Facteurs bactériens impliqués dans la survie intramacrophagique de Pseudomonas aeruginosa et recherche d'inhibiteurs spécifiques : du modèle expérimental cellulaire au modèle vertébré Danio rerio

Malika Moussouni

▶ **To cite this version:**

Malika Moussouni. Facteurs bactériens impliqués dans la survie intramacrophagique de Pseudomonas aeruginosa et recherche d'inhibiteurs spécifiques : du modèle expérimental cellulaire au modèle vertébré Danio rerio. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2020. Français. NNT : 2020MONTT003 . tel-03139478

HAL Id: tel-03139478
https://theses.hal.science/tel-03139478

Submitted on 12 Feb 2021

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie santé - Microbiologie

École doctorale CBS2

Unité de recherche UMR 5235 CNRS
Laboratory of Pathogen Host Interactions (LPHI)

Facteurs bactériens impliqués dans la survie intramacrophagique de *Pseudomonas aeruginosa* et recherche d'inhibiteurs spécifiques: du modèle expérimental cellulaire au modèle vertébré *Danio rerio*

Présentée par Malika MOUSSOUNI
Le 11 Février 2020

Sous la direction de Anne BLANC-POTARD

Devant le jury composé de

Mr Jean-Michel BOLLA, DR, Université Aix-Marseille	[Rapporteur]
Mme Sylvie CHEVALIER, Pr, Université de Rouen	[Rapporteur]
Mme Sophie BLEVES, Pr, Université Aix-Marseille	[Examinateur]
Mme Annette VERGUNST, CR-HDR, INSERM Nîmes	[Examinateur]
Mme Anne BLANC-POTARD, DR, Université Montpellier	[Directeur de thèse]

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Résumé

Pseudomonas aeruginosa, fait partie des bactéries pathogènes classées par l'OMS «hautement prioritaires», résistantes aux antibiotiques et pour lesquelles il est urgent d'identifier de nouveaux moyens de lutte. *P. aeruginosa*, responsable d'infections aiguës ou chroniques, est impliqué dans des infections nosocomiales et est également le principal pathogène responsable de la morbidité et la mortalité des patients atteints de mucoviscidose, maladie génétique à transmission récessive, liée à des mutations du gène *cftr*.

Le macrophage est en première ligne de la défense immunitaire innée. Le rôle dans l'infection de la capacité de *P. aeruginosa* à résister à l'action bactéricide des macrophages est un aspect mal connu, que ce soit dans le contexte de la mucoviscidose ou pas. Des facteurs de virulence comme MgtC et OprF, ont récemment été identifiés comme important dans la survie intramacrophagique de *P. aeruginosa.* Notre projet a pour objectif principal de mieux comprendre le rôle de ces facteurs dans l'établissement de l'infection à *P. aeruginosa,* de tester la contribution du canal CFTR à ce niveau, et de développer une stratégie thérapeutique innovante.

L'intérêt étant de mieux contrôler l'infection, nous proposons de développer une nouvelle stratégie, en complément de l'antibiothérapie, qui vise à limiter la capacité de *P. aeruginosa* à survivre dans le macrophage. Cette approche se base sur la cible MgtC et un inhibiteur naturel MgtR. Nous avons testé ici pour la première fois, l'effet d'un peptide synthétique MgtR sur *P. aeruginosa*. MgtR réduit la survie bactérienne dans les macrophages, via son effet sur la protéine MgtC, validant ainsi l'effet biologique du peptide synthétique. Cette approche antivirulence est couplée à une approche structurale, afin de caractériser l'interaction MgtC/MgtR d'un point de vue moléculaire et d'étudier l'effet de MgtR sur la dimérisation de MgtC. Ceci pourrait permettre *in fine* d'optimiser le peptide MgtR afin de pouvoir le tester dans un modèle animal (des études préliminaires dans l'embryon de poisson-zèbre s'étant avérées infructueuses).

J'ai de plus contribué à une étude visant à caractériser les facteurs bactériens de *P. aeruginosa* impliqués dans le stade intramacrophagique. Ces travaux ont montré l'implication de MgtC et OprF dans l'expression du SST3, lui-même responsable d'un phénomène de lyse des macrophages par les bactéries intracellulaires. L'utilisation du mutant *oprF* comme « indicateur » du rôle intramacrophagique *in vivo,* nous a permis de montrer l'importance de l'action bactéricide du macrophage (e.g. l'acidification du phagosome) dans le contrôle de l'infection à *P. aeruginosa*, dans des macrophages en culture et dans l'embryon de poisson-zèbre. Ce modèle vertébré est pertinent non seulement pour l'étude de l'infection à *P. aeruginosa*, mais également pour l'implication du Cftr.

Les embryons *cftr*-/- semblent être particulièrement susceptibles à l'infection par *P. aeruginosa*, et ce modèle pourrait permettre de déterminer la contribution spécifique du Cftr à l'action bactéricide du macrophage.

En conclusion, une meilleure compréhension de la phase intramacrophagique de *P. aeruginosa* et des facteurs bactériens impliqués pourrait permettre de mieux contrôler l'infection à *P. aeruginosa*.

Abstract

The increased number of antibiotic-resistant bacteria is a real challenge for medical research. WHO has published a list of very high priority pathogens, which includes *Pseudomonas aeruginosa*, a bacterium responsible for acute and chronic infections. *P. aeruginosa* is involved in nosocomial infections and is also the main pathogen responsible of the morbidity and mortality of patients with cystic fibrosis, a genetic disorder caused by mutations in the *cftr* gene.

The macrophage is in the first line of the innate immune defense. The role during infection of the ability of *P. aeruginosa* to resist to the bactericidal action of macrophages is poorly understood, both in the context of cystic fibrosis or in normal conditions. Virulence factors such as MgtC and OprF have been recently identified as important in the intramacrophage survival of *P. aeruginosa*. The main objective of our project is to better understand the role of these factors in the establishment of *P. aeruginosa* infection, to test the contribution of the CFTR channel at this stage, and to develop innovative therapeutic strategy.

Since it is important to better control the infection, we propose here to develop a new strategy, in addition to antibiotic therapy, which aims to limit the ability of *P. aeruginosa* to survive within macrophages. This approach is based on the MgtC target and a natural MgtR inhibitor.

We have tested for the first time the effect of MgtR synthetic peptide on *P. aeruginosa*. MgtR reduces bacterial survival in macrophages, through its action on the MgtC protein, thus validating the biological effect of the synthetic peptide. This antivirulence strategy is combined with a structural approach, to characterize the MgtC/MgtR interaction from a molecular point of view and to study the effect of MgtR on MgtC dimerization. This could ultimately lead to optimize the MgtR peptide in order to test it in an animal model (preliminary studies in the embryo of zebrafish were inconclusive).

In addition, I contributed in a study to characterize the bacterial factors involved in the intramacrophage stage of *P. aeruginosa*. This work revealed the involvement of MgtC and OprF in the expression of the T3SS, itself responsible for a lysis of macrophages by intracellular bacteria. The use of *oprF* mutant as an "indicator" of the intramacrophage role *in vivo*, allowed us to show the importance of bactericidal action of macrophage (e.g. phagosomal acidification) in the control of *P. aeruginosa* infection, both in cultured macrophages and in zebrafish embryo. This vertebrate model is relevant for the study of *P. aeruginosa* infection, but also for the involvement of Cftr. *cftr*-/- embryos appear to be highly susceptible to *P. aeruginosa* infection, and this model could determine the specific contribution of Cftr to the bactericidal action of macrophage.

In conclusion, a better understanding of the intramacrophage stage of *P. aeruginosa* and the bacterial factors involved, may provide a better control of *P. aeruginosa* infection.

Je dédie ma thèse à ma famille (Papa, maman, Sonia, Chafika Salim et Yasmine), vous avez été mon énergie tout au long de cette thèse, tout au long de ma vie. Vous m'avez toujours soutenue, toujours encouragée, toujours poussée à aller de l'avant. Je vous aime.

Remerciements

Je remercie l'association Vaincre La Mucoviscidose qui a garanti le financement de ma thèse et m'a permis de réaliser ce travail passionnant de recherche.

Je tiens à remercier particulièrement ma directrice de thèse, Anne,

Je te remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir offert cette merveilleuse opportunité. Faire de la recherche était mon rêve depuis très jeune (oui vraiment !), et tu m'as permis de le réaliser. Je te remercie Anne, pour ta disponibilité, ton aide, tes conseils mais aussi tes critiques constructives, et pour tous les moyens mis à ma disposition au cours de ce parcours. Merci d'avoir fait en sorte que j'obtienne le financement de ces 2 mois supplémentaires qui m'ont permis de finir mon travail. Merci encore pour ton enthousiasme et pour tout ce que tu m'as enseigné.

Au directeur de l'unité, Georges Lutfalla,

Un grand merci également à vous Georges, pour m'avoir accueillie dès mon stage de Master 2 au sein de l'unité. Je vous remercie pour nos collaborations avec les poissons et pour m'avoir conseillée tout au long de ma thèse.

Aux membres de mon comité et jury de thèse,

Je suis reconnaissante envers Sophie Bleves et Véronique Jubier-Maurin pour avoir accepté d'être membres de mon comité de thèse pendant ces trois années. Je tiens à vous remercier ainsi qu'à remercier Annette Vergunst, Sylvie Chevalier, et Jean-Michel Bolla de m'avoir fait l'honneur d'être membres de mon jury de thèse.

A mon équipe d'accueil, la team 2,

Tout d'abord Leila, qu'elle personne sympathique tu es, merci d'avoir été là pour discuter de mes projets, pour tes bons conseils. Nos repas ensemble me manqueront, même t'entendre râler pour le désordre me manquera.

À ma chef d'équipe, Virginie, je te remercie de m'avoir accueillie au sein de ton équipe depuis le stage de Master 2, merci pour ta bonne humeur au quotidien et ton énergie positive.

Sylvaine, tu m'as toujours proposé de ne pas hésiter à me confier si besoin, et rien que cela me réconfortait. Je te remercie pour ta douceur et ta gentillesse.

Marianne, je suis sûre que ne plus mettre mon nom sur la liste de ménage de la culture Cell te manquera ;). Je t'ai toujours regardé avec tendresse, d'une part pour tes encouragements mais aussi pour tes délicieux gâteaux. François, j'ai apprécié ta sympathie, ton humour pendant les réunions d'équipe, mais aussi tes questions pertinentes.

J'ai passé de bons moments en votre présence, je remercie chacun de vous d'avoir semé de la bonne humeur durant ma thèse.

Cherine. B et Martin C.G, vous m'avez fait découvrir le monde de la biochimie structurale, mais je retiens tout particulièrement votre gentillesse, votre disponibilité et votre inestimable aide avec la purification des protéines qui nous a donné du fil à retordre.

Aux équipes du coté zebrafish,

Tamara, Mai, Karima, Laure, Charlotte, Cathy, Alexandra, Stéphane, j'ai toujours dit haut et fort que le côté zebrafish du couloir était le meilleur. Vous êtes accueillants, souriants, et je me suis toujours sentie à mon aise dans vos laboratoires. Je remercie chacun d'entre vous pour sa bonne humeur, ses conseils. Un merci particulier pour Mai et Karima, pour vos précieux conseils sur le modèle zebrafish.

J'ai aussi une pensée pour les personnes du secrétariat, en particulier Véronique et Nathalie. Vous m'avez toujours accueillie de façon chaleureuse, merci beaucoup pour votre bonne humeur, Merci à toi aussi Luc, ainsi qu'à toi Christian, j'ai apprécié votre humour et nos discussions.

Aux équipes de parasitologie,

Particulièrement, Alexandra. M, Ksenia et Caty. S, vous avez été les 1ères à venir me parler à mon arrivée au laboratoire, vous m'avez bien accueillie. Je vous remercie les filles, ainsi qu'Aude, Pratima, Sarah, vous êtes vraiment des filles sympathiques. Je vous apprécie beaucoup et espère vous revoir en dehors du laboratoire.

Les inséparables Michel et Anne, aussi sympathiques que drôles, je vous remercie de m'avoir si bien accueillie au sein de l'unité.

À mes amis,

Rackee, tendre et drôle, je te regrette énormément, tu es une personne sincère et attachante que j'espère bien revoir.

Mariana, Preeti, qu'aurais-je fait sans vous deux à mes côtés durant mes 2 premières années de thèse, heureusement que vous étiez là. Nos discussions pendant nos expériences, nos rires, nos sorties, notre passion pour la gourmandise (surtout avec toi Mariana). Tout cela m'a aidée à avancer, je vous remercie d'avoir été là et d'avoir contribué à mon bonheur au laboratoire.

Pauline, Gregoire, et Talip, alias les vrais,

Popo, tu es une fille en or, on s'est connues en stage, on s'est retrouvées deux ans après, et vraiment ta présence a égayé mes journées. Je n'oublierai pas nos rires, notre complicité, tu n'es pas qu'une connaissance pour moi mais une vraie amie que je tiens à garder. S'il y'a bien une personne que je regretterais au laboratoire, c'est toi. Je pourrais écrire des dizaines de pages sur tes qualités, tu es une personne formidable, toujours là pour aider sans rien demander en retour et j'espère que nous aurons encore plein d'occasions de nous revoir. Nadhuma, je ne t'ai rencontrée que durant mes 3 derniers mois de thèse, mais j'ai pu déjà t'apprécier et voir à quel point tu es gentille. Je regrette que nous n'ayons pas eu plus de temps à passer ensemble, mais saches qu'on pourra se rattraper à l'extérieur du laboratoire. Gregoire et Talip, vous n'imaginez pas à quel point je vous apprécie. Nos pauses de midi, nos sorties, vos blagues pourries, tout cela me manquera tellement. Merci d'avoir été là, de m'avoir remonté le moral et de m'avoir fait rire. Merci " les vrais ".

Je sais que ce chemin aurait été compliqué sans votre présence.

