, E., Bouillot, S., Voulhoux, R., Attrée, I., Huber, P., 2014. VE-cadherin cleavage by LasB protease from *Pseudomonas aeruginosa* facilitates type III secretion system toxicity in endothelial cells. *PLoS Pathog.* 10, e1003939. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003939>
- Golovkine, G., Faudry, E., Bouillot, S., Elsen, S., Attrée, I., Huber, P., 2016a. *Pseudomonas aeruginosa* Transmigrates at Epithelial Cell-Cell Junctions, Exploiting Sites of Cell Division and Senescent Cell Extrusion. *PLoS Pathog.* 12, e1005377. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005377>

- Golovkine, G., Lemelle, L., Burny, C., Vaillant, C., Paliérne, J.-F., Place, C., Huber, P., 2016b. Host cell surfaces induce a Type IV pili-dependent alteration of bacterial swimming. *Sci. Rep.* 6, 38950. <https://doi.org/10.1038/srep38950>
- González-Juarbe, N., Mares, C.A., Hinojosa, C.A., Medina, J.L., Cantwell, A., Dube, P.H., Orihuela, C.J., Bergman, M.A., 2015. Requirement for *Serratia marcescens* cytolysin in a murine model of hemorrhagic pneumonia. *Infect. Immun.* 83, 614–624. <https://doi.org/10.1128/IAI.01822-14>
- Goodman, A.L., Merighi, M., Hyodo, M., Ventre, I., Filloux, A., Lory, S., 2009. Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes Dev.* 23, 249–259. <https://doi.org/10.1101/gad.1739009>
- Grass, S., St Geme, J.W., 2000. Maturation and secretion of the non-typable *Haemophilus influenzae* HMW1 adhesin: roles of the N-terminal and C-terminal domains. *Mol. Microbiol.* 36, 55–67.
- Grass, S., Buscher, A.Z., Swords, W.E., Apicella, M.A., Barenkamp, S.J., Ozchlewski, N., St Geme, J.W., 2003. The *Haemophilus influenzae* HMW1 adhesin is glycosylated in a process that requires HMW1C and phosphoglucomutase, an enzyme involved in lipooligosaccharide biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 48, 737–751.
- Grass, S., Rempe, K.A., St Geme, J.W., 2015. Structural determinants of the interaction between the TpsA and TpsB proteins in the *Haemophilus influenzae* HMW1 two-partner secretion system. *J. Bacteriol.* 197, 1769–1780. <https://doi.org/10.1128/JB.00039-15>
- Green, E.R., Meccas, J., 2016. Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiol. Spectr.* 4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015>
- Grijpstra, J., Arenas, J., Rutten, L., Tommassen, J., 2013. Autotransporter secretion: varying on a theme. *Res. Microbiol., Bacterial secretion systems: function and structural biology* 164, 562–582. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.03.010>
- Grosso-Becerra, M.-V., Santos-Medellín, C., González-Valdez, A., Méndez, J.-L., Delgado, G., Morales-Espinosa, R., Servín-González, L., Alcaraz, L.-D., Soberón-Chávez, G., 2014. *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *BMC Genomics* 15, 318. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-318>
- Guérin, J., Bigot, S., Schneider, R., Buchanan, S.K., Jacob-Dubuisson, F., 2017. Two-Partner Secretion: Combining Efficiency and Simplicity in the Secretion of Large Proteins for Bacteria-Host and Bacteria-Bacteria Interactions. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 148. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00148>
- Gupta, K., Liao, J., Petrova, O.E., Cherny, K.E., Sauer, K., 2014. Elevated levels of the second messenger c-di-GMP contribute to antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 92, 488–506. <https://doi.org/10.1111/mmi.12587>
- Güvener, Z.T., Harwood, C.S., 2007. Subcellular location characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* GGDEF protein, WspR, indicate that it produces cyclic-di-GMP in response to growth on surfaces. *Mol. Microbiol.* 66, 1459–1473. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06008.x>
- Guzzo, J., Pages, J.M., Duong, F., Lazdunski, A., Murgier, M., 1991. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *J. Bacteriol.* 173, 5290–5297.
- Ha, D.-G., O'Toole, G.A., 2015. c-di-GMP and its Effects on Biofilm Formation and Dispersion: a *Pseudomonas Aeruginosa* Review. *Microbiol. Spectr.* 3, MB-0003-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0003-2014>
- Hachani, A., Wood, T.E., Filloux, A., 2016. Type VI secretion and anti-host effectors. *Curr. Opin. Microbiol.* 29, 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.11.006>
- Haines, S., Arnaud-Barbe, N., Poncet, D., Reverchon, S., Wawrzyniak, J., Nasser, W., Renaud-Mongénie, G., 2015. IscR Regulates Synthesis of Colonization Factor Antigen I Fimbriae in Response to Iron Starvation in Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 197, 2896–2907. <https://doi.org/10.1128/JB.00214-15>

- Hauryliuk, V., Atkinson, G.C., Murakami, K.S., Tenson, T., Gerdes, K., 2015. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 298–309. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3448>
- Hauser, A.R., Cobb, E., Bodi, M., Mariscal, D., Vallés, J., Engel, J.N., Rello, J., 2002. Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit. Care Med.* 30, 521–528.
- Hauser, A.R., 2009. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 654–665. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2199>
- Hayashi, N., Nishizawa, H., Kitao, S., Deguchi, S., Nakamura, T., Fujimoto, A., Shikata, M., Gotoh, N., 2015. *Pseudomonas aeruginosa* injects type III effector ExoS into epithelial cells through the function of type IV pili. *FEBS Lett.* 589, 890–896. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.02.031>
- Hengge, R., 2009. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 263–273. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2109>
- Herrera, M.C., Ramos, J.-L., 2007. Catabolism of phenylalanine by *Pseudomonas putida*: the NtrC-family PhhR regulator binds to two sites upstream from the *phhA* gene and stimulates transcription with sigma70. *J. Mol. Biol.* 366, 1374–1386. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.12.008>
- Herrera, M.C., Krell, T., Zhang, X., Ramos, J.-L., 2009. PhhR binds to target sequences at different distances with respect to RNA polymerase in order to activate transcription. *J. Mol. Biol.* 394, 576–586. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.09.045>
- Herrera, M.C., Duque, E., Rodríguez-Herva, J.J., Fernández-Escamilla, A.M., Ramos, J.L., 2010. Identification and characterization of the PhhR regulon in *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* 12, 1427–1438. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02124.x>
- Hickman, J.W., Tifrea, D.F., Harwood, C.S., 2005. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14422–14427. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507170102>
- Hickman, J.W., Harwood, C.S., 2008. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol. Microbiol.* 69, 376–389. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06281.x>
- Hilker, R., Munder, A., Klockgether, J., Losada, P.M., Chouvarine, P., Cramer, N., Davenport, C.F., Dethlefsen, S., Fischer, S., Peng, H., Schönfelder, T., Türk, O., Wiehlmann, L., Wölbeling, F., Gulbins, E., Goesmann, A., Tümmler, B., 2015. Interclonal gradient of virulence in the *Pseudomonas aeruginosa* pangenome from disease and environment. *Environ. Microbiol.* 17, 29–46. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12606>
- Hirono, I., Tange, N., Aoki, T., 1997. Iron-regulated haemolysin gene from *Edwardsiella tarda*. *Mol. Microbiol.* 24, 851–856.
- Hoang, T.T., Karkhoff-Schweizer, R.R., Kutchma, A.J., Schweizer, H.P., 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. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00130-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00130-9)
- Hoang, T.T., Kutchma, A.J., Becher, A., Schweizer, H.P., 2000. Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid* 43, 59–72. <https://doi.org/10.1006/plas.1999.1441>
- Hodak, H., Clantin, B., Willery, E., Villeret, V., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., 2006. Secretion signal of the filamentous haemagglutinin, a model two-partner secretion substrate. *Mol. Microbiol.* 61, 368–382. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05242.x>
- Hodak, H., Jacob-Dubuisson, F., 2007. Current challenges in autotransport and two-partner protein secretion pathways. *Res. Microbiol.* 158, 631–637. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.08.001>
- Hodak, H., Wohlkönig, A., Smet-Nocca, C., Drobecq, H., Wieruszkeski, J.-M., Sénéchal, M., Landrieu, I., Locht, C., Jamin, M., Jacob-Dubuisson, F., 2008. The peptidyl-prolyl isomerase and chaperone Par27 of *Bordetella pertussis* as the prototype for a new group of parvulins. *J. Mol. Biol.* 376, 414–426. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.10.088>