A toute personne m'ayant consacré un moment pour m'aider, me conseiller, m'encourager ou simplement me sourire. Merci

Table des matières

Abréviations 11

Figures et tableaux 13

I. **Introduction** 16

1 **La mucoviscidose** 17

1.1 Description de La mucoviscidose 17

1.1.1 Manifestations cliniques 17

1.1.2 Le canal CFTR et les mutations associées 18

1.1.3 Les infections pulmonaires chez le malade à mucoviscidose 18

2 ***Pseudomonas aeruginosa*** 19

2.1 Description de *Pseudomonas aeruginosa* 19

2.2 Infections aiguës et chroniques à *P. aeruginosa* 20

2.3 Moyens de lutte actuels, antibiorésistance et perspectives 21

2.3.1 Les antibiotiques 21

2.3.2 Les nouvelles stratégies antibactériennes : stratégie antivirulence 22

2.3.2.1 Le système de sécrétion de type III (SST3) 23

2.3.2.2 Les exopolysaccharides et le biofilm 24

2.3.2.3 Le quorum sensing 24

3 **Facteurs de virulence et survie intracellulaire de *P. aeruginosa*** 25

3.1 Le facteur de virulence MgtC 25

3.1.1 Description de MgtC 25

3.1.2 Découverte de MgtC et phylogénie 26

3.1.3 Rôle de MgtC dans la croissance en milieu carencé en magnésium 28

3.1.4 Rôle de MgtC dans la virulence bactérienne et la survie intracellulaire 28

3.1.5 Fonction de la protéine MgtC: exemple chez *S.* Typhimurium 31

3.1.6 Rôle de MgtC chez le pathogène extracellulaire *P. aeruginosa* 32

3.1.7 Régulation de MgtC : exemple chez *S*. Typhimurium 34

3.1.7.1 Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de MgtC 34

3.1.7.2 Régulation post-traductionnelle de MgtC 35

3.1.8 MgtR : peptide antagoniste du facteur de virulence MgtC 36

3.1.8.1 Découverte et caractérisation du peptide MgtR chez *S.* Typhimurium 36

3.1.8.2 Mécanisme d'action de MgtR 37

3.1.8.3 MgtR comme candidat antivirulence 39

3.2 Le facteur de virulence OprF 41

3.2.1 Description d'OprF 41

3.2.2 Rôle d'OprF dans la virulence de *P. aeruginosa* 42
3.2.2.1 La formation des vésicules membranaires 43
3.2.2.2 OprF et biofilm 43
3.2.2.3 Modulation de l'expression du système de sécrétion de type III 44
3.2.2.4 Rôle dans l'adhérence cellulaire 44
3.2.2.5 Rôle avec les molécules du quorum sensing 44
3.2.2.6 Rôle avec le complément 45
3.2.3 Rôle d'OprF dans la virulence bactérienne et la survie intracellulaire 45
4 **Réponse immunitaire innée lors de l'infection à *P. aeruginosa*** 47
4.1 Rôle du neutrophile lors de l'infection à *P. aeruginosa* 47
4.2 Rôle du macrophage lors de l'infection à *P. aeruginosa* 48
4.2.1 Phagocytose et formation du phagolysosome 48
4.2.2 Rôle bactéricide du macrophage 48
4.3 Réponse altérée des macrophages dans le cas de la mucoviscidose 50
4.3.1 Macrophage et CFTR 51
5 **Le poisson-zèbre comme modèle d'étude des interactions macrophage - *P. aeruginosa*** 52
5.1 Intérêt du poisson-zèbre comme modèle d'infection bactérienne 53
5.2 Les embryons de poisson-zèbre pour l'étude des interactions macrophage-bactérie 55
5.3 Le poisson-zèbre comme modèle d'étude de la pathogenèse à *P. aeruginosa* 56
5.4 Le Cftr chez le poisson-zèbre 59
5.5 Utilisation du poisson-zèbre comme modèle d'infection pour la mucoviscidose 60
II. **Objectifs** 63
1 **Développement d'une stratégie antivirulence basée sur l'inhibition du facteur de virulence MgtC** 64
2 **Apport des mutants *mgtC et oprF* à l'étude du rôle de l'étape intramacrophagique dans l'infection à *P. aeruginosa*** 65
III. **Résultats** 66
1 **Développement d'une stratégie antivirulence ciblant le facteur de virulence MgtC** 67
1.1 Activité du peptide synthétique ciblant MgtC sur la survie intramacrophagique de *P. aeruginosa* et la formation de biofilm 67
1.1.2 Article 1 – Activity of a Synthetic Peptide Targeting MgtC on *Pseudomonas aeruginosa* Intramacrophage Survival and Biofilm Formation 69
1.1.3 Résultats complémentaires 70
1.2 Étude structurale du domaine d'interaction avec MgtR : Production de la protéine MgtC de *P. aeruginosa* 73
2 **Apport des mutants *oprF* et *mgtC* dans la compréhension du rôle du macrophage lors de l'infection à *P. aeruginosa*** 81

2.1 Implication des facteurs de virulence OprF et MgtC dans le devenir intramacrophagique de *P. aeruginosa* 81
2.1.1 Résumé de l'article 2 81
2.1.2 Article 2- Killing from the inside: Intracellular role of T3SS in the fate of *Pseudomonas aeruginosa* within macrophages revealed by *mgtC* and *oprF* mutants 83
2.2 Rôle d'OprF dans la résistance de *P. aeruginosa* à l'action bactéricide du macrophage au cours de l'infection aiguë 84
2.2.1 Résumé de l'article 3 84
2.2.2 Article 3 – *Pseudomonas aeruginosa* OprF plays a role in resistance to macrophage clearance during acute infection 85
2.2.3 Résultats complémentaires 86
IV. **Conclusion, disussion et perspectives** 92
1 **Développement d'une stratégie antivirulence ciblant MgtC** 93
1.1 MgtC et biofilm 93
1.2 Étude de l'effet du peptide Synthétique MgtR 94
1.2.1 Effet de MgtR sur la survie intramacrophagique de *P. aeruginosa* 94
1.2.2 Effet de MgtR sur la virulence de *P. aeruginosa* dans l'embryon de poisson-zèbre 95
1.2.3 Mécanisme d'action de MgtR 95
1.2.4 Interférence de MgtR avec la dimérisation de MgtC de *P. aeruginosa* ? 96
2 **Étude du rôle d'OprF dans la survie intramacrophagique de *P. aeruginosa*** 98
2.1 Devenir intracellulaire de *P. aeruginosa* 98
2.2 Rôle d'OprF dans la virulence de *P. aeruginosa* dans l'embryon de poisson-zèbre 98
2.3 Rôle d'OprF dans la phagocytose de *P. aeruginosa* 99
2.4 Étude de l'implication du CFTR dans la susceptibilité des embryons à l'infection par *P. aeruginosa* 100
V. **Bibliographie** 102

Abréviations

aa	acide aminé
AAA+	ATPase associée à diverses activités cellulaires
ABC	ATP-binding cassette
Ac	Anticorps
ACT	Aspartokinase, chorismate mutase, and TyrA
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BCG	Bacille Calmette-Guérin
c-di-GMP	Cyclic diguanosine monophosphate
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CFU	Unités formant colonies
Cryo-ME	Cryo-microscopie électronique
DMSO	Dimethylsulfoxide
EPS	Exopolysaccharides
F-ATPase	F_1F_0 ATP synthase
GAP	GTPase Activating Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
IFN	Interferon
IL	Interleukine
iNOS	Inductible Nitric Oxide Synthase
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
Kb	Kilobase
kDa	kilodalton
KV	Vésicule de Kupffer
LPS	Lipopolysaccharide
MAMPs	Microbe-associated molecular patterns
mBTL	Méta-bromo-thiolactone
NLR	Récepteurs cytosoliques de type Nod
Nramp1	Natural Resistance-Associated Membrane Protein
ORF	Open reading frame
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
Pb	Paire de bases
PCR	Polymerase chain reaction
phox	phagocytic oxidase
PKC	Protein kinase C
PQS	Pseudomonas quinolone signal
PRRs	Pattern-Recognition Receptors
QS	Quorum sensing
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SEC	Size exclusion chromatography

SM	Spectrométrie de masse
SPI	*Salmonella* Pathogenicity Islands
SST3	Système de sécrétion de type III
TLR	Toll like receptors
TM	Transmembranaire
TNF	Tumor necrosis factor
V-ATPase	ATPase vacuolaire
VMs	Vésicules membranaires
WHO	World Health Organization
µm	Micromètre
µM	Micromolaire

Figures et tableaux

Figures

Figure 1. Description de la mucoviscidose. 17

Figure 2. Structure globale du hCFTR dans sa conformation déphosphorylée sans ATP. 18

Figure 3. Moyens de résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa*. 20

Figure 4. *P. aeruginosa* adopte deux modes de vie différents, soit l'état planctonique (1-3), soit attaché formant un biofilm (5-6). 21

Figure 5. Schéma illustrant les principales stratégies antivirulence pour lutter contre les infections bactériennes.. 23

Figure 6. Phylogénie de MgtC. 27

Figure 7. Implication de MgtC dans la survie intramacrophagique chez plusieurs pathogènes intracellulaires et extracellulaires. 31

Figure 8. Différentes fonctions de MgtC chez *S.* Typhimurium. 32

Figure 9. Double rôle de MgtC dans les environnements extracellulaires et intracellulaires, chez les bactéries, *S*. Typhimurium et *P. aeruginosa*. 34

Figure 10. Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de MgtC. 36

Figure 11. Séquence en acides aminés du peptide MgtR.. 37

Figure 12. Double effet du peptide MgtR sur la protéine MgtC 38

Figure 13. Effet de MgtR sur la stabilité de la protéine MgtC médié par la protéase FtsH 38

Figure 14. Topologie de la protéine MgtC montrant le motif Ala-coil (TM4) et les résidus entourés essentiels à l'interaction avec MgtR. 39

Figure 15. Phénotypes des souches PAO1 exprimant mgtR. 40

Figure 16. Modèle des fonctions d'OprF dans l'adhérence cellulaire et le biofilm. 42

Figure 17. La survie et la cytotoxicité de *P. aeruginosa* dans les macrophages est dépendante d'OprF. 46

Figure 18. Réponses antimicrobiennes médiées par le macrophage. 49

Figure 19. Coopération macrophages-neutrophiles et recrutement au site de l'infection 50

Figure 20. Rôle controversé du CFTR dans le macrophage. 52

Figure 21. Utilisation de l'embryon de poisson-zèbre comme modèle d'étude des interactions système immunitaire-bactérie 54

Figure 22. Sites d'injection utilisés pour les procédures expérimentales d'infection de l'embryon de poisson-zèbre. 54

Figure 23. Superposition de la structure du CFTR humain avec celui du poisson-zèbre montrant la grande similitude des deux protéines 59

Figure 24. La latéralisation des organes est perturbée chez les embryons mutants *cftr*^{pd1049}. 60
Figure 25. Formation de microcolonies PAO1 dans le ventricule cérébral postérieur d'embryons de poisson-zèbre WT et CF. 61
Figure 26. Mécanisme cellulaire lié au dysfonctionnement du CFTR induisant l'échappement des bactéries à l'action des macrophages. 61
Figure 27. Effet du peptide MgtR (ajouté après infection des macrophages sur la survie de PAO1 dans les macrophages 70
Figure 28. Visualisation du peptide fluorescent MgtR-FITC sur des embryons de poisson-zèbre..... 71
Figure 29. Effet du peptide MgtR sur la survie des embryons de poisson-zèbre.. 72
Figure 30. Alignement de séquences des protéines PA2558 et PA4635. 73
Figure 31. Schématisation du système d'expression C41 des protéines recombinantes MgtC (PA4635) et MgtC-like (PA2558). 74
Figure 32. Conditions d'expression des protéines PA2558 et PA4635 testées et révélées sur WB. 74
Figure 33. Visualisation des bandes correspondant aux protéines recombinantes PA2558 et PA4635 dans la fraction membranaire. 75
Figure 34. Gel coloré au bleu de coomassie montrant la solubilisation de la protéine PA2558. 75
Figure 35. Purification de la protéine MgtC-like (PA2558). 76
Figure 36. Purification de la protéine MgtC. 77
Figure 37. Photos de la formation d'un cristal de l'échantillon MgtC-like purifié 77
Figure 38. Visualisation de l'état d'oligomérisation de la protéine purifiée MgtC.. 78
Figure 39. Visualisation de l'état d'oligomérisation des protéines purifiées MgtC, MgtC C99S et MgtC C155S.. 79
Figure 40. Alignement de séquences des allèles *cftr* sauvage et *cftr*^{pd1049} 87
Figure 41. Électrophorèse sur gel d'agarose des fragments PCR (gène *cftr*) de 300 pb 87
Figure 42. Électrophorégrammes correspondants aux profils des 3 génotypes *cftr*+/+, *cftr*+/- et *cftr*-/- de poisson-zèbre. 88
Figure 43. Les embryons *cftr*-/- sont fortement sensibles aux infections à *P. aeruginosa* 89
Figure 44. Infection des embryons *cftr*+/+ et embryons *cftr*-/-(KV-) par *P. aeruginosa*. 90
Figure 45. Visualisation du peptide MgtR-FITC à l'intérieur des macrophages J774. 94
Figure 46. Interférence de MgtR avec la dimérisation de MgtC 96
Figure 47. Schéma de la stratégie antivirulence basée sur le peptide MgtR chez *P. aeruginosa*. 97
Figure 48. Apport de l'étude du mutant *oprF* dans la compréhension du rôle de CFTR vis-à-vis de l'acidification du macrophage. 101

Tableaux

Tableau 1. Réponse immunitaire médiée par les macrophages dans le cas normale ou pathologique (mucoviscidose) 51

Tableau 2. Gènes ciblés dans les lignées transgéniques pour étudier le rôle des macrophages dans le poisson-zèbre 55

Tableau 3. Facteurs bactériens de *P. aeruginosa* étudiés dans le modèle poisson-zèbre 58

I. Introduction

1 La mucoviscidose

1.1 Description de La mucoviscidose

La mucoviscidose encore appelée fibrose kystique (CF pour cystic fibrosis), est une maladie génétique rare qui résulte d'une mutation au niveau du gène *cftr* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) (Rommens *et al.,* 1989). La protéine CFTR est impliquée dans le transfert d'ions chlorures et est présente à la surface de nombreux types cellulaires. La mutation du gène *cftr* se traduit par la production de protéines CFTR anormales, rendant le transfert d'ions et l'hydratation du mucus très difficiles. Les sujets atteints de mucoviscidose ont de ce fait un mucus visqueux (figure 1).

1.1.1 Manifestations cliniques

La mucoviscidose affecte principalement les voies respiratoires et les voies digestives. Les symptômes de la mucoviscidose au niveau de l'appareil respiratoire se manifestent par un épaississement du mucus dans les bronches qui entraîne une obstruction des voies respiratoires. À cause du manque de fluidité et de l'écoulement difficile du mucus, les bronches deviennent un lieu propice au développement des microorganismes qui sont responsables d'infections pulmonaires (Lyczak *et al.,* 2002). Ces infections sont à la base de la plupart des besoins en soins cliniques et des complications majeures menaçant le pronostic vital des adultes atteints de mucoviscidose (figure 1).

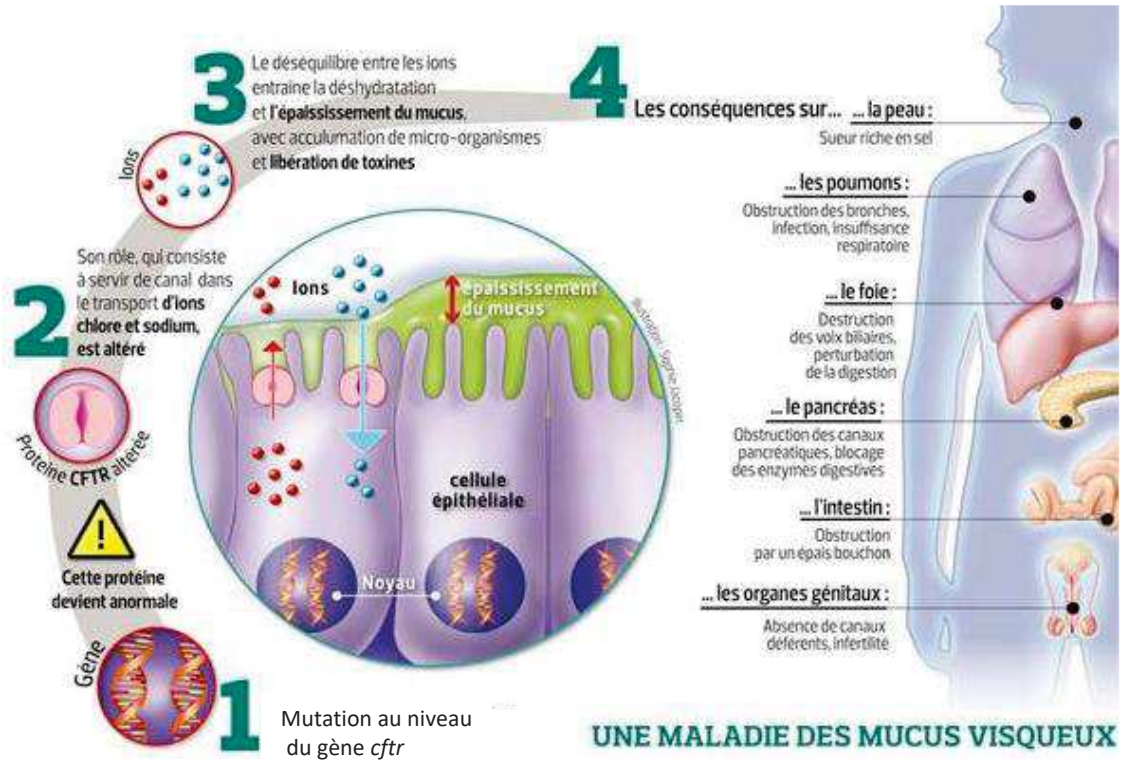


Figure 1. Description de la mucoviscidose. D'après (http://sante.lefigaro.fr/sante/maladie/mucoviscidose/quest-ce-que-cest).