- Hoge, R., Pelzer, A., Rosenau, F., Wilhelm, S., 2010. "Weapons of a pathogen: Proteases and their role in virulence of 13.
- Holley, C.L., Zhang, X., Fortney, K.R., Ellinger, S., Johnson, P., Baker, B., Liu, Y., Janowicz, D.M., Katz, B.P., Munson, R.S., Spinola, S.M., 2015. DksA and (p)ppGpp have unique and overlapping contributions to *Haemophilus ducreyi* pathogenesis in humans. *Infect. Immun.* 83, 3281–3292. <https://doi.org/10.1128/IAI.00692-15>
- Horton, R.M., Cai, Z.L., Ho, S.N., Pease, L.R., 1990. Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *BioTechniques* 8, 528–535.
- Hovey, A.K., Frank, D.W., 1995. Analyses of the DNA-binding and transcriptional activation properties of ExsA, the transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *J. Bacteriol.* 177, 4427–4436.
- Huber, P., Basso, P., Reboud, E., Attrée, I., 2016. *Pseudomonas aeruginosa* renews its virulence factors. *Environ. Microbiol. Rep.* 8, 564–571. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12443>
- Ibarra, J.A., Pérez-Rueda, E., Segovia, L., Puente, J.L., 2008. The DNA-binding domain as a functional indicator: the case of the AraC/XylS family of transcription factors. *Genetica* 133, 65–76. <https://doi.org/10.1007/s10709-007-9185-y>
- Ieva, R., Bernstein, H.D., 2009. Interaction of an autotransporter passenger domain with BamA during its translocation across the bacterial outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 19120–19125. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907912106>
- Ieva, R., Tian, P., Peterson, J.H., Bernstein, H.D., 2011. Sequential and spatially restricted interactions of assembly factors with an autotransporter beta domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, E383–391. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103827108>
- Inclan, Y.F., Huseby, M.J., Engel, J.N., 2011. FimL regulates cAMP synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS One* 6, e15867. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015867>
- Inclan, Y.F., Persat, A., Greninger, A., Von Dollen, J., Johnson, J., Krogan, N., Gitai, Z., Engel, J.N., 2016. A scaffold protein connects type IV pili with the Chp chemosensory system to mediate activation of virulence signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 101, 590–605. <https://doi.org/10.1111/mmi.13410>
- Intile, P.J., Diaz, M.R., Urbanowski, M.L., Wolfgang, M.C., Yahr, T.L., 2014. The AlgZR two-component system recalibrates the RsmAYZ posttranscriptional regulatory system to inhibit expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *J. Bacteriol.* 196, 357–366. <https://doi.org/10.1128/JB.01199-13>
- Inuzuka, S., Nishimura, K.-I., Kakizawa, H., Fujita, Y., Furuta, H., Matsumura, S., Ikawa, Y., 2016. Mutational analysis of structural elements in a class-I cyclic di-GMP riboswitch to elucidate its regulatory mechanism. *J. Biochem. (Tokyo)* 160, 153–162. <https://doi.org/10.1093/jb/mvw026>
- Inuzuka, S., Kakizawa, H., Nishimura, K.-I., Naito, T., Miyazaki, K., Furuta, H., Matsumura, S., Ikawa, Y., 2018. Recognition of cyclic-di-GMP by a riboswitch conducts translational repression through masking the ribosome-binding site distant from the aptamer domain. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 23, 435–447. <https://doi.org/10.1111/gtc.12586>
- Irie, Y., Starkey, M., Edwards, A.N., Wozniak, D.J., Romeo, T., Parsek, M.R., 2010. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA. *Mol. Microbiol.* 78, 158–172. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07320.x>
- Ishikawa, M., Yoshimoto, S., Hayashi, A., Kanie, J., Hori, K., 2016. Discovery of a novel periplasmic protein that forms a complex with a trimeric autotransporter adhesin and peptidoglycan. *Mol. Microbiol.* 101, 394–410. <https://doi.org/10.1111/mmi.13398>
- Islam, M.A., Nain, Z., Alam, M.K., Banu, N.A., Islam, M.R., 2018. In vitro study of biocontrol potential of rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Egypt. J. Biol. Pest Control* 28, 90. <https://doi.org/10.1186/s41938-018-0097-1>
- Jacob-Dubuisson, F., Villeret, V., Clantin, B., Delattre, A.-S., Saint, N., 2009. First structural insights into the TpsB/Omp85 superfamily. *Biol. Chem.* 390, 675–684. <https://doi.org/10.1515/BC.2009.099>

- Jacob-Dubuisson, F., Guérin, J., Baelen, S., Clantin, B., 2013. Two-partner secretion: as simple as it sounds? *Res. Microbiol.* 164, 583–595. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.03.009>
- Jain, R., Sliusarenko, O., Kazmierczak, B.I., 2017. Interaction of the cyclic-di-GMP binding protein FimX and the Type 4 pilus assembly ATPase promotes pilus assembly. *PLoS Pathog.* 13, e1006594. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006594>
- Jalal, S., Wretling, B., 1998. Mechanisms of quinolone resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Drug Resist. Larchmt.* N 4, 257–261. <https://doi.org/10.1089/mdr.1998.4.257>
- Janssen, K.H., Diaz, M.R., Gode, C.J., Wolfgang, M.C., Yahr, T.L., 2018a. RsmV, a Small Noncoding Regulatory RNA in *Pseudomonas aeruginosa* That Sequesters RsmA and RsmF from Target mRNAs. *J. Bacteriol.* 200. <https://doi.org/10.1128/JB.00277-18>
- Janssen, K.H., Diaz, M.R., Golden, M., Graham, J.W., Sanders, W., Wolfgang, M.C., Yahr, T.L., 2018b. Functional Analyses of the RsmY and RsmZ Small Noncoding Regulatory RNAs in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 200. <https://doi.org/10.1128/JB.00736-17>
- Jenal, U., Reinders, A., Lori, C., 2017. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 271–284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.190>
- Jin, Y., Zhang, M., Zhu, F., Peng, Q., Weng, Y., Zhao, Q., Liu, C., Bai, F., Cheng, Z., Jin, S., Wu, W., 2019. NrtR Regulates the Type III Secretion System Through cAMP/Vfr Pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 10, 85. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00085>
- Jung, K., Fried, L., Behr, S., Heermann, R., 2012. Histidine kinases and response regulators in networks. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.11.009>
- Kaminski, A., Gupta, K.H., Goldufsky, J.W., Lee, H.W., Gupta, V., Shafikhani, S.H., 2018. *Pseudomonas aeruginosa* ExoS Induces Intrinsic Apoptosis in Target Host Cells in a Manner That is Dependent on its GAP Domain Activity. *Sci. Rep.* 8, 14047. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32491-2>
- Kanack, K.J., Runyen-Janecky, L.J., Ferrell, E.P., Suh, S.-J., West, S.E.H., 2006. Characterization of DNA-binding specificity and analysis of binding sites of the *Pseudomonas aeruginosa* global regulator, Vfr, a homologue of the *Escherichia coli* cAMP receptor protein. *Microbiol. Read. Engl.* 152, 3485–3496. <https://doi.org/10.1099/mic.0.29008-0>
- Karakuzu, Z., Iscimen, R., Akalin, H., Kelebek Girgin, N., Kahveci, F., Sinirtas, M., 2018. Prognostic Risk Factors in Ventilator-Associated Pneumonia. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 24, 1321–1328.
- Kessler, B., de Lorenzo, V., Timmis, K.N., 1992. A general system to integrate lacZ fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol. Gen. Genet. MGG* 233, 293–301.
- Kida, Y., Higashimoto, Y., Inoue, H., Shimizu, T., Kuwano, K., 2008. A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF-kappaB through protease-activated receptors. *Cell. Microbiol.* 10, 1491–1504. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01142.x>
- Kida, Y., Shimizu, T., Kuwano, K., 2011. Cooperation between LepA and PlcH contributes to the in vivo virulence and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Infect. Immun.* 79, 211–219. <https://doi.org/10.1128/IAI.01053-10>
- Kida, Y., Taira, J., Yamamoto, T., Higashimoto, Y., Kuwano, K., 2013. EprS, an autotransporter protein of *Pseudomonas aeruginosa*, possessing serine protease activity induces inflammatory responses through protease-activated receptors. *Cell. Microbiol.* 15, 1168–1181. <https://doi.org/10.1111/cmi.12106>
- Kida, Y., Taira, J., Kuwano, K., 2016. EprS, an autotransporter serine protease, plays an important role in various pathogenic phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Read. Engl.* 162, 318–329. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000228>
- Kipnis, E., Sawa, T., Wiener-Kronish, J., 2006. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med. Mal. Infect.* 36, 78–91. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2005.10.007>

- Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C.F., Tümmler, B., 2011. *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Front. Microbiol.* 2, 150. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00150>
- Köhler, T., Michéa-Hamzhepour, M., Henze, U., Gotoh, N., Curty, L.K., Pechère, J.C., 1997. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 23, 345–354.
- Köhler, T., Curty, L.K., Barja, F., van Delden, C., Pechère, J.C., 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.* 182, 5990–5996.
- Kong, W., Chen, L., Zhao, J., Shen, T., Surette, M.G., Shen, L., Duan, K., 2013. Hybrid sensor kinase PA1611 in *Pseudomonas aeruginosa* regulates transitions between acute and chronic infection through direct interaction with RetS. *Mol. Microbiol.* 88, 784–797. <https://doi.org/10.1111/mmi.12223>
- Kong, W., Zhao, J., Kang, H., Zhu, M., Zhou, T., Deng, X., Liang, H., 2015. ChIP-seq reveals the global regulator AlgR mediating cyclic di-GMP synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res.* 43, 8268–8282. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv747>
- Kos, V.N., Déraspe, M., McLaughlin, R.E., Whiteaker, J.D., Roy, P.H., Alm, R.A., Corbeil, J., Gardner, H., 2015. The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 427–436. <https://doi.org/10.1128/AAC.03954-14>
- Kung, V.L., Ozer, E.A., Hauser, A.R., 2010. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 74, 621–641. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00027-10>
- Laarman, A.J., Bardoel, B.W., Ruyken, M., Fernie, J., Milder, F.J., van Strijp, J.A.G., Rooijackers, S.H.M., 2012. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 386–393. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102162>
- Labandeira-Rey, M., Mock, J.R., Hansen, E.J., 2009. Regulation of expression of the *Haemophilus ducreyi* LspB and LspA2 proteins by CpxR. *Infect. Immun.* 77, 3402–3411. <https://doi.org/10.1128/IAI.00292-09>
- Labandeira-Rey, M., Dodd, D.A., Brautigam, C.A., Fortney, K.R., Spinola, S.M., Hansen, E.J., 2013. The *Haemophilus ducreyi* Fis protein is involved in controlling expression of the *lspB-lspA2* operon and other virulence factors. *Infect. Immun.* 81, 4160–4170. <https://doi.org/10.1128/IAI.00714-13>
- Lakhundi, S., Siddiqui, R., Khan, N.A., 2017. Pathogenesis of microbial keratitis. *Microb. Pathog.* 104, 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.12.013>
- Lam, J.S., Taylor, V.L., Islam, S.T., Hao, Y., Kocíncová, D., 2011. Genetic and Functional Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide. *Front. Microbiol.* 2, 118. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00118>
- Lamarche, M.G., Wanner, B.L., Crépin, S., Harel, J., 2008. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 461–473. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00101.x>
- Laventie, B.-J., Sangermani, M., Estermann, F., Manfredi, P., Planes, R., Hug, I., Jaeger, T., Meunier, E., Broz, P., Jenal, U., 2019. A Surface-Induced Asymmetric Program Promotes Tissue Colonization by *Pseudomonas aeruginosa*. *Cell Host Microbe* 25, 140–152.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.11.008>
- Le Berre, R., Nguyen, S., Nowak, E., Kipnis, E., Pierre, M., Quenee, L., Ader, F., Lancel, S., Courcol, R., Guery, B.P., Faure, K., Pyopneumagen Group, 2011. Relative contribution of three main virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Crit. Care Med.* 39, 2113–2120. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31821e899f>
- Lee, D.G., Urbach, J.M., Wu, G., Liberati, N.T., Feinbaum, R.L., Miyata, S., Diggins, L.T., He, J., Saucier, M., Déziel, E., Friedman, L., Li, L., Grills, G., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Rahme, L.G., Ausubel, F.M., 2006. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol.* 7, R90. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-10-r90>
- Lee, J., Zhang, L., 2015. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 6, 26–41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>

- Lee, V.T., Matewish, J.M., Kessler, J.L., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Lory, S., 2007. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol. Microbiol.* 65, 1474–1484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05879.x>
- Li, M.Z., Elledge, S.J., 2007. Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat. Methods* 4, 251–256. <https://doi.org/10.1038/nmeth1010>
- Lin Chua, S., Liu, Y., Li, Y., Jun Ting, H., Kohli, G.S., Cai, Z., Suwanchaikasem, P., Kau Kit Goh, K., Pin Ng, S., Tolker-Nielsen, T., Yang, L., Givskov, M., 2017. Reduced Intracellular c-di-GMP Content Increases Expression of Quorum Sensing-Regulated Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 451. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00451>
- Lin, C.-S., Horng, J.-T., Yang, C.-H., Tsai, Y.-H., Su, L.-H., Wei, C.-F., Chen, C.-C., Hsieh, S.-C., Lu, C.-C., Lai, H.-C., 2010. RssAB-FlhDC-ShlBA as a major pathogenesis pathway in *Serratia marcescens*. *Infect. Immun.* 78, 4870–4881. <https://doi.org/10.1128/IAI.00661-10>
- Lin, C.-T., Huang, Y.-J., Chu, P.-H., Hsu, J.-L., Huang, C.-H., Peng, H.-L., 2006. Identification of an HptB-mediated multi-step phosphorelay in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Res. Microbiol.* 157, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.06.012>
- Lister, P.D., Wolter, D.J., Hanson, N.D., 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 582–610. <https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09>
- Lizewski, S.E., Lundberg, D.S., Schurr, M.J., 2002. The transcriptional regulator AlgR is essential for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect. Immun.* 70, 6083–6093.
- Llamas, M.A., van der Sar, A., Chu, B.C.H., Sparrius, M., Vogel, H.J., Bitter, W., 2009. A Novel extracytoplasmic function (ECF) sigma factor regulates virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* 5, e1000572. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000572>
- Llamas, M.A., Imperi, F., Visca, P., Lamont, I.L., 2014. Cell-surface signaling in *Pseudomonas*: stress responses, iron transport, and pathogenicity. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 569–597. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12078>
- Llitjos, J.-F., Amara, M., Benzarti, A., Lacave, G., Bedos, J.-P., Pangon, B., 2018. Prior antimicrobial therapy duration influences causative pathogens identification in ventilator-associated pneumonia. *J. Crit. Care* 43, 375–377. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2017.10.027>
- López-Causapé, C., Rubio, R., Cabot, G., Oliver, A., 2018. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* Aminoglycoside Mutational Resistome In Vitro and in the Cystic Fibrosis Setting. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62. <https://doi.org/10.1128/AAC.02583-17>
- Lorenzo, V. de, Wee, S., Herrero, M., Neilands, J.B., 1987. Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (fur) repressor. *J. Bacteriol.* 169, 2624–2630. <https://doi.org/10.1128/jb.169.6.2624-2630.1987>
- Lory, S., Wolfgang, M., Lee, V., Smith, R., 2004. The multi-talented bacterial adenylate cyclases. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 293, 479–482. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00297>
- Luckett, J.C.A., Darch, O., Watters, C., Abuoun, M., Wright, V., Paredes-Osses, E., Ward, J., Goto, H., Heeb, S., Pommier, S., Rumbaugh, K.P., Cámara, M., Hardie, K.R., 2012. A novel virulence strategy for *Pseudomonas aeruginosa* mediated by an autotransporter with arginine-specific aminopeptidase activity. *PLoS Pathog.* 8, e1002854. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002854>
- Luo, Y., Zhao, K., Baker, A.E., Kuchma, S.L., Coggan, K.A., Wolfgang, M.C., Wong, G.C.L., O'Toole, G.A., 2015. A hierarchical cascade of second messengers regulates *Pseudomonas aeruginosa* surface behaviors. *mBio* 6. <https://doi.org/10.1128/mBio.02456-14>
- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., Pier, G.B., 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect.* 2, 1051–1060.
- Maddocks, S.E., Oyston, P.C.F., 2008. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiol. Read. Engl.* 154, 3609–3623. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/022772-0>
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L., 2012. 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.* 18, 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Mai-Prochnow, A., Bradbury, M., Murphy, A.B., 2015. Draft Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (DSM 1128), an Important Rhamnolipid Surfactant Producer and Sterility Testing Strain. *Genome Announc.* 3. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01259-15>
- Marden, J.N., Diaz, M.R., Walton, W.G., Gode, C.J., Betts, L., Urbanowski, M.L., Redinbo, M.R., Yahr, T.L., Wolfgang, M.C., 2013. An unusual CsrA family member operates in series with RsmA to amplify posttranscriptional responses in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 15055–15060. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307217110>
- Marsden, A.E., Intile, P.J., Schulmeyer, K.H., Simmons-Patterson, E.R., Urbanowski, M.L., Wolfgang, M.C., Yahr, T.L., 2016. Vfr Directly Activates *exsA* Transcription To Regulate Expression of the *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System. *J. Bacteriol.* 198, 1442–1450. <https://doi.org/10.1128/JB.00049-16>
- Martínez, E., Cosnahan, R.K., Wu, M., Gadila, S.K., Quick, E.B., Mobley, J.A., Campos-Gómez, J., 2019. Oxylipins mediate cell-to-cell communication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Commun. Biol.* 2. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0310-0>
- Marvig, R.L., Dolce, D., Sommer, L.M., Petersen, B., Ciofu, O., Campana, S., Molin, S., Taccetti, G., Johansen, H.K., 2015. Within-host microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* in Italian cystic fibrosis patients. *BMC Microbiol.* 15, 218. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0563-9>
- Matsuyama, B.Y., Krasteva, P.V., Baraquet, C., Harwood, C.S., Sondermann, H., Navarro, M.V.A.S., 2016. Mechanistic insights into c-di-GMP-dependent control of the biofilm regulator FleQ from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E209-218. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523148113>
- Mazar, J., Cotter, P.A., 2006. Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. *Mol. Microbiol.* 62, 641–654. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05392.x>
- McKee, R.W., Mangalea, M.R., Purcell, E.B., Borchardt, E.K., Tamayo, R., 2013. The second messenger cyclic Di-GMP regulates *Clostridium difficile* toxin production by controlling expression of *sigD*. *J. Bacteriol.* 195, 5174–5185. <https://doi.org/10.1128/JB.00501-13>
- McKnight, S.L., Iglewski, B.H., Pesci, E.C., 2000. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 182, 2702–2708.
- McPhee, J.B., Bains, M., Winsor, G., Lewenza, S., Kwasnicka, A., Brazas, M.D., Brinkman, F.S.L., Hancock, R.E.W., 2006. Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB Two-Component Regulatory Systems to Mg²⁺-Induced Gene Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188, 3995–4006. <https://doi.org/10.1128/JB.00053-06>
- Melvin, J.A., Scheller, E.V., Miller, J.F., Cotter, P.A., 2014. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 274–288. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3235>
- Mena, A., Smith, E.E., Burns, J.L., Speert, D.P., Moskowitz, S.M., Perez, J.L., Oliver, A., 2008. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. *J. Bacteriol.* 190, 7910–7917. <https://doi.org/10.1128/JB.01147-08>
- Mercy, C., Ize, B., Salcedo, S.P., de Bentzmann, S., Bigot, S., 2016. Functional Characterization of *Pseudomonas* Contact Dependent Growth Inhibition (CDI) Systems. *PloS One* 11, e0147435. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147435>
- Merritt, J.H., Ha, D.-G., Cowles, K.N., Lu, W., Morales, D.K., Rabinowitz, J., Gitai, Z., O'Toole, G.A., 2010. Specific control of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated behaviors by two c-di-GMP diguanylate cyclases. *mBio* 1. <https://doi.org/10.1128/mBio.00183-10>
- Miller, C.L., Romero, M., Karna, S.L.R., Chen, T., Heeb, S., Leung, K.P., 2016. RsmW, *Pseudomonas aeruginosa* small non-coding RsmA-binding RNA upregulated in biofilm versus planktonic