1.1.2 Le canal CFTR et les mutations associées

Le CFTR appartient à la grande famille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette). La structure du Cftr de poisson-zèbre (zCftr) puis celle du CFTR humain (hCFTR), ont récemment été résolues par cryo-microscopie électronique (cryo-ME)(Liu *et al.,* 2017; Zhang and Chen, 2016). Le canal CFTR contient deux domaines transmembranaires (TMD) formant la voie de conduction anionique et deux domaines de liaison aux nucléotides cytoplasmiques (NBD) qui se lient et hydrolysent l'ATP. Un grand domaine régulateur (R), relie les deux moitiés de la protéine et joue un rôle essentiel dans la régulation de l'activité du canal (Liu *et al.,* 2017) (figure 2).

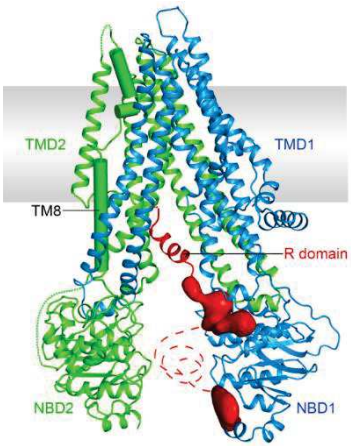


Figure 2. Structure globale du hCFTR dans sa conformation déphosphorylée sans ATP, montrant les différents domaines du canal, d'après (Liu *et al.,* 2017).

Certaines mutations entraînent une biosynthèse défectueuse du CFTR, induisant une diminution ou une absence totale de production de la protéine. D'autres sont des mutations faux-sens qui produisent une protéine mal repliée ou dysfonctionnelle. ΔF508 est la mutation la plus fréquente chez les malades mucoviscidosiques, elle affecte le trafic et la maturation du CFTR. Une autre mutation commune, G551D réduit considérablement la probabilité d'ouverture du canal CFTR (Lukacs and Verkman, 2012; Welsh and Smith, 1993).

1.1.3 Les infections pulmonaires chez le malade à mucoviscidose

Les infections pulmonaires sont constantes chez les personnes atteintes de mucoviscidose. Dès l'enfance ou au début de l'adolescence, *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae* commencent à coloniser les poumons des malades. À mesure que l'âge avance, *Pseudomonas aeruginosa*, le complexe *Burkholderia cepacia* et d'autres bacilles à Gram négatif (e.g. *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*), ainsi que des mycobactéries non tuberculeuses prennent le relais. Mais c'est *P. aeruginosa* qui est le plus fréquemment retrouvé chez les sujets atteints de mucoviscidose. Cette bactérie est associée à une augmentation de la morbidité et de la mortalité, ainsi qu'à une dégradation de la qualité de vie des malades (Foweraker, 2009).

2 *Pseudomonas aeruginosa*

2.1 Description de *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa a été découvert par Gessard en 1882. Au cours de la 1ère guerre mondiale, l'agent du "pus bleu" est à l'origine de la surinfection de plaies chez les soldats. Mais c'est surtout dans les années 1960, parallèlement au développement de l'hospitalisation et des techniques invasives d'exploration, que cette bactérie émerge comme un agent pathogène majeur de l'Homme. C'est l'exemple-type des bactéries nosocomiales opportunistes (Bodey *et al.,* 1983). La dernière enquête de prévalence des infections associées aux soins organisée par Santé publique France en 2017, la classe au 4ème rang (6.28%) des espèces nosocomiales (après *Escherichia coli*, *S, aureus*, *Enterococcus faecalis*). Ces quatre micro-organismes sont les plus fréquents et représentent la moitié des microorganismes isolés des infections nosocomiales (SpF, 2019).

P. aeruginosa également appelé bacille pyocyanique est un micro-organisme ubiquitaire à Gram négatif. On le retrouve dans de nombreux sites environnementaux mais plus particulièrement dans l'environnement hydrique. Son large génome (6,3 millions de paires de bases) est composé de près de 6000 gènes qui comprennent notamment des gènes associés à diverses voies métaboliques, des facteurs de virulence, de transport, d'efflux et de chimiotactisme, conférant à *P. aeruginosa* une grande capacité d'adaptation à son environnement (Folkesson *et al.,* 2012; Silby *et al.,* 2011), lui permettant ainsi, d'infecter divers organismes incluant plantes, amibes, nématodes et animaux vertébrés (Williams *et al.,* 2010). Ce pathogène montre également une remarquable capacité de résister aux antibiotiques, soit de façon native (par l'expression constitutive de β-lactamases et/ou de pompes à efflux, ou en raison d'une faible perméabilité de la membrane externe), soit suite à l'exposition aux antibiotiques et aux stress environnementaux, ou encore par l'acquisition de gènes de résistance, des mutations, la surexpression de pompes à efflux et la diminution de l'expression des porines (Mesaros *et al.,* 2007) (figure 3).

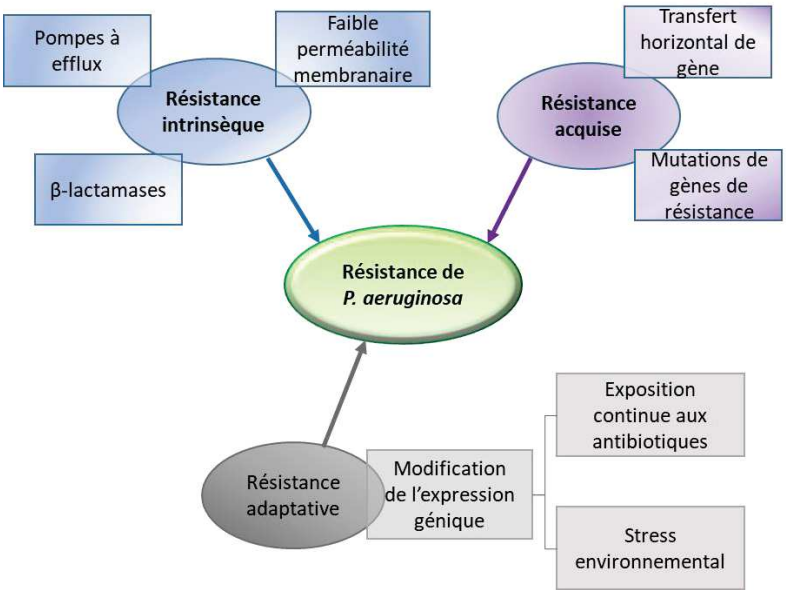


Figure 3. Moyens de résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa*.

2.2 Infections aiguës et chroniques à *P. aeruginosa*

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste responsable d'infections aiguës et chroniques chez les patients hospitalisés ou immunodéprimés. Les infections aiguës peuvent être pulmonaires, cutanées, urinaires ou encore gastro-intestinales (Silby *et al.,* 2011). Elles se propagent souvent rapidement et peuvent provoquer des lésions tissulaires et un sepsis avec un taux de mortalité élevé. Les infections chroniques quant à elles, persistent pendant des semaines, des mois ou des années malgré une intervention clinique intensive (Turner *et al.,* 2014). Elles s'observent dans certains cas suite à l'implantation de matériel médical (sondes urinaires, cathéters, prothèses...), ou la production d'un mucus bronchique anormalement épais (cas de la mucoviscidose ou de la bronchopneumopathie chronique obstructive) (SFM, 2019).

Les facteurs de virulence impliqués dans l'infection aiguë incluent les systèmes de sécrétion de types II et III, les flagelles, les pili de type IV et les facteurs de virulence régulés par le Quorum sensing (QS) (protéases, élastase, pyocyanine). Alors que lors de l'établissement d'une infection chronique, il y'a surproduction des exopolysaccharides extracellulaires (EPS), régulation positive du système de sécrétion de type VI et formation de biofilm et de variants à petites colonies (figure 4). Les infections aiguës au niveau de sites spécifiques, tels que les poumons des patients mucoviscidosiques, peuvent évoluer en infections chroniques. Ceci est dû à des modifications adaptatives dans le type clonal infectant, incluant une régulation négative des gènes de virulence aiguë avec une régulation positive

des phénotypes d'infection chronique et de la résistance aux antibiotiques (Balasubramanian *et al.,* 2013).

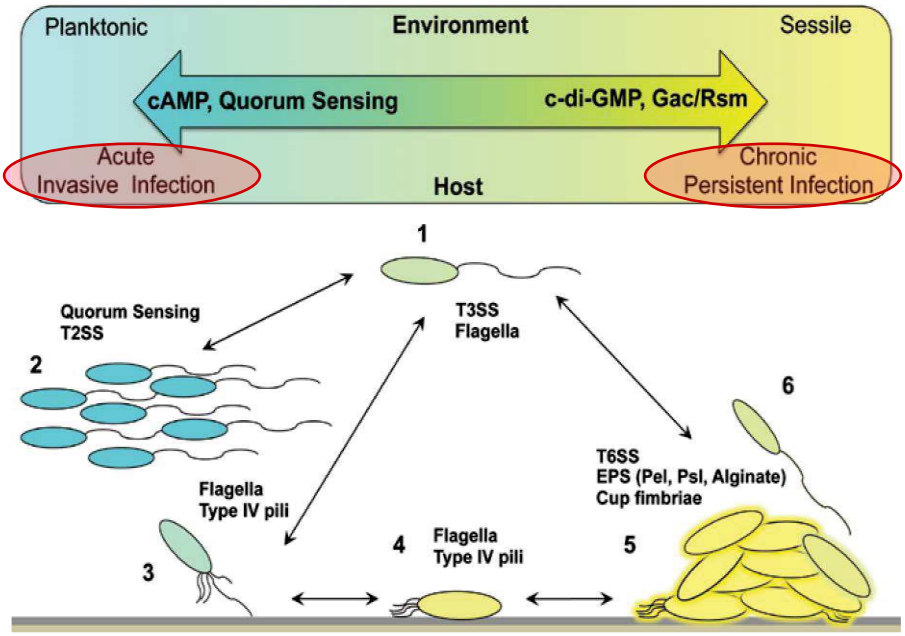


Figure 4. *P. aeruginosa* adopte deux modes de vie différents, soit l'état planctonique (1-3), soit attaché formant un biofilm (5-6). Quatre voies de régulation (cAMP, c-di-GMP, Quorum sensing et Gac/Rsm) jouent un rôle analogue dans l'infection en contrôlant les phénotypes d'infection aiguë et chronique. D'après (Coggan and Wolfgang, 2012).

2.3 Moyens de lutte actuels, antibiorésistance et perspectives

L'issue des infections à *P. aeruginosa* dépend du degré de faiblesse de la défense de l'hôte, des précédents traitements infructueux et de la virulence de la bactérie. Le taux élevé d'acquisition de *P. aeruginosa* chez les patients hospitalisés est associé à l'utilisation antérieure d'antibiotiques à large spectre, la présence de souches multirésistantes dans les hôpitaux et divers degrés de lésion pulmonaire ou de déficit immunitaire chez ces individus (Williams *et al.,* 2010). Par conséquent, un grand nombre d'approches sont mises en place pour développer de nouveaux anti-infectieux. Ces stratégies vont de l'élimination (nouveaux antibiotiques) au désarmement (antivirulence) de l'agent pathogène (Bassetti *et al.,* 2018).

2.3.1 Les antibiotiques

La résistance aux antibiotiques joue un rôle majeur dans la pathogénèse de *P. aeruginosa*, et ce, quel que soit le type d'infection induit. Cependant, dans le cas d'infection chronique, les bactéries présentent des niveaux de résistance plus importants (Balasubramanian *et al.,* 2013).

Au cours des années 1960, *P. aeruginosa* est apparu comme une cause fréquente de bactériémie à Gram négatif, en particulier chez les sujets immunodéprimés (Schimpff, 1993). À cette époque, la mortalité était d'environ 90% et les seuls antibiotiques anti-*Pseudomonas* disponibles, les polymixines, étaient inefficaces chez les patients atteints de neutropénie persistante. Le traitement de ces infections s'est quelque peu amélioré avec l'introduction du sulfate de gentamicine, mais son efficacité chez les patients neutropéniques était limitée. L'ère du traitement efficace des infections à *P. aeruginosa* a commencé avec l'introduction de la carbénicilline et de la gentamicine et s'est améliorée avec la découverte d'autres pénicillines anti-*Pseudomonas*, céphalosporines, carbapénèmes et fluoroquinolones (Chatzinikolaou *et al.,* 2000). Comme la bactérie s'adapte rapidement aux attaques médicamenteuses, il est recommandé de débuter un traitement anti-*Pseudomonas* par une bithérapie (avec un aminoside, amikacine ou tobramycine), jusqu'à réception de l'antibiogramme. Les principaux antibiotiques employés étant la piperacilline, la ceftazimidine, les aminoglycosides, les fluoroquinolones, les carbapénèmes (à n'utiliser qu'en dernier recours) (HAS, 2019).

Mais malgré ces progrès, *P aeruginosa* continue de causer des infections graves et représente une menace importante pour les patients prédisposés, en raison de sa remarquable capacité à résister aux antibiotiques. *P. aeruginosa* a d'ailleurs été classé par l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO, 2017), parmi le groupe critique des « agents pathogènes prioritaires » résistants aux antibiotiques. C'est pourquoi le développement de nouvelles stratégies antibactériennes est nécessaire.

2.3.2 Les nouvelles stratégies antibactériennes : stratégie antivirulence

Le développement de stratégies dites antivirulence, est apparu comme une alternative intéressante pour la création de nouveaux agents antimicrobiens, puisque au lieu de tuer les agents pathogènes, elle tend à réduire leur virulence (Fleitas Martínez *et al.,* 2019). Cette approche présente plusieurs avantages potentiels, notamment l'élargissement du répertoire de cibles bactériennes, la préservation du microbiote endogène et réduirait la pression sélective, ce qui pourrait limiter l'apparition de résistances (Clatworthy *et al.,* 2007).

Les facteurs de virulence sont des composants microbiens utilisés par les agents pathogènes pour coloniser, envahir et persister chez le sujet hôte (Fleitas Martínez *et al.,* 2019). L'inhibition des systèmes de virulence bactériens tels que la production de toxines, l'adhésion et la colonisation, les systèmes de sécrétion ou encore les systèmes de signalisation, permettrait de limiter le processus infectieux bactérien (figure 5).

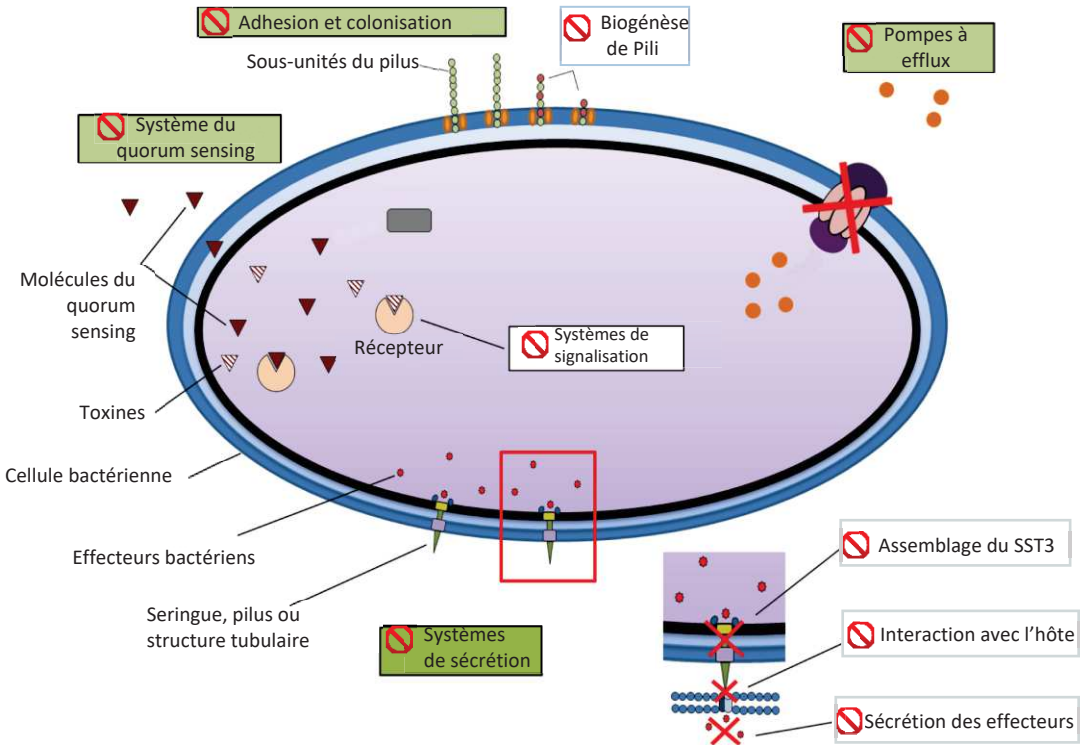


Figure 5. Schéma illustrant les principales stratégies antivirulence pour lutter contre les infections bactériennes. Sur le schéma sont encadrés les principaux mécanismes de virulence bactériens ciblés. Adapté de (López *et al.,* 2014).