- growth conditions. *BMC Microbiol.* 16, 155. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0771-y>
- Miller, J.H., 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, [Cold Spring Harbor, N.Y.].
- Minandri, F., Imperi, F., Frangipani, E., Bonchi, C., Visaggio, D., Facchini, M., Pasquali, P., Bragonzi, A., Visca, P., 2016. Role of Iron Uptake Systems in *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and Airway Infection. *Infect. Immun.* 84, 2324–2335. <https://doi.org/10.1128/IAI.00098-16>
- Mittal, R., Aggarwal, S., Sharma, S., Chhibber, S., Harjai, K., 2009. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. *J. Infect. Public Health* 2, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2009.08.003>
- Monlezun, L., Liebl, D., Fenel, D., Grandjean, T., Berry, A., Schoehn, G., Dessein, R., Faudry, E., Attree, I., 2015. PscI is a type III secretion needle anchoring protein with in vitro polymerization capacities. *Mol. Microbiol.* 96, 419–436. <https://doi.org/10.1111/mmi.12947>
- Moradali, M.F., Ghods, S., Rehm, B.H.A., 2017. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 39. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>
- Morimoto, Y.V., Minamino, T., 2014. Structure and function of the bi-directional bacterial flagellar motor. *Biomolecules* 4, 217–234. <https://doi.org/10.3390/biom4010217>
- Morita, Y., Tomida, J., Kawamura, Y., 2012. MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 3, 408. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00408>
- Morita, Y., Tomida, J., Kawamura, Y., 2015. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate PA7: identification of a novel MexS variant involved in upregulation of the mexEF-oprN multidrug efflux operon. *Front. Microbiol.* 6, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00008>
- Morris, E.R., Hall, G., Li, C., Heeb, S., Kulkarni, R.V., Lovelock, L., Silistre, H., Messina, M., Cámara, M., Emsley, J., Williams, P., Searle, M.S., 2013. Structural rearrangement in an RsmA/CsrA ortholog of *Pseudomonas aeruginosa* creates a dimeric RNA-binding protein, RsmN. *Struct. Lond. Engl.* 1993 21, 1659–1671. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.07.007>
- Moscoso, J.A., 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. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02595.x>
- Moscoso, J.A., Jaeger, T., Valentini, M., Hui, K., Jenal, U., Filloux, A., 2014. The diguanylate cyclase SadC is a central player in Gac/Rsm-mediated biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 196, 4081–4088. <https://doi.org/10.1128/JB.01850-14>
- Mougous, J.D., Cuff, M.E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C.A., Goodman, A.L., Joachimiak, G., Ordoñez, C.L., Lory, S., Walz, T., Joachimiak, A., Mekalanos, J.J., 2006. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* 312, 1526–1530. <https://doi.org/10.1126/science.1128393>
- Mulcahy, H., O’Callaghan, J., O’Grady, E.P., Maciá, M.D., Borrell, N., Gómez, C., Casey, P.G., Hill, C., Adams, C., Gahan, C.G.M., Oliver, A., O’Gara, F., 2008. *Pseudomonas aeruginosa* RsmA plays an important role during murine infection by influencing colonization, virulence, persistence, and pulmonary inflammation. *Infect. Immun.* 76, 632–638. <https://doi.org/10.1128/IAI.01132-07>
- Mulcahy, L.R., Burns, J.L., Lory, S., Lewis, K., 2010. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *J. Bacteriol.* 192, 6191–6199. <https://doi.org/10.1128/JB.01651-09>
- Mulcahy, L.R., Isabella, V.M., Lewis, K., 2014. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb. Ecol.* 68, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0297-x>
- Nairz, M., Schroll, A., Sonnweber, T., Weiss, G., 2010. The struggle for iron - a metal at the host-pathogen interface. *Cell. Microbiol.* 12, 1691–1702. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01529.x>
- Navarro, M.V.A.S., De, N., Bae, N., Wang, Q., Sondermann, H., 2009. Structural analysis of the GGDEF-EAL domain-containing c-di-GMP receptor FimX. *Struct. Lond. Engl.* 1993 17, 1104–1116. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.06.010>

- Navarro, M.V.A.S., Newell, P.D., Krasteva, P.V., Chatterjee, D., Madden, D.R., O'Toole, G.A., Sondermann, H., 2011. Structural basis for c-di-GMP-mediated inside-out signaling controlling periplasmic proteolysis. *PLoS Biol.* 9, e1000588. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000588>
- Neil, R.B., Apicella, M.A., 2009. Role of HrpA in biofilm formation of *Neisseria meningitidis* and regulation of the hrpBAS transcripts. *Infect. Immun.* 77, 2285–2293. <https://doi.org/10.1128/IAI.01502-08>
- Nelson, K.M., Young, G.M., Miller, V.L., 2001. Identification of a locus involved in systemic dissemination of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 69, 6201–6208. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.10.6201-6208.2001>
- Newell, P.D., Monds, R.D., O'Toole, G.A., 2009. LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 3461–3466. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808933106>
- Newell, P.D., Boyd, C.D., Sondermann, H., O'Toole, G.A., 2011. A c-di-GMP effector system controls cell adhesion by inside-out signaling and surface protein cleavage. *PLoS Biol.* 9, e1000587. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000587>
- Nguyen, N.T.T., Contreras-Moreira, B., Castro-Mondragon, J.A., Santana-Garcia, W., Ossio, R., Robles-Espinoza, C.D., Bahin, M., Collombet, S., Vincens, P., Thieffry, D., van Helden, J., Medina-Rivera, A., Thomas-Chollier, M., 2018. RSAT 2018: regulatory sequence analysis tools 20th anniversary. *Nucleic Acids Res.* 46, W209–W214. <https://doi.org/10.1093/nar/gky317>
- Nicastro, G.G., Kaihami, G.H., Pereira, T.O., Meireles, D.A., Groleau, M.-C., Déziel, E., Baldini, R.L., 2014. Cyclic-di-GMP levels affect *Pseudomonas aeruginosa* fitness in the presence of imipenem. *Environ. Microbiol.* 16, 1321–1333. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12422>
- Ochsner, U.A., Vasil, M.L., 1996. Gene repression by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: cycle selection of iron-regulated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 4409–4414.
- O'Connor, J.R., Kuwada, N.J., Huangyutitham, V., Wiggins, P.A., Harwood, C.S., 2012. Surface sensing and lateral subcellular localization of WspA, the receptor in a chemosensory-like system leading to c-di-GMP production. *Mol. Microbiol.* 86, 720–729. <https://doi.org/10.1111/mmi.12013>
- Okkotsu, Y., Tiekku, P., Fitzsimmons, L.F., Churchill, M.E., Schurr, M.J., 2013. *Pseudomonas aeruginosa* AlgR phosphorylation modulates rhamnolipid production and motility. *J. Bacteriol.* 195, 5499–5515. <https://doi.org/10.1128/JB.00726-13>
- Okkotsu, Y., Little, A.S., Schurr, M.J., 2014. The *Pseudomonas aeruginosa* AlgZR two-component system coordinates multiple phenotypes. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 82. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00082>
- Okon, E., Dethlefsen, S., Pelnikevich, A., Barneveld, A. van, Munder, A., Tümmler, B., 2017. Key role of an ADP - ribose - dependent transcriptional regulator of NAD metabolism for fitness and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 307, 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.09.007>
- Oliver, P., Peralta-Gil, M., Tabche, M.-L., Merino, E., 2016. Molecular and structural considerations of TF-DNA binding for the generation of biologically meaningful and accurate phylogenetic footprinting analysis: the LysR-type transcriptional regulator family as a study model. *BMC Genomics* 17, 686. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3025-3>
- Ortet, P., De Luca, G., Whitworth, D.E., Barakat, M., 2012. P2TF: a comprehensive resource for analysis of prokaryotic transcription factors. *BMC Genomics* 13, 628. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-628>
- Ozer, E.A., Allen, J.P., Hauser, A.R., 2014. Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* using bioinformatic tools Spine and AGenT. *BMC Genomics* 15, 737. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-737>
- Papenfort, K., Bassler, B.L., 2016. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 576–588. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>