Les cibles antivirulence sont très nombreuses. À titre non exhaustif, je décris ci-après quelques cibles importantes dans la pathogénèse de *P. aeruginosa*.

2.3.2.1 Le système de sécrétion de type III (SST3)

Le SST3 est le principal déterminant de la virulence de *P. aeruginosa* lors d'infections aiguës. Ce système est un appareil semblable à une seringue qui facilite l'injection d'effecteurs bactériens directement dans le cytosol de la cellule hôte (Bleves *et al.,* 2010).

Les différentes souches de *P. aeruginosa* peuvent avoir différentes combinaisons de gènes codant pour les effecteurs du SST3, et peuvent être divisées en 2 groupes. Les souches dites cytotoxiques possèdent les effecteurs ou exotoxines (Exo) U, ExoT et parfois ExoY (e.g. la souche PA103 ou PA14), tandis que les isolats invasifs possèdent ExoS, ExoT et souvent ExoY (e.g. la souche PAO1 ou PAK) (Bleves *et al.,* 2010).

Le principe des stratégies antivirulences ciblant le SST3 consiste à : (1) empêcher l'assemblage du SST3; (2) inhiber l'interaction avec les cellules hôtes eucaryotes; ou (3) inhiber la sécrétion des toxines (ou effecteurs) (López *et al.,* 2014). Deux grandes classes de petites molécules, les salicylidène acylhydrazides et les thiazolidinones, ont été utilisées pour inhiber plusieurs genres de bactéries par

l'intermédiaire du SST3. De nombreuses autres classes d'inhibiteurs de petites molécules du SST3, chimiquement et structurellement diverses, ont également été identifiées (McShan and De Guzman, 2015).

2.3.2.2 Les exopolysaccharides et le biofilm

Les bactéries peuvent vivre dans une communauté appelée biofilm, qui est une structure formée par des polymères extracellulaires tels que les acides nucléiques, des protéines, des vésicules lipidiques et des exopolysaccharides (EPS). Une fois le biofilm formé, les bactéries peuvent se disperser et coloniser d'autres sites. Ce mode de vie permet aux pathogènes de se protéger contre le stress environnemental potentiel, tel que les antibiotiques et les composants de défense de l'hôte (Hall and Mah, 2017; Tseng *et al.,* 2018). Chez *P. aeruginosa*, la formation de biofilm est régulée par un mécanisme de communication cellule-cellule appelé quorum sensing (QS).

P. aeruginosa produit au moins trois EPS (alginate, Pel et Psl) qui sont déterminants pour la stabilité de la structure du biofilm. Pel et Psl servent de structure primaire d'échafaudage pour le développement du biofilm et sont impliqués dans les premiers stades de sa formation. L'alginate contribue à la stabilité structurelle et à la protection du biofilm. Les appendices extracellulaires de *P. aeruginosa*, comme les flagelles, les pili de type IV et les fimbriae, sont également considérés comme des composants de la matrice du biofilm jouant un rôle adhésif dans les interactions cellule-surface (Rasamiravaka *et al.,* 2015).

Les composés antivirulences contre les biofilms sont développés pour limiter l'adhésion bactérienne aux surfaces, affecter la production de la matrice extracellulaire, ou encore perturber le biofilm existant (Fleitas Martínez *et al.,* 2019).

2.3.2.3 Le quorum sensing

Le QS est un phénomène par lequel les bactéries peuvent détecter la densité de leur population en libérant des molécules de signalisation diffusibles (autoinducteurs) qui s'accumulent dans la population et son environnement. Ces molécules de signalisation augmentent en concentration à mesure que la population bactérienne s'accroit, jusqu'à atteindre un seuil critique de concentration. A ce stade, les molécules de signalisation détectant le quorum peuvent influencer l'expression de divers gènes, y compris les gènes impliqués dans la virulence. Par conséquent, les molécules du QS sont des cibles attrayantes pour développer des stratégies thérapeutiques antivirulences (Clatworthy *et al.,* 2007).

L'une des approches permettant de perturber les systèmes QS est basée sur les interférences générées par la production de signaux. Cette stratégie est centrée sur l'inhibition de l'activité des enzymes produisant des autoinducteurs via de petites molécules inhibitrices, qui sont principalement des substrats analogues structuraux ou analogues d'un état de transition et n'affectent pas la croissance bactérienne (LaSarre and Federle, 2013).

3 Facteurs de virulence et survie intracellulaire de *P. aeruginosa*

Lors de ma thèse, je me suis intéressée aux facteurs de virulence de *P. aeruginosa*, MgtC et OprF. Comme je vais le décrire ci-après, des travaux distincts ont montré que ces deux facteurs de virulence jouaient un rôle important dans la survie intramacrophagique de *P. aeruginosa.* Une meilleure compréhension de la pathogenèse médiée par les facteurs de virulence, tels que MgtC et OprF, pourrait permettre la mise au point de nouvelles molécules thérapeutiques antivirulence.

3.1 Le facteur de virulence MgtC

MgtC a été initialement décrit et largement étudié chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S*. Typhimurium), avant d'être étudié chez d'autres bactéries, dont *P. aeruginosa.* Dans cette partie seront détaillées les connaissances actuelles concernant MgtC chez *S*. Typhimurium et chez les autres bactéries pathogènes.

3.1.1 Description de MgtC

MgtC est une protéine de la membrane interne, constituée de cinq hélices transmembranaires (TM) en N-terminal et un domaine cytoplasmique en C-terminal (Rang *et al.,* 2007). L'analyse phylogénétique des protéines MgtC-like, montre que MgtC est constituée d'un domaine transmembranaire N-terminal conservé (environ 130 aa), et d'un domaine cytoplasmique C-terminal plus variable (environ 100 aa).

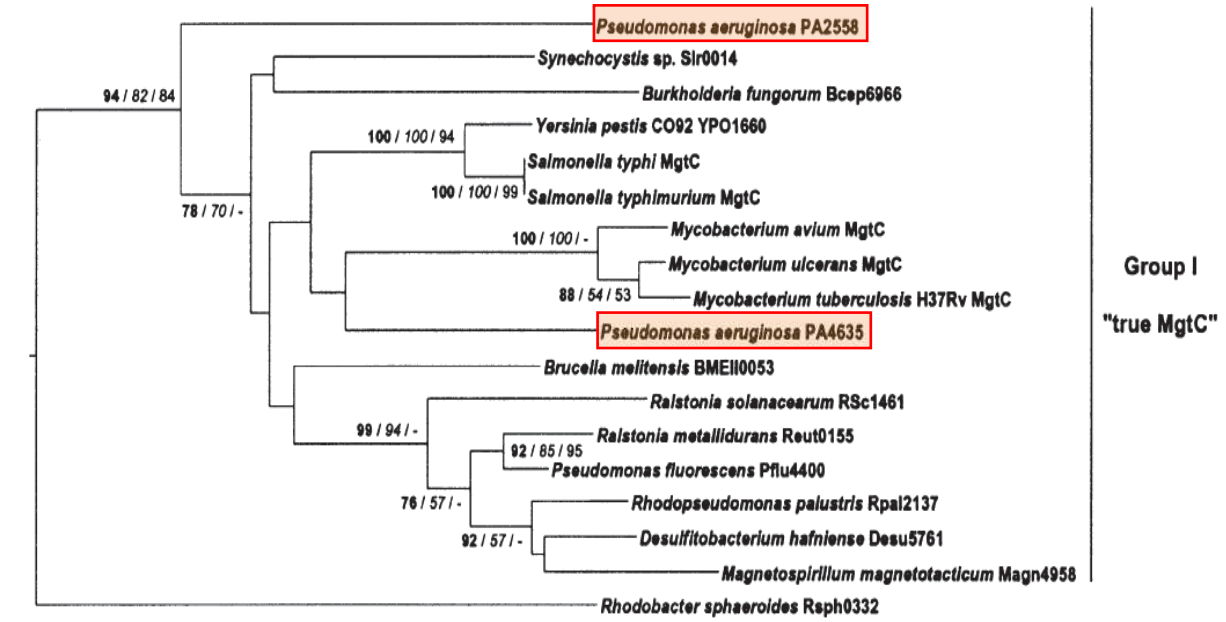
Jusqu'à présent, seule la structure du domaine C-terminal de MgtC est connue (sur la base de l'étude de la protéine MgtC de *Mycobacterium tuberculosis*). Ce domaine forme un repliement βαββαβ caractéristique des domaines liants de petites molécules, appelés ACT domaines (aspartokinase, chorismate mutase, et TyrA) (Yang *et al.,* 2012). Le domaine N-terminal, quant à lui, a une importance majeure pour la fonction de MgtC, et il est la cible d'interaction du peptide antagoniste MgtR (Jean-Francois *et al.,* 2014). Par ailleurs, l'étude de MgtC de *Salmonella* suggère que ce domaine a un rôle clé dans l'interaction avec l'ATP synthase (Lee *et al.,* 2013).

3.1.2 Découverte de MgtC et phylogénie

C'est l'étude de la protéine MgtB, l'un des trois transporteurs de Mg^{2+} de *S*. Typhimurium qui a permis de mettre en évidence la protéine MgtC, l'analyse génomique ayant montré que les deux gènes étaient cotranscrits et formaient l'opéron *mgtCB* (Snavely *et al.,* 1991). Le gène *mgtC* de *Salmonella* a été d'abord identifié comme faisant partie de l'ilot de pathogénicité 3 (SPI-3), puis décrit comme un gène requis pour la survie de la bactérie dans la lignée de macrophages J774.A1 (Blanc-Potard and Groisman, 1997). Par la suite, une autre étude a montré qu'un petit peptide régulateur, MgtR, était également codé par l'opéron *mgtCB* formant ainsi l'opéron *mgtCBR* (Alix and Blanc-Potard, 2008). Le peptide MgtR sera décrit dans le paragraphe (3.1.8).

En 2003, une étude bioinformatique, réalisée sur plus de 70 génomes, a permis de mettre en évidence 47 protéines homologues de MgtC issues de 41 organismes (Blanc-Potard and Lafay, 2003). MgtC a une distribution sporadique parmi les eubactéries et l'analyse génomique aux abords du gène *mgtC,* plus particulièrement chez des bactéries capables de survivre dans les macrophages, a montré que l'acquisition de *mgtC* a probablement eu lieu par transfert horizontal de gènes (Blanc-Potard and Lafay, 2003). MgtC de *S*. Typhimurium fait partie d'un sous-groupe de protéines appelé sous-groupe I. Ce groupe inclut des protéines dont le domaine C-terminal est conservé, issues de bactéries intracellulaires telles que *S*. Typhi, *Brucella melitensis, Burkholderia species, Mycobacterium abscessus* et *M. tuberculosis*. Il comprend également des bactéries classiquement décrites comme extracellulaires mais pouvant rencontrer une phase intracellulaire comme *P. aeruginosa* et *Yersinia pestis*. *P. aeruginosa* possède 2 homologues de la protéine MgtC (PA4635 et PA2558), toutes deux faisant partie du sous-groupe I (Figure 6).

A



B

Figure 6. Phylogénie de MgtC.
(A) Arbre phylogénique de MgtC, sous-groupe I. D'après (Blanc-Potard & Lafay 2003).
(B) Alignement des séquences MgtC de *S.* Typhimurium, *Y. pestis*, *M. tuberculosis* et *P. aeruginosa.* La ligne supérieure indique le domaine C-terminal. Les résidus impliqués dans la fonction *in vito* et/ou *in cellulo* de MgtC de *S.* Typhimurium sont encadrés de différentes couleurs selon leur fonction. L'alignement des séquences MgtC de *S.* Typhimurium (Numéro d'accès AAL22622.1), *M. tuberculosis* (NP_216327.1), *Y. pestis* (YP_002346668.1) et *P. aeruginosa* (NP_253325.1) a été fait via le serveur d'alignement de séquences multiples T-COFFEE (tcoffee.crg.cat/).

La phylogénie de MgtC a suggéré que la protéine jouerait une fonction similaire chez les différentes espèces du sous-groupe I (Blanc-Potard and Lafay, 2003). En effet, l'étude du rôle de MgtC dans diverses bactéries a permis de montrer son implication dans la survie bactérienne en milieu carencé en Mg^{2+} ainsi que dans la survie bactérienne dans les macrophages infectés (Belon *et al.,* 2015; Blanc-Potard and Groisman, 1997; Buchmeier *et al.,* 2000; Grabenstein *et al.,* 2006; Lavigne *et al.,* 2005;

Maloney and Valvano, 2006; Rang *et al.,* 2007; Retamal *et al.,* 2009), ces fonctions seront décrites plus en détail dans les paragraphes ci-après.

3.1.3 Rôle de MgtC dans la croissance en milieu carencé en magnésium

On pensait au départ que MgtC était un transporteur de Mg^{2+}, étant donné son implication dans l'adaptation des bactéries à la carence en Mg^{2+}. Le gène *mgtC* est cotranscrit avec le gène codant pour le transporteur de Mg^{2+} MgtB, chez *S.* Typhimurium, *Y. pestis* et *Brucella suis*, mais pas chez *M. tuberculosis, B. cenocepacia* ou encore *P. aeruginosa* (Blanc-Potard and Lafay, 2003). Cependant, l'expression de *mgtC* de *S.* Typhimurium au niveau de l'oocyte de *Xenupus laevis* et la mesure du potentiel membranaire des cellules ont permis de montrer que MgtC n'était pas directement lié au transport des ions tels que le Mg^{2+} (Günzel *et al.,* 2006). De plus, l'étude structurale du domaine C-terminal de MgtC de *M. tuberculosis* indique que la protéine n'aurait pas de fonction intrinsèque liée à la prise en charge du Mg^{2+} (Yang *et al.,* 2012). La protéine MgtC pourrait agir en séquestrant et / ou en facilitant le transport de Mg^{2+} par des transporteurs spécifiques, tels que le transporteur de magnésium MgtB (Alix and Blanc-Potard, 2007). Cette hypothèse est soutenue par le fait que MgtB était retrouvé dans des expériences de pull-down visant à identifier les protéines interagissant avec MgtC (Lee *et al.,* 2013).

Les souches portant des mutations au niveau du gène *mgtC* sont défectives pour la croissance en milieu à très faible concentration de Mg^{2+} (10-20 µM) mais montrent une croissance normale pour une concentration supérieure à 50 µM (Alix and Blanc-Potard, 2007). La mutation MgtC W226A chez *S.* Typhimurium induit un défaut de croissance en milieu faiblement concentré en Mg^{2+}, mais n'affecte pas sa fonction dans les macrophages, suggérant que le résidu W226 serait spécifiquement impliqué dans la croissance en milieu carencé en Mg^{2+} (Rang *et al.,* 2007). Il est intéressant de noter que ce résidu est également conservé chez la bactérie *P. aeruginosa,* même si jusqu'ici aucune étude n'a été menée chez ce pathogène pour identifier les résidus importants dans la fonction de MgtC (figure 6).