- Peña, C., Cabot, G., Gómez-Zorrilla, S., Zamorano, L., Ocampo-Sosa, A., Murillas, J., Almirante, B., Pomar, V., Aguilar, M., Granados, A., Calbo, E., Rodríguez-Baño, J., Rodríguez-López, F., Tubau, F., Martínez-Martínez, L., Oliver, A., Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI), 2015. Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 60, 539–548. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu866>
- Persat, A., Inclan, Y.F., Engel, J.N., Stone, H.A., Gitai, Z., 2015. Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 7563–7568. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502025112>
- Pesavento, C., Hengge, R., 2009. Bacterial nucleotide-based second messengers. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.01.007>
- Pesci, E.C., Pearson, J.P., Seed, P.C., Iglewski, B.H., 1997. Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 179, 3127–3132.
- Petrova, O.E., Gupta, K., Liao, J., Goodwine, J.S., Sauer, K., 2017. Divide and conquer: the *Pseudomonas aeruginosa* two-component hybrid SagS enables biofilm formation and recalcitrance of biofilm cells to antimicrobial agents via distinct regulatory circuits. *Environ. Microbiol.* 19, 2005–2024. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13719>
- Pier, G.B., 2007. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: A major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *Int. J. Med. Microbiol., Special issue: Lipopolysaccharide 297*, 277–295. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.03.012>
- Pirnay, J.-P., Bilocq, F., Pot, B., Cornelis, P., Zizi, M., Van Eldere, J., Deschaght, P., Vanechoutte, M., Jennes, S., Pitt, T., De Vos, D., 2009. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PloS One* 4, e7740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007740>
- Pita, T., Feliciano, J.R., Leitão, J.H., 2018. Small Noncoding Regulatory RNAs from *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* Complex. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19123759>
- Poole, K., Braun, V., 1988. Iron regulation of *Serratia marcescens* hemolysin gene expression. *Infect. Immun.* 56, 2967–2971.
- Potvin, E., Lehoux, D.E., Kukavica-Ibrulj, I., Richard, K.L., Sanschagrín, F., Lau, G.W., Levesque, R.C., 2003. In vivo functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* for high-throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets. *Environ. Microbiol.* 5, 1294–1308.
- Potvin, E., Sanschagrín, F., Levesque, R.C., 2008. Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 38–55. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00092.x>
- Priebe, G.P., Dean, C.R., Zaidi, T., Meluleni, G.J., Coleman, F.T., Coutinho, Y.S., Noto, M.J., Urban, T.A., Pier, G.B., Goldberg, J.B., 2004. The galU Gene of *Pseudomonas aeruginosa* Is Required for Corneal Infection and Efficient Systemic Spread following Pneumonia but Not for Infection Confined to the Lung. *Infect. Immun.* 72, 4224–4232. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.7.4224-4232.2004>
- Purdy, G.E., Fisher, C.R., Payne, S.M., 2007. IcsA surface presentation in *Shigella flexneri* requires the periplasmic chaperones DegP, Skp, and SurA. *J. Bacteriol.* 189, 5566–5573. <https://doi.org/10.1128/JB.00483-07>
- Qi, Y., Chuah, M.L.C., Dong, X., Xie, K., Luo, Z., Tang, K., Liang, Z.-X., 2011. Binding of cyclic diguanylate in the non-catalytic EAL domain of FimX induces a long-range conformational change. *J. Biol. Chem.* 286, 2910–2917. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.196220>
- Quesada, J.M., Otero-Asman, J.R., Bastiaansen, K.C., Civantos, C., Llamas, M.A., 2016. The Activity of the *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Regulator σ (VreI) Is Modulated by the Anti- σ Factor VreR and the Transcription Factor PhoB. *Front. Microbiol.* 7, 1159. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01159>
- Ramesh, A., 2015. Second messenger - Sensing riboswitches in bacteria. *Semin. Cell Dev. Biol.* 47–48, 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.019>
- Rangel, S.M., Logan, L.K., Hauser, A.R., 2014. The ADP-ribosyltransferase domain of the effector protein ExoS inhibits phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* during pneumonia. *mBio* 5, e01080-01014. <https://doi.org/10.1128/mBio.01080-14>

- Ravichandran, A., Ramachandran, M., Suriyanarayanan, T., Wong, C.C., Swarup, S., 2015. Global Regulator MorA Affects Virulence-Associated Protease Secretion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *PloS One* 10, e0123805. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123805>
- 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. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13262>
- Reboud, E., Basso, P., Maillard, A.P., Huber, P., Attrée, I., 2017a. Exolysin Shapes the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Clonal Outliers. *Toxins* 9. <https://doi.org/10.3390/toxins9110364>
- Reboud, E., Bouillot, S., Patot, S., Béganton, B., Attrée, I., Huber, P., 2017b. *Pseudomonas aeruginosa* *ExlA* and *Serratia marcescens* *ShlA* trigger cadherin cleavage by promoting calcium influx and ADAM10 activation. *PLoS Pathog.* 13, e1006579. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006579>
- Reen, F.J., Barret, M., Fargier, E., O'Muinneacháin, M., O'Gara, F., 2013. Molecular evolution of LysR-type transcriptional regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 66, 1041–1049. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.12.014>
- Reichhardt, C., Wong, C., Silva, D.P. da, Wozniak, D.J., Parsek, M.R., 2018. CdrA Interactions within the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix Safeguard It from Proteolysis and Promote Cellular Packing. *mBio* 9, e01376-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01376-18>
- Reinhart, A.A., Oglesby-Sherrouse, A.G., 2016. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence by Distinct Iron Sources. *Genes* 7. <https://doi.org/10.3390/genes7120126>
- Relman, D.A., Domenighini, M., Tuomanen, E., Rappuoli, R., Falkow, S., 1989. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 2637–2641.
- Ren, B., Shen, H., Lu, Z.J., Liu, H., Xu, Y., 2014. The *phzA2-G2* transcript exhibits direct RsmA-mediated activation in *Pseudomonas aeruginosa* M18. *PloS One* 9, e89653. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089653>
- Rietsch, A., Vallet-Gely, I., Dove, S.L., Mekalanos, J.J., 2005. *ExsE*, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 8006–8011. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503005102>
- Rodesney, C.A., Roman, B., Dhamani, N., Cooley, B.J., Katira, P., Touhami, A., Gordon, V.D., 2017. Mechanosensing of shear by *Pseudomonas aeruginosa* leads to increased levels of the cyclic-di-GMP signal initiating biofilm development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 5906–5911. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703255114>
- Rodrigo-Troyano, A., Sibila, O., 2017. The respiratory threat posed by multidrug resistant Gram-negative bacteria. *Respirol. Carlton Vic* 22, 1288–1299. <https://doi.org/10.1111/resp.13115>
- Römling, U., Galperin, M.Y., Gomelsky, M., 2013. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 77, 1–52. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00043-12>
- Rossi, E., Falcone, M., Molin, S., Johansen, H.K., 2018. High-resolution in situ transcriptomics of *Pseudomonas aeruginosa* unveils genotype independent patho-phenotypes in cystic fibrosis lungs. *Nat. Commun.* 9, 3459. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05944-5>
- Roy, C.R., Miller, J.F., Falkow, S., 1989. The *bvgA* gene of *Bordetella pertussis* encodes a transcriptional activator required for coordinate regulation of several virulence genes. *J. Bacteriol.* 171, 6338–6344.
- Roy, K., Hilliard, G.M., Hamilton, D.J., Luo, J., Ostmann, M.M., Fleckenstein, J.M., 2009. Enterotoxigenic *Escherichia coli* EtpA mediates adhesion between flagella and host cells. *Nature* 457, 594–598. <https://doi.org/10.1038/nature07568>
- Roy, P.H., Tetu, S.G., Larouche, A., Elbourne, L., Tremblay, S., Ren, Q., Dodson, R., Harkins, D., Shay, R., Watkins, K., Mahamoud, Y., Paulsen, I.T., 2010. Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PloS One* 5, e8842. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008842>

- Ruhe, Z.C., Subramanian, P., Song, K., Nguyen, J.Y., Stevens, T.A., Low, D.A., Jensen, G.J., Hayes, C.S., 2018. Programmed Secretion Arrest and Receptor-Triggered Toxin Export during Antibacterial Contact-Dependent Growth Inhibition. *Cell* 175, 921-933.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.033>
- Ruiz-Martínez, L., López-Jiménez, L., d'Ostuni, V., Fusté, E., Vinuesa, T., Viñas, M., 2011. A mechanism of carbapenem resistance due to a new insertion element (ISPa133) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.* 14, 51-58. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.135>
- Ruiz-Perez, F., Henderson, I.R., Leyton, D.L., Rossiter, A.E., Zhang, Y., Nataro, J.P., 2009. Roles of periplasmic chaperone proteins in the biogenesis of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae. *J. Bacteriol.* 191, 6571-6583. <https://doi.org/10.1128/JB.00754-09>
- Ruiz-Perez, F., Henderson, I.R., Nataro, J.P., 2010. Interaction of FkpA, a peptidyl-prolyl cis/trans isomerase with EspP autotransporter protein. *Gut Microbes* 1, 339-344. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.5.13436>
- Ruoslahti, E., 1996. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 697-715. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.12.1.697>
- Rybtke, M.T., Borlee, B.R., Murakami, K., Irie, Y., Hentzer, M., Nielsen, T.E., Givskov, M., Parsek, M.R., Tolker-Nielsen, T., 2012. Fluorescence-based reporter for gauging cyclic di-GMP levels in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5060-5069. <https://doi.org/10.1128/AEM.00414-12>
- Rybtke, M., Berthelsen, J., Yang, L., Høiby, N., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., 2015. The LapG protein plays a role in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by controlling the presence of the CdrA adhesin on the cell surface. *MicrobiologyOpen* 4, 917-930. <https://doi.org/10.1002/mbo3.301>
- Salacha, R., Kovacic, F., Brochier-Armanet, C., Wilhelm, S., Tommassen, J., Filloux, A., Voulhoux, R., Bleves, S., 2010. The *Pseudomonas aeruginosa* patatin-like protein PlpD is the archetype of a novel Type V secretion system. *Environ. Microbiol.* 12, 1498-1512. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02174.x>
- Sall, K.M., Casabona, M.G., Bordi, C., Huber, P., de Bentzmann, S., Attrée, I., Elsen, S., 2014. A gacS deletion in *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate CHA shapes its virulence. *PLoS One* 9, e95936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095936>
- Salsgiver, E.L., Fink, A.K., Knapp, E.A., LiPuma, J.J., Olivier, K.N., Marshall, B.C., Saiman, L., 2016. Changing Epidemiology of the Respiratory Bacteriology of Patients With Cystic Fibrosis. *Chest* 149, 390-400. <https://doi.org/10.1378/chest.15-0676>
- Sana, T.G., Hachani, A., Bucior, I., Soscia, C., Garvis, S., Termine, E., Engel, J., Filloux, A., Bleves, S., 2012. The Second Type VI Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 Is Regulated by Quorum Sensing and Fur and Modulates Internalization in Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* 287, 27095-27105. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.376368>
- Sana, T.G., Laubier, A., Bleves, S., 2014. Gene transfer: conjugation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1149, 17-22. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_3
- Sana, T.G., Berni, B., Bleves, S., 2016. The T6SSs of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 and Their Effectors: Beyond Bacterial-Cell Targeting. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6, 61. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00061>
- Sawa, T., Shimizu, M., Moriyama, K., Wiener-Kronish, J.P., 2014. Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. *Crit. Care Lond. Engl.* 18, 668. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0668-9>
- Sayner, S.L., Frank, D.W., King, J., Chen, H., VandeWaa, J., Stevens, T., 2004. Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. *Circ. Res.* 95, 196-203. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000134922.25721.d9>
- Scarlato, V., Aricò, B., Prugnola, A., Rappuoli, R., 1991. Sequential activation and environmental regulation of virulence genes in *Bordetella pertussis*. *EMBO J.* 10, 3971-3975.
- Schaefer, P., Baugh, R.F., 2012. Acute otitis externa: an update. *Am. Fam. Physician* 86, 1055-1061.
- Schiebel, E., Schwarz, H., Braun, V., 1989. Subcellular location and unique secretion of the hemolysin of *Serratia marcescens*. *J. Biol. Chem.* 264, 16311-16320.

- Schierle, C.F., Berkmen, M., Huber, D., Kumamoto, C., Boyd, D., Beckwith, J., 2003. The DsbA signal sequence directs efficient, cotranslational export of passenger proteins to the Escherichia coli periplasm via the signal recognition particle pathway. *J. Bacteriol.* 185, 5706–5713.
- Schulmeyer, K.H., Diaz, M.R., Bair, T.B., Sanders, W., Gode, C.J., Laederach, A., Wolfgang, M.C., Yahr, T.L., 2016. Primary and Secondary Sequence Structure Requirements for Recognition and Discrimination of Target RNAs by *Pseudomonas aeruginosa* RsmA and RsmF. *J. Bacteriol.* 198, 2458–2469. <https://doi.org/10.1128/JB.00343-16>
- Schuster, M., Greenberg, E.P., 2006. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 296, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01.036>
- Schuster, M., Lostroh, C.P., Ogi, T., Greenberg, E.P., 2003. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* 185, 2066–2079.
- Sentausa, E., Basso, P., Berry, A., Adrait, A., Bellement, G., Couté, Y., Lory, S., Elsen, S., Attrée, I., En révision. Insertion sequences drive the emergence of a highly adapted human pathogen. *Microb. Genomics*.
- Serate, J., Roberts, G.P., Berg, O., Youn, H., 2011. Ligand responses of Vfr, the virulence factor regulator from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 193, 4859–4868. <https://doi.org/10.1128/JB.00352-11>
- Shafique, H.A., Sultana, V., Ara, J., Ehteshamul-Haque, S., Athar, M., 2015. Role of Antagonistic Microorganisms and Organic Amendment in Stimulating the Defense System of Okra Against Root Rotting Fungi. *Pol. J. Microbiol.* 64, 157–162.
- Shaver, C.M., Hauser, A.R., 2004. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect. Immun.* 72, 6969–6977. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.6969-6977.2004>
- Shimohata, N., Akiyama, Y., Ito, K., 2005. Peculiar properties of DsbA in its export across the Escherichia coli cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* 187, 3997–4004. <https://doi.org/10.1128/JB.187.12.3997-4004.2005>
- Silversmith, R.E., Wang, B., Fulcher, N.B., Wolfgang, M.C., Bourret, R.B., 2016. Phosphoryl Group Flow within the *Pseudomonas aeruginosa* Pil-Chp Chemosensory System: DIFFERENTIAL FUNCTION OF THE EIGHT PHOSPHOTRANSFERASE AND THREE RECEIVER DOMAINS. *J. Biol. Chem.* 291, 17677–17691. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.737528>
- Simon, N.C., Barbieri, J.T., 2014. Exoenzyme S ADP-ribosylates Rab5 effector sites to uncouple intracellular trafficking. *Infect. Immun.* 82, 21–28. <https://doi.org/10.1128/IAI.01059-13>
- Siryaporn, A., Kuchma, S.L., O'Toole, G.A., Gitai, Z., 2014. Surface attachment induces *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 16860–16865. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415712111>
- Smith, W.D., Bardin, E., Cameron, L., Edmondson, C.L., Farrant, K.V., Martin, I., Murphy, R.A., Soren, O., Turnbull, A.R., Wierre-Gore, N., Alton, E.W., Bundy, J.G., Bush, A., Connett, G.J., Faust, S.N., Filloux, A., Freemont, P.S., Jones, A.L., Takats, Z., Webb, J.S., Williams, H.D., Davies, J.C., 2017. Current and future therapies for *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 364. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx121>
- Soberón-Chávez, G., Alcaraz, L.D., Morales, E., Ponce-Soto, G.Y., Servín-González, L., 2017. The Transcriptional Regulators of the CRP Family Regulate Different Essential Bacterial Functions and Can Be Inherited Vertically and Horizontally. *Front. Microbiol.* 8, 959. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00959>
- Solovyev, V., Salamov, A., 2011. AUTOMATIC ANNOTATION OF MICROBIAL GENOMES AND METAGENOMIC SEQUENCES 18.
- Song, J., Jensen, R.A., 1996. PhhR, a divergently transcribed activator of the phenylalanine hydroxylase gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 22, 497–507. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.00131.x>
- Sonnleitner, E., Gonzalez, N., Sorger-Domenigg, T., Heeb, S., Richter, A.S., Backofen, R., Williams, P., Hüttenhofer, A., Haas, D., Bläsi, U., 2011. The small RNA PhrS stimulates synthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal. *Mol. Microbiol.* 80, 868–885. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07620.x>