3.1.4 Rôle de MgtC dans la virulence bactérienne et la survie intracellulaire

L'implication de MgtC dans la virulence bactérienne a été initialement décrite chez *S.* Typhimurium (Blanc-Potard and Groisman, 1997), puis d'autres études ont été menées chez plusieurs bactéries produisant des protéines homologues de MgtC. Le parallèle entre le défaut de croissance des mutants *mgtC* dans les macrophages et dans les milieux carencés en Mg^{2+} avait au départ suggéré que l'environnement faiblement concentré en Mg^{2+} des macrophages était la cause du défaut de réplication des mutants *mgtC*. Cette hypothèse fut confortée par le fait que l'addition de Mg^{2+} au milieu

de culture cellulaire restaurait partiellement le défaut de croissance des mutants *mgtC* de *S*. Typhimurium et *B. suis* dans les macrophages (Blanc-Potard and Groisman, 1997; Lavigne *et al.,* 2005). L'ajout de Mg^{2+} extracellulaire pourrait légèrement augmenter la concentration de Mg^{2+} intravacuolaire pour favoriser la croissance de mutants *mgtC*. Mais elle pourrait également affecter la physiologie des macrophages, favorisant ainsi la réplication des mutants *mgtC* (Alix and Blanc-Potard, 2007). De plus, le fait que le phagosome soit dépourvu de Mg^{2+} est assez controversé, puisque des mesures directes de la concentration en Mg^{2+} dans le phagosome ont montré que celle-ci était plutôt de l'ordre du millimolaire (Martin-Orozco *et al.,* 2006). D'autre part, la mutagénèse du gène *mgtC* de *Salmonella* a permis de caractériser un mutant MgtC à la position C99 qui empêche le rôle de MgtC dans les macrophages, sans affecter son rôle en milieu à faible concentration en Mg^{2+} (Rang *et al.,* 2007). Pris ensemble, ces résultats révèlent que le rôle de MgtC dans la croissance en milieu carencé en Mg^{2+} peut être dissocié de la survie intramacrophagique.

MgtC est retrouvé chez *M. tuberculosis*, agent responsable de la tuberculose. Bien que *M. tuberculosis* soit très différent de *S. enterica*, les deux pathogènes partagent en commun la capacité de proliférer dans l'environnement phagosomal des macrophages et pourraient même partager une stratégie commune de survie intraphagosomale. Le mutant résultant de l'inactivation de *mgtC* chez *M. tuberculosis,* est atténué dans un modèle d'infection de macrophages humains dérivés de monocytes ainsi que pour la croissance dans les poumons et rates issus de souris BALB/c (Buchmeier *et al.,* 2000). De plus, l'expression hétérologue de la protéine MgtC de *M*. *tuberculosis* dans un mutant *mgtC* de *S.* Typhimurium complémente partiellement le phénotype dans les macrophages et la croissance en milieu pauvre en Mg^{2+} (Alix *et al.,* 2006). On retrouve également MgtC chez une mycobactérie non tuberculeuse présentant une menace sérieuse pour les malades mucoviscidosiques, *Mycobacterium abcessus*. Cependant, bien qu'il y'ait une forte induction de MgtC lorsque la bactérie réside dans le macrophage, la délétion du gène n'induit qu'une légère diminution non significative de la croissance bactérienne dans le macrophage (Le Moigne *et al.,* 2016).

B. suis et *Y. pestis,* agents responsables respectivement de la brucellose et de la peste, possèdent également la capacité de survivre et de proliférer dans les phagosomes (Boschiroli *et al.,* 2001; Pujol and Bliska, 2003). Il a été montré dans un modèle d'infection cellulaire de macrophages J774, que les mutants *mgtC* étaient atténués pour la survie intramacrophagique (Grabenstein *et al.,* 2006; Lavigne *et al.,* 2005). De plus, la protéine MgtC de *Y. pestis* est capable de complémenter le mutant *mgtC* de *S*. Typhimurium dans les macrophages (Rang *et al.,* 2007).

Le gène *mgtC* a été identifié parmi les gènes requis pour la survie de *B*. *cenocepacia d*ans un modèle d'infection de rat (Hunt *et al.,* 2004). Tout comme *P. aeruginosa, B*. *cenocepacia* est une bactérie

environnementale associée aux infections nosocomiales et aux infections opportunistes chez les sujets atteints de mucoviscidose. Chez *B*. *cenocepacia* Le gène *mgtC* est également nécessaire pour la survie des bactéries dans les macrophages murins, et contrairement aux bactéries de type sauvage, le mutant *mgtC* est rapidement acheminé vers les lysosomes, suggérant que MgtC serait un facteur critique pour la survie intracellulaire de *B. cenocepacia* (Maloney and Valvano, 2006).

MgtC est important pour la survie intramacrophagique chez des pathogènes intracellulaires mais aussi chez des pathogènes extracellulaires avec une phase intracellulaire, comme *Y. pestis*. Par ailleurs, le rôle de MgtC a été récemment étudié chez deux pathogènes extracellulaires bien différents, *P. aeruginosa et Bordetella pertussis. B. pertussis* est l'agent de la coqueluche, ce pathogène historiquement considéré comme extracellulaire, une fois internalisé dans les cellules hôtes comme les neutrophiles, les macrophages ou les cellules épithéliales, a la capacité de survivre à l'intérieur. Un homologue de la protéine MgtC (BP0414) a été identifié chez ce pathogène. BP0414 est impliqué dans la survie de *B. pertussis* dans les macrophages et son rôle est principalement lié à l'adaptation de la bactérie à l'environnement acide retrouvé dans les phagosomes (Cafiero *et al.,* 2018). *P. aeruginosa,* sujet de mon étude, possède deux homologues de MgtC, PA4635 et PA2558, (Blanc-Potard and Lafay, 2003). Les données relatives au rôle de ces protéines chez *P. aeruginosa,* seront détaillées dans le paragraphe (3.1.6).

Les différentes observations concernant le rôle commun de MgtC dans la survie intramacrophagique de différents pathogènes, peuvent laisser supposer que d'autres bactéries produisant des protéines MgtC ont la capacité de survivre dans les macrophages. Par exemple, le génome de *Klebsiella pneumoniae* code pour une protéine très étroitement apparentée à la protéine MgtC de *Salmonella* (Blanc-Potard and Groisman, 1997). *K. pneumoniae* est un pathogène opportuniste largement considéré comme extracellulaire et pouvant survivre dans les macrophages (Cano *et al.,* 2015). On peut donc supposer que MgtC pourrait contribuer à la capacité de *K*. *pneumoniae* à résister à l'action des macrophages. On peut également supposer que la présence du gène *mgtC* dans le génome bactérien de *Bacillus cereus* jouerait un rôle similaire, étant donné que *B. cereus* est un pathogène humain, capable d'échapper aux macrophages après avoir été internalisé (Tran and Ramarao, 2013) (figure 7).

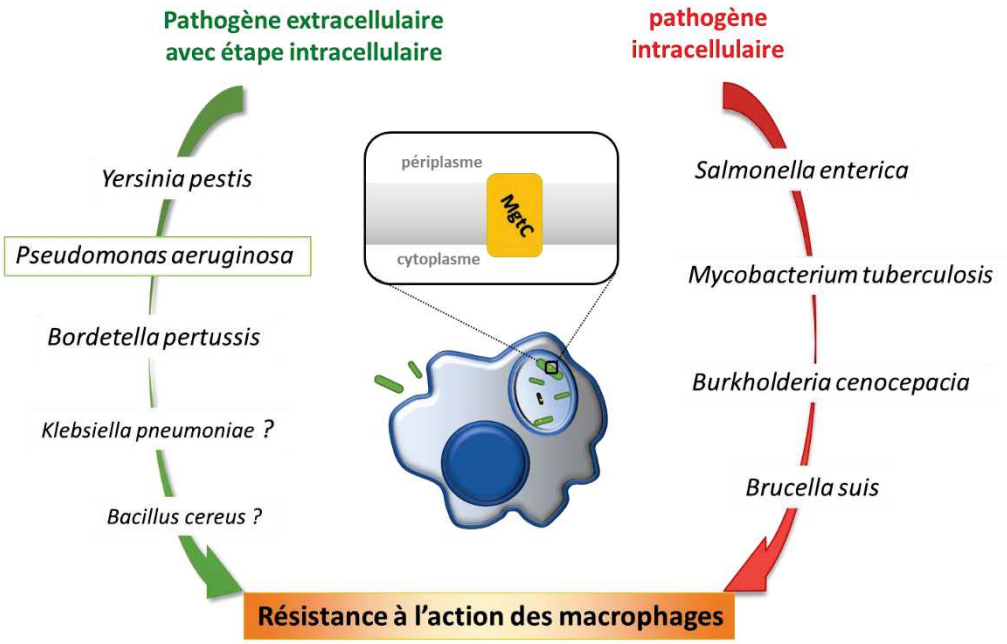


Figure 7. Implication de MgtC dans la survie intramacrophagique chez plusieurs pathogènes intracellulaires et extracellulaires. Adapté de (Belon and Blanc-Potard, 2016).

Cependant, certains pathogènes extracellulaires, comme *S. aureus*, peuvent résider dans les macrophages sans pour autant exprimer de *mgtC*. De plus, la présence de protéines similaires à MgtC chez des bactéries non pathogènes, pourrait être plutôt liée à la fonction adaptative de MgtC à la privation de Mg^{2+} (Belon and Blanc-Potard, 2016).

3.1.5 Fonction de la protéine MgtC: exemple chez *S.* Typhimurium

La fonction de MgtC n'a été largement étudiée que chez *S*. Typhimurium. MgtC est une protéine membranaire, qui chez *S.* Typhimurium permet le maintien de l'homéostasie énergétique en inhibant sa propre F_1F_0 ATP synthase lorsque la bactérie se retrouve dans un environnement hostile, comme lors d'une baisse de pH ou de Mg^{2+}. Cette fonction est cruciale, pas seulement pour maintenir le niveau d'ATP physiologique durant la croissance dans un milieu acide, mais aussi pour restaurer le niveau de Mg^{2+} intracellulaire (Lee *et al.,* 2013). Le Mg^{2+} est essentiel à l'assemblage des ribosomes et donc à la synthèse protéique. L'absorption de Mg^{2+} par les transporteurs de Mg^{2+}, MgtA et MgtB, et la baisse d'ATP favorisée par la protéine MgtC permet la formation de ribosomes fonctionnels, en plus faible nombre que lorsque la concentration en Mg^{2+} dans la bactérie est élevée (Pontes *et al.,* 2016). De plus, MgtC pourrait promouvoir l'activité d'ATPases de type P, telles que le transporteur de Mg^{2+} MgtB (Alix and Blanc-Potard, 2007). Ainsi, MgtA, MgtB (apport du Mg^{2+} dans la cellule) et MgtC (libération du Mg^{2+} des complexes ATP) permettent de maintenir l'homéostasie du Mg^{2+} cellulaire (Park *et al.,* 2018; Pontes *et al.,* 2016). Par ailleurs, il semblerait que l'interaction MgtC - F_1F_0 ATP synthase soit essentielle à la pathogénicité de *Salmonella*. MgtC se lie à la sous-unité F_0 *a* de la F_1F_0 ATP synthase, et le résidu

N92 de MgtC a été identifié comme nécessaire à cette interaction (Lee *et al.,* 2013). Ce même résidu est essentiel aux fonctions de croissance de *S*. Typhimurium en milieu carencé en Mg^{2+} et de survie dans les macrophages (Rang *et al.,* 2007) (figure 6). Il a été montré que l'effet de MgtC sur l'ATP synthase jouait un rôle dans la virulence bactérienne. En effet, en abaissant le niveau d'ATP, MgtC réprime la biosynthèse de cellulose, le composant structurel majeur des biofilms de *Salmonella.* Il a été montré que MgtC empêchait l'expression du gène de la cellulose synthase *bcsA* ainsi que l'augmentation du diguanylate cyclique (c-di-GMP), un second messager qui favorise la formation de biofilm chez les bactéries. Par ailleurs, empêcher la synthèse de cellulose augmenterait la virulence de *Salmonella* dans les macrophages (Pontes *et al.,* 2015).

Très récemment, un nouveau rôle de MgtC en relation avec l'acquisition de phosphate au cours de l'infection des macrophages a été mis en lumière. Durant l'infection, MgtC ciblerait l'histidine kinase PhoR activant ainsi la transcription de gènes impliqués dans le transport de phosphate. Ainsi, l'action de MgtC envers PhoR permet à *Salmonella* d'assurer l'absorption de phosphate, qui par ailleurs, semble être critique pour une virulence normale de *Salmonella* (Choi *et al.,* 2019) (figure 8).

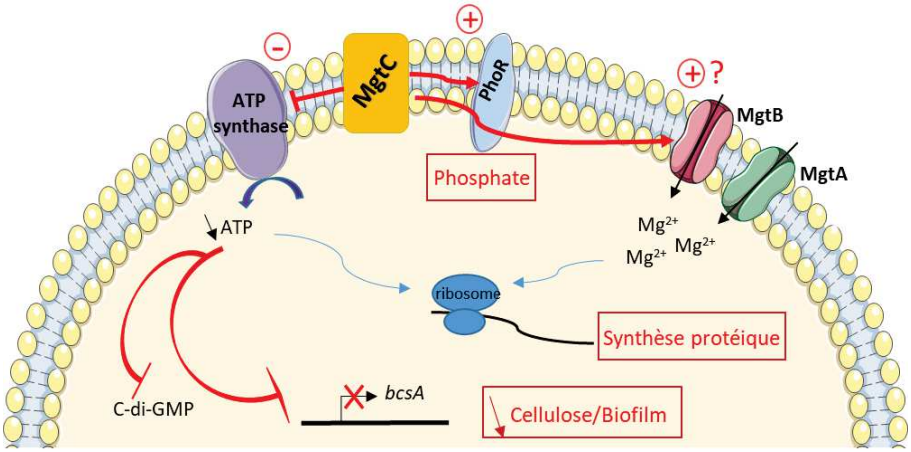


Figure 8. Différentes fonctions de MgtC chez *S*. Typhimurium.

3.1.6 Rôle de MgtC chez le pathogène extracellulaire *P. aeruginosa*

Bien que *P. aeruginosa* soit considéré comme un pathogène extracellulaire, qui échappe à la phagocytose et montre une forte cytotoxicité envers les cellules phagocytaires, il a été montré que *P. aeruginosa* pouvait être internalisé par les macrophages dans un modèle animal (Belon *et al.,* 2015; Brannon *et al.,* 2009; Cafora *et al.,* 2019). Par ailleurs, il a été proposé que la bactérie puisse avoir une phase intracellulaire dans les cellules épithéliales aériennes durant la phase aiguë de l'infection (Garcia-Medina *et al.,* 2005; Sana *et al.,* 2012).

P. aeruginosa possède deux protéines homologues MgtC, toutes deux appartenant au sous-groupe I de l'arbre phylogénétique représenté par la figure 6, la protéine PA4635 référée comme MgtC et la

protéine PA2558 (Blanc-Potard and Lafay, 2003). Des expériences de complémentation hétérologue ont été réalisées avec les deux gènes, *PA4635* et *PA2558* de *P. aeruginosa* dans un mutant *mgtC* de *S*. Typhimurium. Il se trouve qu'aucun des 2 gènes ne complémente le phénotype du mutant dans les macrophages. Cependant, la substitution d'un seul résidu de PA4635 (E112N) permet une augmentation significative de la capacité de la protéine PA4635 mutée à complémenter le mutant *mgtC* de *S*. Typhimurium dans les macrophages. De plus *PA4635*, mais pas *PA2558*, complémente le mutant *mgtC* de *S*. Typhimurium pour la croissance en milieu carencé en Mg^{2+} (Rang *et al.,* 2007), ce qui montre que la protéine MgtC (PA4635) de *P. aeruginosa* est proche de MgtC de *S*. Typhimurium.

Une étude du laboratoire a permis de mettre en évidence l'importance du facteur de virulence MgtC dans la survie intramacrophagique chez cette bactérie décrite comme extracellulaire. De plus, il a été montré que *mgtC* de *P. aeruginosa* (*PA4635*) était fortement induit dans les macrophages et l'acidité phagosomale favorisait cette expression (Belon *et al.,* 2015). Pour étudier le rôle de MgtC chez *P. aeruginosa in vivo*, l'équipe a utilisé le modèle d'embryon de poisson-zèbre (*Danio rerio*). Leurs résultats montrent que le mutant *mgtC* est atténué durant l'infection aiguë des embryons de poisson-zèbre. MgtC semble agir en protégeant *P. aeruginosa* contre l'action des macrophages, étant donné que la déplétion des macrophages via l'utilisation de morpholino (*pu.1* morpholino) chez l'embryon, supprime la différence entre le mutant *mgtC* et la souche sauvage. Cette hypothèse est soutenue par les expériences *ex-vivo* montrant que le mutant *mgtC* était plus sensible à l'action bactéricide des macrophages J774, que la souche sauvage dans les macrophages en culture (Belon *et al.,* 2015).