- Sonnleitner, E., Romeo, A., Bläsi, U., 2012. Small regulatory RNAs in *Pseudomonas aeruginosa*. *RNA Biol.* 9, 364–371. <https://doi.org/10.4161/rna.19231>
- Sood, U., Hira, P., Kumar, R., Bajaj, A., Rao, D.L.N., Lal, R., Shakarad, M., 2019. Comparative Genomic Analyses Reveal Core-Genome-Wide Genes Under Positive Selection and Major Regulatory Hubs in Outlier Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 10, 53. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00053>
- Sorger-Domenigg, T., Sonnleitner, E., Kaberdin, V.R., Bläsi, U., 2007. Distinct and overlapping binding sites of *Pseudomonas aeruginosa* Hfq and RsmA proteins on the non-coding RNA RsmY. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 769–773. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.084>
- Spencer, D.H., Kas, A., Smith, E.E., Raymond, C.K., Sims, E.H., Hastings, M., Burns, J.L., Kaul, R., Olson, M.V., 2003. Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 185, 1316–1325.
- Starkey, M., Hickman, J.H., Ma, L., Zhang, N., De Long, S., Hinz, A., Palacios, S., Manoil, C., Kirisits, M.J., Starner, T.D., Wozniak, D.J., Harwood, C.S., Parsek, M.R., 2009. *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung. *J. Bacteriol.* 191, 3492–3503. <https://doi.org/10.1128/JB.00119-09>
- Stewart, L., Ford, A., Sangal, V., Jeukens, J., Boyle, B., Kukavica-Ibrulj, I., Caim, S., Crossman, L., Hoskisson, P.A., Levesque, R., Tucker, N.P., 2014. Draft genomes of 12 host-adapted and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and their positions in the core genome phylogeny. *Pathog. Dis.* 71, 20–25. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12107>
- Stibitz, S., Weiss, A.A., Falkow, S., 1988. Genetic analysis of a region of the *Bordetella pertussis* chromosome encoding filamentous hemagglutinin and the pleiotropic regulatory locus vir. *J. Bacteriol.* 170, 2904–2913.
- Stoodle, B.J., Thom, B.T., 1970. Observations On The Intestinal Carriage Of *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 3, 367–375. <https://doi.org/10.1099/00222615-3-3-367>
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S., Olson, M.V., 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959–964. <https://doi.org/10.1038/35023079>
- Subedi, D., Vijay, A.K., Kohli, G.S., Rice, S.A., Willcox, M., 2018. Comparative genomics of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different geographic sites. *Sci. Rep.* 8, 15668. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34020-7>
- Suh, S.-J., Runyen-Janecky, L.J., Maleniak, T.C., Hager, P., MacGregor, C.H., Zielinski-Mozny, N.A., Phibbs, P.V., West, S.E.H., 2002. Effect of vfr mutation on global gene expression and catabolite repression control of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Read. Engl.* 148, 1561–1569. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-5-1561>
- Sundin, C., Wolfgang, M.C., Lory, S., Forsberg, A., Frithz-Lindsten, E., 2002. Type IV pili are not specifically required for contact dependent translocation of exoenzymes by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Pathog.* 33, 265–277.
- Thrane, S.W., Taylor, V.L., Freschi, L., Kukavica-Ibrulj, I., Boyle, B., Laroche, J., Pirnay, J.-P., Lévesque, R.C., Lam, J.S., Jelsbak, L., 2015. The Widespread Multidrug-Resistant Serotype O12 *Pseudomonas aeruginosa* Clone Emerged through Concomitant Horizontal Transfer of Serotype Antigen and Antibiotic Resistance Gene Clusters. *mBio* 6, e01396-01315. <https://doi.org/10.1128/mBio.01396-15>
- Trampani, E., Stevenson, C.E.M., Little, R.H., Wilhelm, T., Lawson, D.M., Malone, J.G., 2015. Bacterial rotary export ATPases are allosterically regulated by the nucleotide second messenger cyclic-di-GMP. *J. Biol. Chem.* 290, 24470–24483. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.661439>
- Tsirigotaki, A., De Geyter, J., Šoštarić, N., Economou, A., Karamanou, S., 2017. Protein export through the bacterial Sec pathway. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 21–36. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.161>

- Turkina, M.V., Vikström, E., 2018. Bacteria-Host Crosstalk: Sensing of the Quorum in the Context of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J. Innate Immun.* 1–17. <https://doi.org/10.1159/000494069>
- Turner, K.H., Vallet-Gely, I., Dove, S.L., 2009. Epigenetic control of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by a LysR-type transcription regulator. *PLoS Genet.* 5, e1000779. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000779>
- Turner, K.H., Everett, J., Trivedi, U., Rumbaugh, K.P., Whiteley, M., 2014. Requirements for *Pseudomonas aeruginosa* Acute Burn and Chronic Surgical Wound Infection. *PLoS Genet.* 10, e1004518. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004518>
- Vakevainen, M., Greenberg, S., Hansen, E.J., 2003. Inhibition of phagocytosis by *Haemophilus ducreyi* requires expression of the LspA1 and LspA2 proteins. *Infect. Immun.* 71, 5994–6003.
- Vakulskas, C.A., Potts, A.H., Babitzke, P., Ahmer, B.M.M., Romeo, T., 2015. Regulation of bacterial virulence by Csr (Rsm) systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 79, 193–224. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00052-14>
- Valentini, M., Filloux, A., 2016. Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria. *J. Biol. Chem.* 291, 12547–12555. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.711507>
- Valentini, M., Gonzalez, D., Mavridou, D.A., Filloux, A., 2018. Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Opin. Microbiol.* 41, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.11.006>
- Valenza, G., Tuschak, C., Nickel, S., Krupa, E., Lehner-Reindl, V., Höller, C., 2015. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* as intestinal colonizer in the community. *Infect. Dis. Lond. Engl.* 47, 654–657. <https://doi.org/10.3109/23744235.2015.1031171>
- Vallet, I., Olson, J.W., Lory, S., Lazdunski, A., Filloux, A., 2001. The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 6911–6916. <https://doi.org/10.1073/pnas.111551898>
- Vallet-Gely, I., Donovan, K.E., Fang, R., Joung, J.K., Dove, S.L., 2005. Repression of phase-variable cup gene expression by H-NS-like proteins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11082–11087. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502663102>
- Valot, B., Guyeux, C., Rolland, J.Y., Mazouzi, K., Bertrand, X., Hocquet, D., 2015. What It Takes to Be a *Pseudomonas aeruginosa*? The Core Genome of the Opportunistic Pathogen Updated. *PloS One* 10, e0126468. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126468>
- van Belkum, A., Soriaga, L.B., LaFave, M.C., Akella, S., Veyrieras, J.-B., Barbu, E.M., Shortridge, D., Blanc, B., Hannum, G., Zambardi, G., Miller, K., Enright, M.C., Mugnier, N., Bрами, D., Schicklin, S., Felderman, M., Schwartz, A.S., Richardson, T.H., Peterson, T.C., Hubby, B., Cady, K.C., 2015. Phylogenetic Distribution of CRISPR-Cas Systems in Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 6, e01796-01715. <https://doi.org/10.1128/mBio.01796-15>
- van Ulsen, P., Zinner, K.M., Jong, W.S.P., Luirink, J., 2018. On display: autotransporter secretion and application. *FEMS Microbiol. Lett.* 365. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny165>
- Vance, R.E., Rietsch, A., Mekalanos, J.J., 2005. Role of the Type III Secreted Exoenzymes S, T, and Y in Systemic Spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 In Vivo. *Infect. Immun.* 73, 1706–1713. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.3.1706-1713.2005>
- Venkataraman, R., Divatia, J.V., Ramakrishnan, N., Chawla, R., Amin, P., Gopal, P., Chaudhry, D., Zirpe, K., Abraham, B., 2018. Multicenter Observational Study to Evaluate Epidemiology and Resistance Patterns of Common Intensive Care Unit-infections. *Indian J. Crit. Care Med. Peer-Rev. Off. Publ. Indian Soc. Crit. Care Med.* 22, 20–26. https://doi.org/10.4103/ijccm.IJCCM_394_17
- Vincent, A.T., Freschi, L., Jeukens, J., Kukavica-Ibrulj, I., Emond-Rheault, J.-G., Leduc, A., Boyle, B., Jean-Pierre, F., Groleau, M.-C., Déziel, E., Barbeau, J., Charette, S.J., Levesque, R.C., 2017. Genomic characterisation of environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolated from