Chez *P. aeruginosa,* la matrice du biofilm est formée essentiellement d'EPS, tandis qu'elle est formée de cellulose chez *Salmonella*. L'étude du laboratoire a montré que le mutant *mgtC* de *P. aeruginosa* formait plus de biofilm, et produisait plus d'EPS dans des conditions limitantes en Mg^{2+} (figure 9)(Belon *et al.,* 2015). Sur la base des résultats obtenus chez *Salmonella*, le phénotype du mutant *mgtC* de *P. aeruginosa* pourrait être en lien avec la production d'EPS. Cette hypothèse a été testée dans l'article (1).

En conclusion, MgtC semble donc avoir une fonction au moins en partie conservée chez les pathogènes intracellulaires et *P. aeruginosa.*

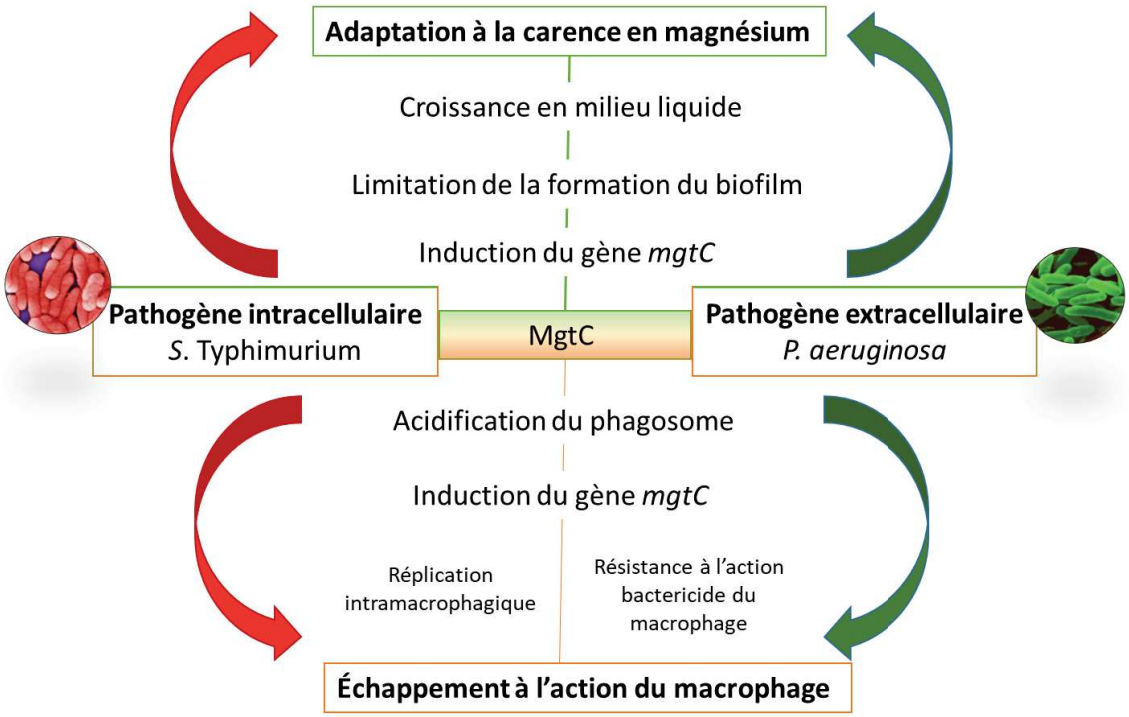


Figure 9. Double rôle de MgtC dans les environnements extracellulaires et intracellulaires, chez les bactéries, *S.* Typhimurium et *P. aeruginosa*. Adapté de (Belon *et al.,* 2015).

3.1.7 Régulation de MgtC : exemple chez *S.* Typhimurium

Dans cette partie seront détaillées les connaissances actuelles concernant la régulation de MgtC, qui a été étudiée en détail chez *S.* Typhimurium. MgtC est régulé à de multiples niveaux, aussi bien transcriptionnels, post-transcriptionnels et post-traductionnels.

3.1.7.1 Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de MgtC

L'initiation de la transcription de l'opéron *mgtCBR* est contrôlée par le système à deux composants PhoP-PhoQ (Soncini *et al.,* 1996), qui joue le rôle de senseur de l'environnement bactérien. Le système PhoPQ constitue une cascade de transduction de signal composée de la kinase PhoQ liée à la membrane et du régulateur de réponse cytosolique PhoP. L'activation de la kinase PhoQ suite à une diminution du Mg^{2+}, un pH acide ou la présence de peptides antimicrobiens, conduit à la phosphorylation de PhoP, qui induit la transcription d'un grand nombre de gènes (Prost and Miller, 2008), dont l'opéron *mgtCBR.*

L'élongation de la transcription dans la région codante est contrôlée par la région leader, qui peut adopter des structures secondaires en tige-boucle en fonction du couplage ou découplage de la transcription du leader *mgtCBR* et de la traduction de deux cadres de lecture (ORF) courts *mgtM* et *mgtP*. Les structures secondaires qui se forment sont déterminées par les niveaux cytoplasmiques d'ATP (*mgtM*) et de proline (*mgtP*). Lorsque le niveau d'ATP est élevé et/ou que le niveau de proline

est bas, la structure tige-boucle formée permettra l'expression de l'opéron *mgtCBR.* Ces deux facteurs semblent avoir un effet indépendant et additif sur l'ARNm leader (Lee and Groisman, 2012; Park *et al.,* 2018). Durant l'infection, l'acidification du phagosome crée un gradient de proton à travers la membrane interne bactérienne et stimule la synthèse d'ATP. En même temps, le stress hyper osmotique diminue le taux de proline cellulaire, permettant une expression élevée de *mgtC* dans les macrophages (Park *et al.,* 2018).

L'activation du système PhoPQ induit également la transcription d'une région intergénique située entre les gènes *mgtC* et *mgtB,* qui code pour un ARN antisens, *AmgR.* Ce dernier induit la dégradation de l'ARNm *mgtC* (Lee and Groisman, 2010) (figure 10).

3.1.7.2 Régulation post-traductionnelle de MgtC

Au niveau post-traductionnel, la protéine MgtC est régulée par deux facteurs, MgtR et CigR. Le peptide MgtR, coproduit par le même opéron que MgtC, interagit directement avec MgtC et induit sa dégradation (Alix and Blanc-Potard, 2008). Cette partie importante dans le cadre de mon travail fera l'objet d'une description détaillée dans le chapitre suivant.

Un deuxième facteur impliqué dans la régulation post-traductionnelle de MgtC a été décrit récemment, il s'agit de la protéine antivirulence CigR, qui est impliquée dans la séquestration de MgtC (Yeom *et al.,* 2018). Comme *mgtC*, le gène *cigR* est localisé au niveau de l'ilot de pathogénicité SPI-3 (Blanc-Potard *et al.,* 1999). Il a été proposé que *cigR* fasse partie du même opéron que *mgtC,* mais contrairement à *mgtR* et *amgR* dont la transcription est activée par PhoP, *cigR* peut être également transcrit de manière indépendante. CigR est localisé au niveau de la membrane interne de *Salmonella*. Des expériences de double hybride bactérien et de pull-down ont permis de montrer que la protéine CigR interagissait directement avec MgtC, et le résidu N92 impliqué dans l'interaction de MgtC avec la F_1F_0 ATP synthase, était également impliqué dans l'interaction de CigR avec MgtC. Ainsi CigR restreint la virulence de MgtC en empêchant son interaction avec la F_1F_0 ATP synthase (Yeom *et al.,* 2018).

En résumé*, Salmonella* limite la quantité de protéines MgtC, au niveau post-traductionnel, en produisant le peptide MgtR qui favorise la protéolyse de MgtC, et la protéine CigR qui séquestre la protéine (Choi *et al.,* 2019) (figure 10).

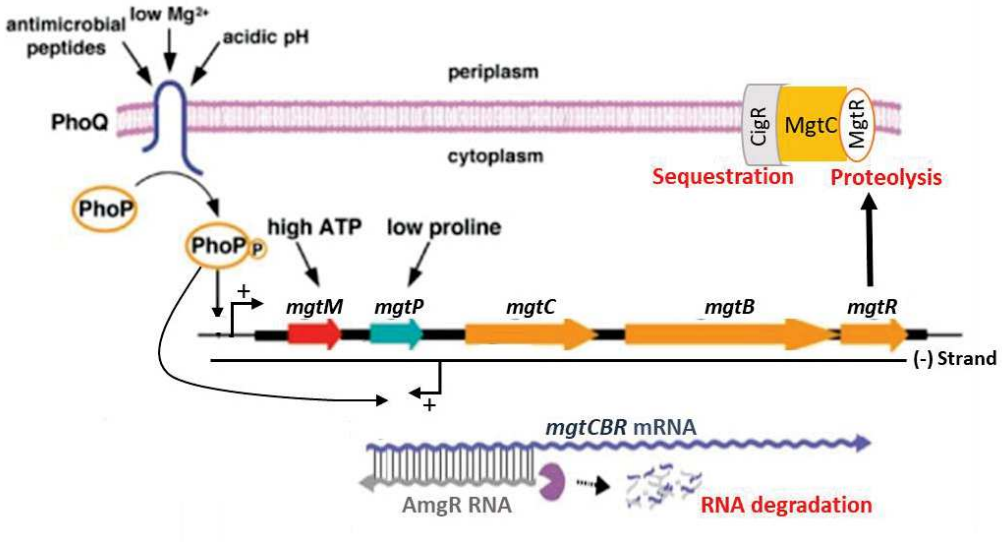


Figure 10. Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de MgtC.
Adapté de (Lee and Groisman, 2010; Lee and Lee, 2015).

3.1.8 MgtR : peptide antagoniste du facteur de virulence MgtC

3.1.8.1 Découverte et caractérisation du peptide MgtR chez *S.* Typhimurium

Chez *S*. Typhimurium, l'expression de *mgtC* est fortement induite dans un milieu pauvre en Mg^{2+} et la protéine est rapidement détectable après induction. Mais il était surprenant de constater que la protéine MgtC n'était plus détectée après un long moment d'induction, alors que la protéine MgtB, produite par le même opéron *mgtCB*, restait largement détectable. Une étude précise (Alix and Blanc-Potard, 2008) a montré que la région 3' du gène *mgtB* régule négativement l'expression de *mgtC*. Cette région en aval de *mgtB* code pour une petite ORF de 30 aa appelée MgtR. Par ailleurs, des expériences de RT-PCR ont montré que *mgtR* était exprimé dans les mêmes conditions de carence en Mg^{2+} que *mgtC,* et que *mgtR* faisait partie de l'opéron *mgtCB* (Alix and Blanc-Potard, 2008).

MgtR est un peptide de la membrane interne de 3.5 kDa, composé d'un seul domaine transmembranaire, hautement hydrophobe, structuré en hélice α avec une courte extrémité N-terminale cytoplasmique et une courte extrémité C-terminale périplasmique (Alix and Blanc-Potard, 2008) (Figure 11).

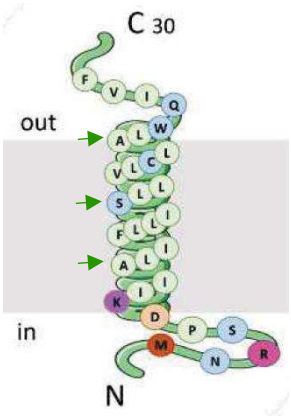


Figure 11. Séquence en acides aminés du peptide MgtR. Les flèches désignent les résidus constituant un motif Ala-coil (A10, S17, A24) décrit ci-après.

3.1.8.2 Mécanisme d'action de MgtR

L'approche de double hybride bactérien a permis de mettre en évidence l'interaction de MgtR et MgtC de *S*. Typhimurium. MgtR ainsi que le domaine TM4 de MgtC possèdent un motif Ala-coil caractérisé par 3 petits résidus dans une répétition d'heptades (Alix and Blanc-Potard, 2008). Ce motif a été décrit dans l'association d'hélices enchâssées dans la membrane (Walters and DeGrado, 2006). Le motif Ala-coil de MgtR est essentiel à l'interaction MgtC-MgtR, et les mutations A10L, S17I ou A24L abolissent complètement sa fonction de régulation et son interaction avec MgtC (Alix and Blanc-Potard, 2008). MgtR est uniquement présent chez la bactérie *S*. Typhimurium et une étude structurale basée sur l'utilisation de la résonance magnétique nucléaire (RMN) et le TM4 de la protéine MgtC de *M. tuberculosis* a montré que MgtR de *S*. Typhimurium interagissait directement avec le domaine TM4 de la protéine MgtC (Jean-Francois *et al.,* 2014).

L'interaction de MgtR avec MgtC pourrait avoir un double effet sur la protéine MgtC: (1) MgtR pourrait induire la dégradation de MgtC, et/ou (2) empêcher l'interaction protéine-protéine de MgtC (figure 12) (Belon *et al.,* 2016).

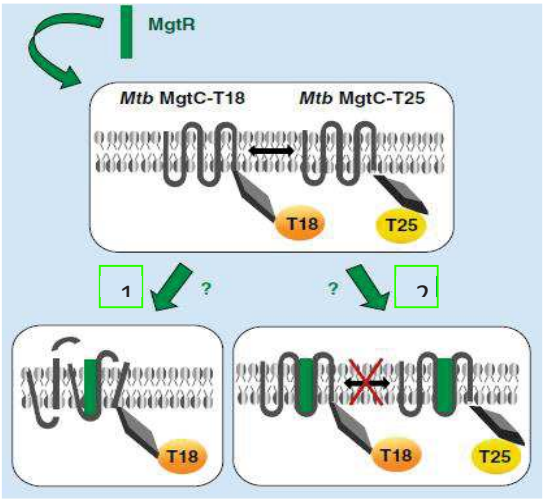


Figure 12. Double effet du peptide MgtR sur la protéine MgtC : (1) MgtR pourrait avoir un effet sur la stabilité de MgtC, (2) ou un effet sur la dimérisation de la protéine. Afin de montrer l'effet de MgtR sur la dimérisation de MgtC, les protéines MgtC ont été fusionnées aux fragments T18 ou T25 de l'adénylate cyclase. En cas de dimérisation, cette dernière devient fonctionnelle et son activité peut être mesurée. Ces expériences ont montré une réduction de la formation de dimères MgtC de Mtb (*M. tuberculosis*) suite à l'ajout de MgtR. D'après (Belon *et al.,* 2016).

(1) Bien que le mécanisme sous-jacent à cette dégradation de MgtC suite à son interaction avec MgtR reste mal connu, l'interaction des deux molécules pourrait induire une modification de la conformation de MgtC et faciliter son accessibilité à la FtsH (Alix and Blanc-Potard, 2008). FtsH est une protéase membranaire essentielle qui joue un rôle clé de contrôle de qualité, en dégradant les protéines membranaires mal repliées et endommagées des bactéries (Dalbey *et al.,* 2012). C'est l'utilisation d'un mutant *ftsH* thermosensible chez *E.coli* qui a permis de montrer en présence de MgtR, l'implication de la FtsH dans la régulation de MgtC (Figure 13) (Alix and Blanc-Potard, 2008).

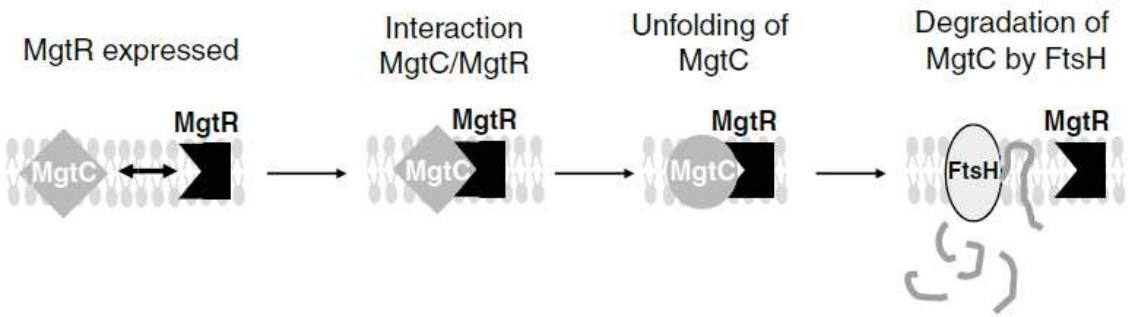


Figure 13. Effet de MgtR sur la stabilité de la protéine MgtC médié par la protéase FtsH, d'après (Alix and Blanc-Potard, 2008).

Au niveau de la protéine MgtC, les mutations E84A, G85A et N92T regroupés dans la boucle cytoplasmique entre le troisième et le quatrième domaine transmembranaire (TM3 et TM4), rendent la protéine résistante à la dégradation médiée par MgtR (Alix and Blanc-Potard, 2008). Le résidu W226 (domaine cytoplasmique) semble critique pour protéger la protéine de la protéolyse par la FtsH (Baek *et al.,* 2018). La substitution du W226 par les acides aminés A, G ou Y favorise la dégradation de MgtC par la FtsH. A l'inverse, la substitution du W226 par des acides aminés larges et hydrophobes protège la protéine de la protéolyse. Ces données indiquent qu'une chaine latérale large et hydrophobe, à la

position 226 de MgtC, est essentielle pour protéger la protéine de la dégradation par la FtsH (Baek *et al.,* 2018) (figure 14).

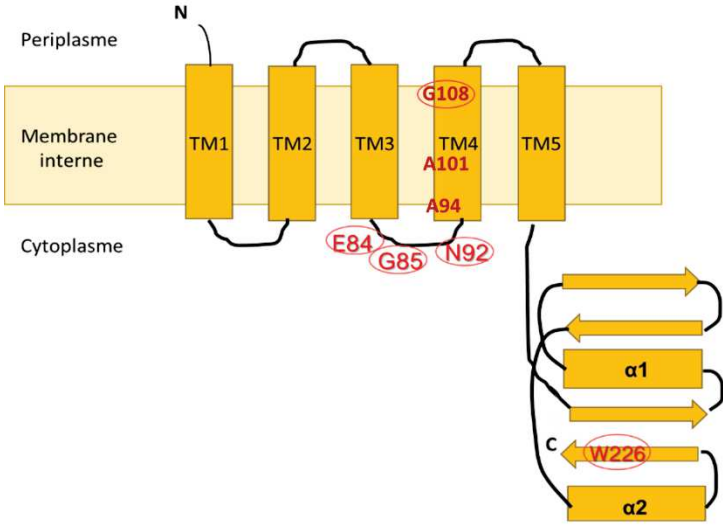


Figure 14. Topologie de la protéine MgtC montrant le motif Ala-coil (TM4) et les résidus entourés essentiels à l'interaction avec MgtR.

(2) Outre l'effet sur la stabilité de MgtC, MgtR pourrait également interférer dans l'interaction protéine-protéine de MgtC (dimérisation ou interaction avec d'autres protéines) (Belon *et al.,* 2016). En effet, il a été montré que la protéine MgtC de *M. tuberculosis* pouvait former un dimère (Yang *et al.,* 2012). Afin d'évaluer l'effet de MgtR sur la dimérisation de MgtC, un peptide synthétique MgtR a été ajouté à différentes concentrations, dans un système de double hybride bactérien (figure 12). Les résultats ont montré que MgtR pouvait effectivement interférer avec la dimérisation de MgtC de *M. tuberculosis* (Belon *et al.,* 2016).

3.1.8.3 MgtR comme candidat antivirulence

La surexpression de *mgtR* chez la souche sauvage de *S*. Typhimurium réduit significativement sa capacité à se multiplier dans les macrophages, démontrant ainsi un potentiel anti-infectieux intéressant de MgtR (Alix and Blanc-Potard, 2008).

Comme indiqué précédemment, MgtR est uniquement présent chez le pathogène *S*. Typhimurium, et n'est pas retrouvé chez les autres espèces codant pour MgtC (Alix and Blanc-Potard, 2008). Afin d'évaluer l'effet biologique de l'expression ectopique de *mgtR* chez les mycobactéries, le gène *mgtR* de *Salmonella* a été exprimé chez *M. bovis* BCG, cette dernière possédant une protéine MgtC identique à celle de *M. tuberculosis.* Les bactéries *M. bovis* BCG exprimant le gène *mgtR* montrent une diminution significative de la multiplication bactérienne dans les macrophages J774. Par contre, il n'y pas de différence de croissance en milieu pauvre en Mg^{2+} entre les souches exprimant *mgtR* et les souches sauvages, suggérant que MgtR interfèrerait avec la fonction de MgtC dans les macrophages mais pas dans l'environnement faible en Mg^{2+} (Belon *et al.,* 2016).

L'effet de MgtR a également été testé chez *P. aeruginosa*. Le domaine TM4 de MgtC est très bien conservé entre *S*. Typhimurium et *P. aeruginosa,* et les expériences dans un système de double hybride bactérien ont montré que le peptide MgtR de *S*. Typhimurium pouvait interagir avec la protéine MgtC de *P. aeruginosa* (Belon *et al.,* 2015). Le gène *mgtR* de *S.* Typhimurium a alors été exprimé de manière ectopique chez *P. aeruginosa* et la production hétérologue du peptide MgtR diminue la survie de *P. aeruginosa* dans un modèle d'infection cellulaire de macrophages J774 (figure 15. A). Dans un modèle d'infection animal d'embryon de poisson-zèbre, une souche de *P. aeruginosa* PAO1 exprimant *mgtR* a une virulence significativement diminuée comparée au contrôle (figure 15. B). L'effet de MgtR semble être lié à son action sur MgtC, étant donné l'absence d'effet de MgtR sur le mutant *mgtC* (Belon *et al.,* 2015).

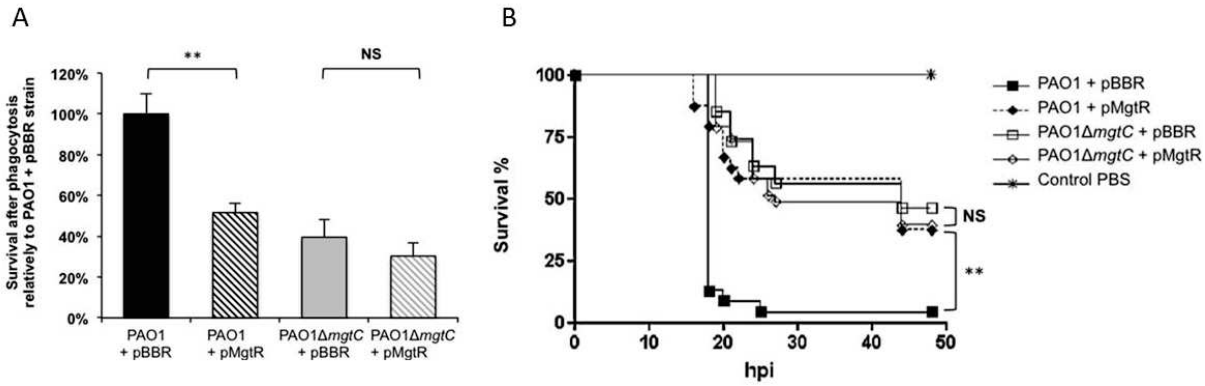


Figure 15. Phénotypes des souches PAO1 exprimant *mgtR*. Infection des macrophages (A) ou des embryons de poisson-zèbre (B), par les souches PAO1 et le mutant *mgtC* surexprimant *mgtR* ou non. pBBR est le plasmide utilisé pour transformer les bactéries. D'après (Belon *et al.,* 2015).

Ces travaux soutiennent le fait que MgtR puisse être utilisé comme outil antivirulence chez plusieurs pathogènes exprimant *mgtC* et ouvre la voie à une nouvelle stratégie thérapeutique basée sur l'utilisation de peptides régulateurs tels que MgtR. Cet aspect fera l'objet d'une étude lors de ma thèse (Article 1).

3.2 Le facteur de virulence OprF

OprF fait partie de la famille des porines OmpA, qui sont des protéines abondantes chez les entérobactéries et présentent une multitude de fonctions. Leur rôle dans la pathogenèse des bactéries a émergé il y a seulement une dizaine d'années (Krishnan and Prasadarao, 2012). Dans ce chapitre je m'intéresserai uniquement au rôle d'OprF chez *P. aeruginosa*, en décrivant ses caractéristiques structurelles et sa fonction de porine, ainsi que son rôle dans la pathogénie de *P. aeruginosa.*

3.2.1 Description d'OprF

OprF, initialement désignée comme la protéine F, est une protéine abondante de la membrane externe de *P. aeruginosa,* avec un nombre allant de 100.000 à 300.000 par cellule. Cette porine permet le passage non spécifique à travers la membrane externe de petits nutriments polaires et de particules ioniques pouvant atteindre une taille de 3 kDa (Cassin and Tseng, 2019).

La protéine OprF existe sous deux conformations différentes, la conformation majoritaire (95%) qui correspond à une conformation fermée, formée de deux domaines, le domaine N-terminal formé de 8 brins de feuillets β antiparallèles, et d'un domaine C-terminal périplasmique globuleux formé majoritairement d'hélices α. Cet état conformationnel joue un rôle structural important, puisqu'il sert d'ancrage de la membrane externe dans la couche de peptidoglycane. La conformation minoritaire d'OprF (5%) se présente sous la forme d'un seul domaine de feuillet β avec environ 14 brins. Cette forme ouverte de la protéine OprF peut s'oligomériser (Nestorovich *et al.,* 2006; Sugawara *et al.,* 2006) (figure 16).

Il a été montré que le changement de conformation d'OprF d'un état fermé à un état ouvert, chez diverses espèces de *Pseudomonas* répondait aux variations de température (Jaouen *et al.,* 2004). Chez *S*. Typhimurium, la protéine homologue d'OprF affiche des changements dynamiques de conformation en présence d'oxygène réactif. Celle-ci se convertit rapidement en conformation fermée, réduisant l'apport en oxydant et minimisant les dommages (van der Heijden *et al.,* 2016). Ces données suggèrent que les bactéries peuvent répondre à leur environnement en modifiant la conformation de leurs protéines homologues d'OprF.

3.2.2 Rôle d'OprF dans la virulence de *P. aeruginosa*

Plusieurs études ont montré qu'OprF était impliqué dans plusieurs processus pathogéniques, incluant l'adhésion des bactéries aux cellules de l'hôte, l'expression de molécules dépendant du QS, ainsi que des effecteurs du SST3 et la formation de biofilm (Azghani *et al.,* 2002). Par ailleurs, OprF a été décrit comme important dans la virulence de *P. aeruginosa* dans des modèles cellulaires (Fito-Boncompte *et al.,* 2011; Mittal *et al.,* 2016a) ainsi que dans des modèles *in vivo* (Fito-Boncompte *et al.,* 2011).

Dans cette partie seront détaillées ces différentes fonctionnalités, permettant de mieux comprendre l'implication de cette protéine de la membrane externe dans le processus infectieux de *P. aeruginosa* (figure 16).

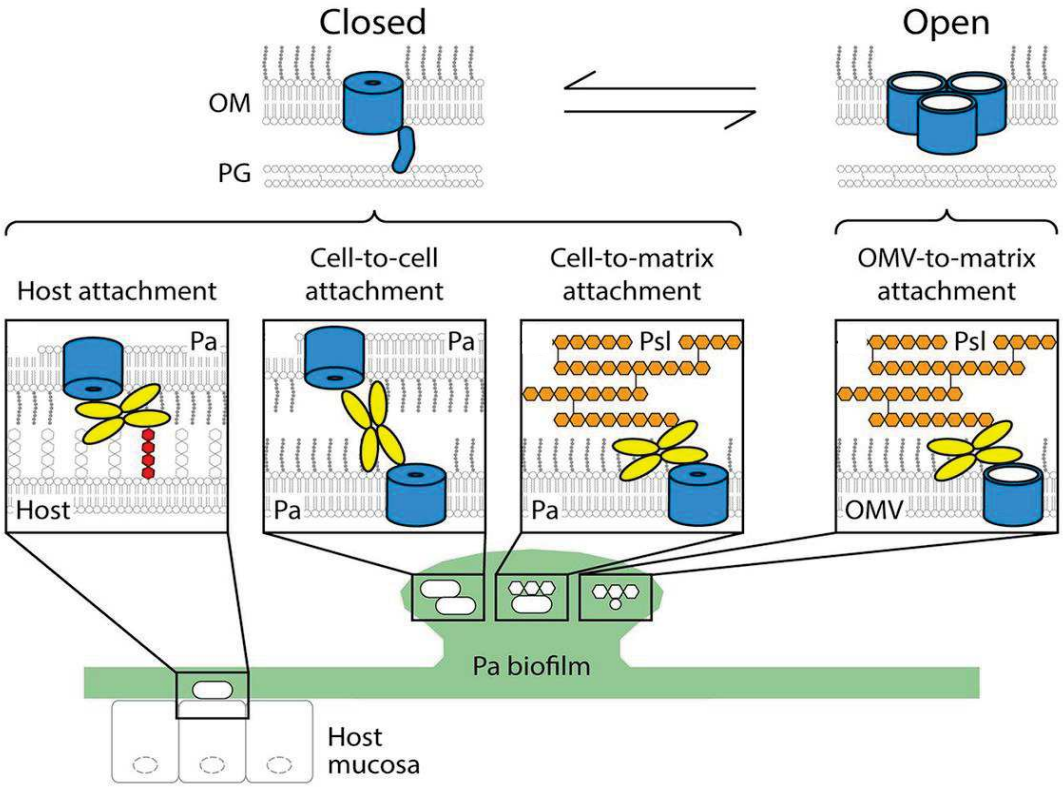


Figure 16. Modèle des fonctions d'OprF dans l'adhérence cellulaire et le biofilm. Lors de l'association des cellules, OprF (bleu) adopte majoritairement une conformation fermée (gauche). La conformation ouverte est minoritaire (droite). L'interaction d'OprF avec la lectine LecB (tétramère jaune) chez *P. aeruginosa* (Pa) joue différents rôles. D'après (Cassin and Tseng, 2019).

3.2.2.1 La formation des vésicules membranaires

Les vésicules membranaires (VMs) sont des sphères de 50-300 nm formées de la membrane externe, elles sont produites par les bactéries gram-négatif et sont impliquées dans la communication cellulaire, la délivrance de facteurs de virulence et l'évasion de la réponse immunitaire de l'hôte. *P. aeruginosa* peut produire des VMs à la fois à l'état de cellule planctonique ou à l'état de biofilm, mais la quantité de vésicules et la teneur en protéines varient selon le mode de vie de la bactérie (Schwechheimer and Kuehn, 2015). Certaines protéines de la membrane externe sont particulièrement enrichies dans les VMs tandis que d'autres en sont totalement exclues. OprF est particulièrement abondant dans les VMs (Couto *et al.,* 2015). Il a été proposé qu'OprF puisse jouer un rôle dans la formation de ces vésicules lipidiques. Dans la mesure où la forme fermée de la protéine s'associe au peptidoglycane mais pas la forme ouverte, la conversion d'OprF à l'état ouvert pourrait favoriser la biogenèse des VMs en diminuant les interactions avec l'enveloppe. Cette hypothèse est soutenue par le fait qu'une autre protéine de la membrane externe, Oprl, inhibe la formation des VMs en formant des ponts covalents avec le peptidoglycane (Cassin and Tseng, 2019). Par ailleurs, il a été montré qu'OprF impactait sur la formation des VMs en modulant le taux de PQS (*Pseudomonas* quinolone signal), ce dernier étant critique pour la production des VMs (Schertzer and Whiteley, 2012).