- dental unit waterlines revealed the insertion sequence ISPa11 as a chaotropic element. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix106>
- Vincent, F., Round, A., Reynaud, A., Bordi, C., Filloux, A., Bourne, Y., 2010. Distinct oligomeric forms of the *Pseudomonas aeruginosa* RetS sensor domain modulate accessibility to the ligand binding site. *Environ. Microbiol.* 12, 1775–1786. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02264.x>
- Vogel, J., Luisi, B.F., 2011. Hfq and its constellation of RNA. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 578–589. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2615>
- Wagner, V.E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A.I., Iglewski, B.H., 2003. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J. Bacteriol.* 185, 2080–2095.
- Wang, C., Ye, F., Kumar, V., Gao, Y.-G., Zhang, L.-H., 2014. BswR controls bacterial motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through modulation of the small RNA rsmZ. *Nucleic Acids Res.* 42, 4563–4576. <https://doi.org/10.1093/nar/gku106>
- Wang, F., Zhang, M., Hu, Y., Zhang, W., Sun, L., 2009. Regulation of the *Edwardsiella tarda* hemolysin gene and luxS by EthR. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 765–773.
- Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L.-C., Bui, S., Nielson, A., Wu, X., Vo, H.-T., Ma, X.-J., Luo, Y., 2012. RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Mol. Diagn. JMD* 14, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.08.002>
- Wang, X., Wang, Q., Xiao, J., Liu, Q., Wu, H., Zhang, Y., 2010. Hemolysin EthA in *Edwardsiella tarda* is essential for fish invasion in vivo and in vitro and regulated by two-component system EsrA-EsrB and nucleoid protein HhaEt. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 1082–1091. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.08.025>
- Ward, C.K., Mock, J.R., Hansen, E.J., 2004. The LspB protein is involved in the secretion of the LspA1 and LspA2 proteins by *Haemophilus ducreyi*. *Infect. Immun.* 72, 1874–1884.
- Weinberg, E.D., 1974. Iron and Susceptibility to Infectious Disease. *Science* 184, 952–956. <https://doi.org/10.1126/science.184.4140.952>
- West, S.E., Sample, A.K., Runyen-Janecky, L.J., 1994. The vfr gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and protease production, belongs to the cyclic AMP receptor protein family. *J. Bacteriol.* 176, 7532–7542.
- Whitby, P.W., Seale, T.W., VanWagoner, T.M., Morton, D.J., Stull, T.L., 2009. The iron/heme regulated genes of *Haemophilus influenzae*: comparative transcriptional profiling as a tool to define the species core modulon. *BMC Genomics* 10, 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-6>
- Whitchurch, C.B., Leech, A.J., Young, M.D., Kennedy, D., Sargent, J.L., Bertrand, J.J., Semmler, A.B.T., Mellick, A.S., Martin, P.R., Alm, R.A., Hobbs, M., Beatson, S.A., Huang, B., Nguyen, L., Commolli, J.C., Engel, J.N., Darzins, A., Mattick, J.S., 2004. Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 52, 873–893. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04026.x>
- Whitchurch, C.B., Beatson, S.A., Comolli, J.C., Jakobsen, T., Sargent, J.L., Bertrand, J.J., West, J., Klausen, M., Waite, L.L., Kang, P.J., Tolker-Nielsen, T., Mattick, J.S., Engel, J.N., 2005. *Pseudomonas aeruginosa* fimL regulates multiple virulence functions by intersecting with Vfr-modulated pathways. *Mol. Microbiol.* 55, 1357–1378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04479.x>
- Whitney, J.C., Colvin, K.M., Marmont, L.S., Robinson, H., Parsek, M.R., Howell, P.L., 2012. Structure of the cytoplasmic region of PelD, a degenerate diguanylate cyclase receptor that regulates exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 287, 23582–23593. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.375378>
- Wilhelm, S., Gdynia, A., Tielen, P., Rosenau, F., Jaeger, K.-E., 2007. The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *J. Bacteriol.* 189, 6695–6703. <https://doi.org/10.1128/JB.00023-07>
- Wilson, R.L., Urbanowski, M.L., Stauffer, G.V., 1995. DNA binding sites of the LysR-type regulator GcvA in the gcv and gcvA control regions of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177, 4940–4946.

- Winsor, G.L., Griffiths, E.J., Lo, R., Dhillon, B.K., Shay, J.A., Brinkman, F.S.L., 2016. Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res.* 44, D646-653. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1227>
- Winstanley, C., O'Brien, S., Brockhurst, M.A., 2016. *Pseudomonas aeruginosa* Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. *Trends Microbiol.* 24, 327–337. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.01.008>
- Wolfgang, M.C., Lee, V.T., Gilmore, M.E., Lory, S., 2003. Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway. *Dev. Cell* 4, 253–263.
- Wolfgang, M.C., Jyot, J., Goodman, A.L., Ramphal, R., Lory, S., 2004. *Pseudomonas aeruginosa* regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid from cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6664–6668. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307553101>
- Wood, S., Goldufsky, J., Shafikhani, S.H., 2015a. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT Induces Atypical Anoikis Apoptosis in Target Host Cells by Transforming Crk Adaptor Protein into a Cytotoxin. *PLoS Pathog.* 11, e1004934. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004934>
- Wood, S., Goldufsky, J.W., Bello, D., Masood, S., Shafikhani, S.H., 2015b. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT Induces Mitochondrial Apoptosis in Target Host Cells in a Manner That Depends on Its GTPase-activating Protein (GAP) Domain Activity. *J. Biol. Chem.* 290, 29063–29073. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.689950>
- Wurtzel, O., Yoder-Himes, D.R., Han, K., Dandekar, A.A., Edelheit, S., Greenberg, E.P., Sorek, R., Lory, S., 2012. The single-nucleotide resolution transcriptome of *Pseudomonas aeruginosa* grown in body temperature. *PLoS Pathog.* 8, e1002945. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002945>
- Xia, Y., Carpentier, A., Cheng, X., Block, P.D., Zhao, Y., Zhang, Z., Protzer, U., Liang, T.J., 2017. Human stem cell-derived hepatocytes as a model for hepatitis B virus infection, spreading and virus-host interactions. *J. Hepatol.* 66, 494–503. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.10.009>
- Xiao, G., Déziel, E., He, J., Lépine, F., Lesic, B., Castonguay, M.-H., Milot, S., Tampakaki, A.P., Stachel, S.E., Rahme, L.G., 2006. MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands. *Mol. Microbiol.* 62, 1689–1699. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05462.x>
- Yahr, T.L., Frank, D.W., 1994. Transcriptional organization of the trans-regulatory locus which controls exoenzyme S synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 176, 3832–3838.
- Yahr, T.L., Wolfgang, M.C., 2006. Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol. Microbiol.* 62, 631–640. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05412.x>
- Yú, S.Q., Cai, Y., Lyons, C., Johnson, R.F., Postnikova, E., Mazur, S., Johnson, J.C., Radoshitzky, S.R., Bailey, A.L., Lauck, M., Goldberg, T.L., O'Connor, D.H., Jahrling, P.B., Friedrich, T.C., Kuhn, J.H., 2016. Specific Detection of Two Divergent Simian Arteriviruses Using RNAscope In Situ Hybridization. *PloS One* 11, e0151313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151313>
- Zhang, D., de Souza, R.F., Anantharaman, V., Iyer, L.M., Aravind, L., 2012. Polymorphic toxin systems: Comprehensive characterization of trafficking modes, processing, mechanisms of action, immunity and ecology using comparative genomics. *Biol. Direct* 7, 18. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-7-18>
- Zolfaghar, I., Evans, D.J., Fleiszig, S.M.J., 2003. Twitching motility contributes to the role of pili in corneal infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 71, 5389–5393.

Premiers mécanismes de régulation d'*exlBA*, le facteur de virulence des souches de type PA7 de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène opportuniste responsable du développement de maladies nosocomiales. Il provoque des infections en employant différents facteurs de virulence dont le principal, associé aux infections sévères, est le système de sécrétion de type 3 (SST3). Les souches de type PA7, taxonomiquement marginales, sont dépourvues de SST3 et leur pouvoir pathogène repose sur le nouveau système de virulence ExlBA. Ce SST5b, ou TPS, est composé du transporteur ExlB qui permet la translocation d'ExlA, une toxine induisant la perméabilisation de la membrane plasmique des cellules eucaryotes.

Ce travail représente la première investigation des mécanismes de régulation du système ExlBA. Ainsi, il a été mis en évidence que la déplétion en fer est un signal d'activation de l'expression des gènes *exlBA*. De plus, les deux principaux messagers secondaires, AMPc et di-GMPc, sont impliqués dans la régulation du TPS. En effet, la voie CyaB-AMPc/Vfr, connue pour réguler le SST3, contrôle la toxicité des souches de type PA7 grâce à une activation transcriptionnelle directe des gènes *exlBA*, qui peut être stimulée par la chélation du calcium extracellulaire. Parallèlement, alors qu'ExlA était supposée être sécrétée pour agir sur les cellules eucaryotes, cette étude a montré que la toxine doit être exposée à la surface de la membrane bactérienne pour provoquer la lyse de ces cellules, ceci par un mécanisme dépendant du di-GMPc. Effectivement, une forte concentration en di-GMPc empêche la sécrétion d'ExlA en induisant de façon post-traductionnelle son maintien au niveau du transporteur ExlB, ce qui favoriserait l'action de la toxine sur les membranes eucaryotes.

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa*, facteurs de virulence, SST5, TPS, régulation, messenger secondaire

First regulatory mechanisms of *exlBA*, virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa* PA7-like strains

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen responsible for nosocomial diseases. It provokes infections due to several virulence factors. Among them the most aggressive is the type 3 secretion system (T3SS), associated with severe infection. PA7-like strains, that are taxonomic outliers, lack the T3SS but are still pathogenic thanks to the novel virulence system ExlBA. This T5bSS, or TPS, is composed by the transporter ExlB that allows translocation of ExlA toxin to induce permeabilisation of eukaryotic cell membrane.

This study is the first investigation of regulatory mechanisms that modulate ExlBA. It provided evidence that iron depletion is an activator signal of *exlBA* gene expression. Furthermore, the two main second messengers, cAMP and c-di-GMP, are involved in ExlBA regulation. CyaB-cAMP/Vfr pathway, known to regulate T3SS, controls toxicity of PA7-like strains through direct transcriptional activation of *exlBA*. This pathway may be stimulated by an extracellular calcium chelation. At the same time, while ExlA was supposed to be secreted to kill eukaryotic cells, this work showed that the toxin must be exposed at the surface of the bacterial membrane to cause lysis of these cells, by a mechanism dependent on c-di-GMP. Indeed, a c-di-GMP high concentration prevents ExlA secretion by inducing its maintenance at the ExlB transporter, that would promote the action of the toxin on eukaryotic membranes.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, virulence factor, T5SS, TPS, regulation, second messenger