3.2.2.2 OprF et biofilm

Les analyses protéomiques de *P. aeruginosa* avaient révélé la présence d'OprF dans la matrice de biofilm (Couto *et al.,* 2015; Yoon *et al.,* 2002). Dans des conditions de culture mimant l'environnement pulmonaire mucovicidosique, il a été montré qu'OprF était fortement produit et nécessaire à la formation des microcolonies (Sriramulu *et al.,* 2005). Le mutant *oprF* montrait une production d'EPS 5 fois plus importante que celle de la souche sauvage et la complémentation du mutant restaurait le niveau bas d'EPS. Ceci est en accord avec la contribution des EPS à la formation de biofilm (Bouffartigues *et al.,* 2015). Enfin, cette étude a montré que l'augmentation du biofilm chez le mutant *oprF* était due à la surproduction de Pel mais pas de Psl (les EPS majeures de la matrice du biofilm chez la souche PAO1 de *P. aeruginosa*), ainsi qu'à l'augmentation du niveau de c-di-GMP qui stimule l'expression de ces EPS. Fait important, la réduction artificielle du c-di-GMP dans le mutant *oprF* permet la restauration de la production de polysaccharides et la formation de biofilm à un niveau correspondant à celui de la souche sauvage. Ces observations montrent qu'OprF est impliqué dans la formation de biofilm via la modulation du taux de c-di-GMP (Bouffartigues *et al.,* 2015).

3.2.2.3 Modulation de l'expression du système de sécrétion de type III

Le SST3 est responsable de la translocation de facteurs de virulence dans les cellules eucaryotes. Dans les conditions d'induction de sécrétion des effecteurs du SST3, ExoS et ExoT ne sont pas secrétés dans le mutant *oprF.* Ces résultats montrant que l'activité du T3SS est altérée en absence d'OprF. Une grande partie de la régulation du SST3 se fait sous le contrôle du facteur transcriptionnel ExsA. Afin de tester si l'effet d'OprF sur le SST3 se fait via ExsA, les souches de *P. aeruginosa* ont été mises en culture dans des conditions inductrices de SST3 et d'*exsA.* La quantité d'ExoS secrétée par le mutant *oprF* dans des conditions inductrices d'*exsA* est restée inférieure à celle de la souche parentale sauvage, suggérant que les gènes codant pour le SST3 et ses effecteurs soient sous-exprimés dans le mutant *oprF* indépendamment du facteur ExsA (Fito-Boncompte *et al.,* 2011).

3.2.2.4 Rôle dans l'adhérence cellulaire

L'implication d'OprF dans la virulence et les phénotypes associés est au moins en partie liée à l'adhérence des bactéries aux cellules. Différents modèles cellulaires ont été utilisés afin d'étudier le rôle d'OprF dans l'adhérence aux cellules. Le mutant *oprF* de *P. aeruginosa* possède un potentiel d'adhérence considérablement réduit par rapport à celui de la souche sauvage *P. aeruginosa* sur les cellules gliales de rat et les cellules d'adénocarcinome humain Caco-2 / TC7 (Fito-Boncompte *et al.,* 2011), ainsi que sur les cellules épithéliales alvéolaires. De plus, la pré-incubation de ces dernières avec une protéine OprF purifiée réduit également l'attachement des bactéries (Azghani *et al.,* 2002). Par ailleurs, il a été observé chez une souche de *P. aeruginosa* impliquée dans les otites moyennes, l'activation de la PKC (Protéine kinase C) lors de l'invasion des cellules épithéliales de l'oreille humaine, cette activation semble être dépendante de l'expression d'OprF. La PKC étant impliquée dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, son activation permettrait à *P. aeruginosa* l'invasion des cellules épithéliales (Mittal *et al.,* 2016b).

Cette capacité d'adhérence d'OprF pourrait faciliter les interactions de *Pseudomonas* avec l'épithélium, incluant la colonisation de l'épithélium des voies respiratoires et l'initiation d'une infection pulmonaire (Azghani *et al.,* 2002).

3.2.2.5 Rôle avec les molécules du quorum sensing

Le QS déclenche la production de plusieurs facteurs de virulence chez *P. aeruginosa* (Williams and Cámara, 2009). Parmi les plus importants facteurs de virulence dépendants du QS, on trouve l'élastase LasB, la pyocyanine, la lectine PA-1L et l'exotoxine A. LasB est une métalloprotéinase élastolytique extracellulaire impliquée dans la dégradation des membranes des cellules hôtes. La pyocyanine contribue à l'atteinte tissulaire et peut induire une physiopathologie pulmonaire chez la souris. La

lectine PA-1L est impliquée dans les lésions pulmonaires induites par *P. aeruginosa*. L'exotoxine A est une toxine létale qui inhibe la synthèse des protéines dans les cellules mammifères. Une forte diminution dans la production de ces molécules du QS a été observée chez le mutant *oprF* de *P. aeruginosa* H636 (fond génétique PAO1), ce qui expliquerait en partie la diminution de la toxicité du mutant *oprF* dans les modèles d'infection (Fito-Boncompte *et al.,* 2011). A l'inverse, un mutant *oprF* dans une souche de *P. aeruginosa* (PA14) produit un taux plus élevé de PQS (*Pseudomonas* Quinolone Signal), une autre molécule du QS (Wessel *et al.,* 2013), suggérant que le rôle d'OprF dans la production de molécules du QS pourrait être souche dépendant.

3.2.2.6 Rôle avec le complément

Le complément est une voie hautement conservée du système immunitaire inné. Il constitue un mécanisme essentiel pour la reconnaissance et la destruction des potentiels pathogènes envahisseurs. Une part importante du rôle du complément dans ce processus est la reconnaissance par les phagocytes des composants du complément, en particulier le C3 (Brown, 2005). La conversion du C3 en C3a et C3b est l'un des premiers événements de la cascade du complément. Le C3b se lie généralement à une ou plusieurs molécules à la surface du pathogène et induit la reconnaissance de ce dernier par les cellules phagocytaires, et OprF a été identifiée comme l'une des molécules reconnues par le C3b (Mishra *et al.,* 2015). Le mutant *oprF* de *P. aeruginosa* présente une réduction du dépôt de C3 à la surface et une faible internalisation par les neutrophiles après opsonisation comparé au type sauvage. Par ailleurs, il a été montré que le Psl extracellulaire pourrait restreindre l'accessibilité d'OprF au système du complément. Puisque les anticorps anti-OprF se lient plus abondamment à la surface du mutant *psl* comparé à la souche sauvage (Mishra *et al.,* 2015). De plus, le dépôt des composants du complément C3, C5 et C7, est significativement plus élevé sur les mutants *psl* que sur la souche sauvage, suggérant une accessibilité plus importante d'OprF au système du complément, ce qui favoriserait la phagocytose et l'élimination de la bactérie par les neutrophiles et les macrophages (Mishra *et al.,* 2012).

3.2.3 Rôle d'OprF dans la virulence bactérienne et la survie intracellulaire

En dépit des multiples fonctions d'OprF et de son évidente implication dans le processus infectieux, une seule étude a été menée dans deux modèles d'infection *in vivo*, l'endive belge (*Cichorium intylus*) et le nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). La souche sauvage de *P. aeruginosa* H103 (fond génétique PAO1) inoculée dans la nervure moyenne de la plante, cause une nécrose significative au niveau des feuilles d'endive belge, alors que le mutant *oprF* ne cause qu'une nécrose limitée, et la complémentation du mutant restaure sa virulence dans la plante. *P. aeruginosa* est un pathogène

mortel pour le ver *C. elegans.* Dans ce second modèle d'infection, l'étude a également montré que le mutant *oprF* était atténué, ne provoquant qu'un faible taux de mortalité au sein de l'échantillon. Le défaut de virulence du mutant ne peut être attribué à un défaut de croissance ou de viabilité de la bactérie, vu que le nombre de cellules viables était similaire entre les souches dans le milieu d'incubation des nématodes (Fito-Boncompte *et al.,* 2011).

Afin de comprendre le rôle des macrophages dans la pathogenèse des souches de *P. aeruginosa* impliquées dans les otites moyennes, l'équipe de Mittal s'est intéressée à l'étude des interactions entre des souches otopathogéniques de *P. aeruginosa* et des cultures primaires de macrophages humains et murins (HMDM et MBMM respectivement). Leurs résultats soutiennent le fait que *P. aeruginosa* puisse entrer et se multiplier dans les macrophages. OprF joue un rôle important dans ce processus, puisque le mutant *oprF* présente un très faible taux de survie lors de l'infection des macrophages contrairement aux souches sauvages (figure 17. A). De plus, le traitement de la souche sauvage de *P. aeruginosa* par des anticorps monoclonaux anti-OprF, réduit significativement la survie des bactéries dans les macrophages comparées au contrôle. Par ailleurs la délétion d'*oprF* réduit significativement la cytotoxicité de *P. aeruginosa* dans les macrophages par rapport à la souche sauvage (figure 17. B). La capacité de *P. aeruginosa* à survivre dans les macrophages médiée par OprF, assure une protection à la bactérie contre les défenses immunitaires de l'hôte (Mittal *et al.,* 2016a).

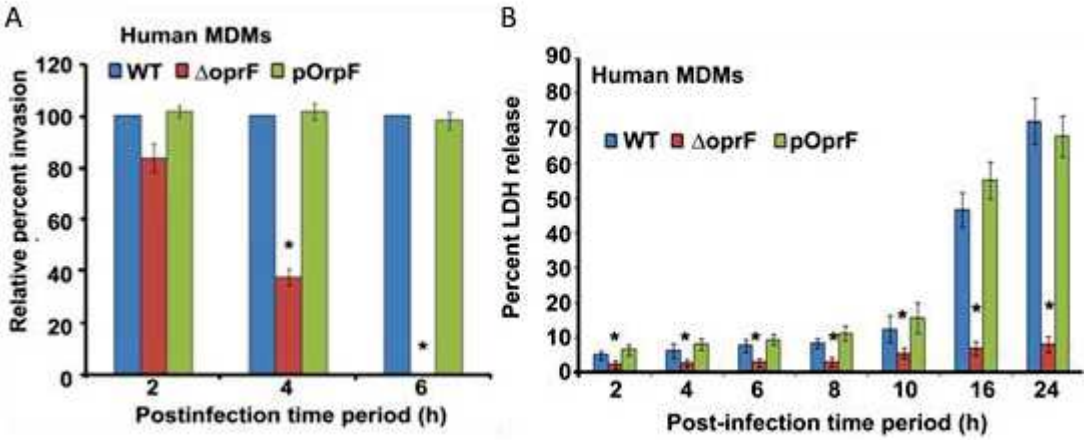


Figure 17. La survie et la cytotoxicité de *P. aeruginosa* dans les macrophages est dépendante d'OprF. D'après (Mittal e*t al.,* 2016a).

En conclusion, l'atténuation de la virulence du mutant *oprF* semble être liée à un effet direct (signalisation) et/ou indirect (altération de la membrane) de la protéine, et fait d'OprF une cible thérapeutique majeure (Fito-Boncompte *et al.,* 2011). De plus, en raison de la nature hautement immunogène d'OprF, de nombreuses études ont utilisé cette porine à des fins de développement de vaccins contre *P. aeruginosa,* et des résultats encourageants ont été obtenus suite à l'administration de protéines chimériques OprF chez des mammifères (Hassan *et al.,* 2018; Rello *et al.,* 2017).

4 Réponse immunitaire innée lors de l'infection à *P. aeruginosa*

Le système immunitaire inné joue un rôle essentiel dans le contrôle des infections causées par *P. aeruginosa.* Lors de ce processus, les phagocytes professionnels comprenant essentiellement la lignée des monocytes/macrophages et les neutrophiles jouent un rôle clé en phagocytant les microbes envahisseurs et en produisant des agents antimicrobiens. Plusieurs structures microbiennes conservées, connues collectivement sous le nom de modèles moléculaires associés aux microbes (MAMPs), ont été impliquées dans l'activation de la réponse immunitaire innée de l'hôte à *P. aeruginosa*. Les MAMPs sont détectés par un ensemble de récepteurs codés par les cellules du système immunitaire résidant dans les tissus (mastocytes, macrophages et cellules dendritiques tissulaires), appelés PRR (Pattern recognition receptor), comprenant des récepteurs de surface cellulaire de type Toll (TLR), et des récepteurs cytosoliques de type Nod (NLR). MyD88, une molécule adaptatrice pour presque tous les TLRs, est nécessaire pour le contrôle de *P. aeruginosa* dans les poumons (Lavoie *et al.,* 2011). Dans ce chapitre, je ne ferai qu'une brève description sur l'implication des neutrophiles dans la réponse immunitaire à l'infection à *P. aeruginosa*. Je décrirai plus particulièrement la réponse immunitaire médiée par les macrophages, sujet d'intérêt de ma thèse.

4.1 Rôle du neutrophile lors de l'infection à *P. aeruginosa*

Les voies respiratoires des patients CF sont riches en neutrophiles et en protéases dérivées des neutrophiles. Les neutrophiles sont recrutés sur le site d'infection en répondant aux gradients de facteurs chimioattractants, qui incluent le contenu des cellules endommagées, des produits bactériens et des chimiokines produites par l'hôte en réponse à des stimuli nuisibles.

Hormis le cas de la neutropénie, une réponse neutrophilique sera impliquée dans chaque infection pulmonaire à *P. aeruginosa*, et toute chance de résolution complète nécessitera probablement cette réponse. Dans les infections pulmonaires transitoires et chroniques à *Pseudomonas*, la réponse du neutrophile est généralement robuste, créant une sécrétion purulente expectorée. Des modèles murins de pneumonie aiguë à *Pseudomonas* dans lesquels les neutrophiles étaient déplétés, ont montré une mortalité accrue des individus, soulignant ainsi l'importance des neutrophiles dans la défense de l'hôte contre *P. aeruginosa* (Williams *et al.,* 2010). De même que les macrophages, les neutrophiles génèrent un certain nombre de molécules antimicrobiennes importantes, comprenant les espèces réactives de l'oxygène (ROS), produites par la NADPH oxydase, des espèces réactives de l'azote, via l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), de l'élastase et des peptides antimicrobiens, dont l'α-défensine. La lactoferrine et le lysozyme sont deux produits importants du neutrophile. La lactoferrine est à la fois bactéricide et bactériostatique pour *P. aeruginosa* et inhibe le développement

des bactéries sous forme de biofilm. Le lysozyme est un polypeptide cationique important dans la défense contre *P. aeruginosa* en perturbant la membrane bactérienne (Williams *et al.,* 2010).

4.2 Rôle du macrophage lors de l'infection à *P. aeruginosa*

Les macrophages jouent un rôle central dans la défense de l'hôte contre les agents pathogènes, agissant à la fois comme cellules phagocytaires clés et régulateurs de l'immunité notamment par la sécrétion de cytokines. Les macrophages alvéolaires résidents sont les premières cellules immunitaires susceptibles de rencontrer *P. aeruginosa* dans les poumons des malades mucoviscidosiques (Lavoie *et al.,* 2011). Ces cellules peuvent intérioriser et tuer les bactéries pathogènes à travers divers mécanismes qui seront décrits dans les paragraphes suivants.

4.2.1 Phagocytose et formation du phagolysosome

Les macrophages éliminent les micro-organismes envahisseurs et d'autres particules étrangères en les ingérant d'abord dans une vacuole intracellulaire dérivée de la membrane plasmique, appelée phagosome. L'ingestion, ou phagocytose, est une réaction actine dépendante. Les phagosomes formés subissent une série d'événements de fission et de fusion qui modifient la composition de leur membrane limitante et de leur contenu, par un processus qui ressemble à la progression de la voie d'endocytose organisée en un continuum d'organelles allant des endosomes précoces aux lysosomes. Ce processus de maturation du phagosome, confère à la vacuole une multitude de produits de dégradation, qui sont au cœur de sa fonction microbicide (Vieira *et al.,* 2002). Au cours de la maturation du phagosome, le pH interne s'acidifie autour de 5,5 et la vacuole s'enrichie en enzymes hydrolytiques, on parle alors de phagosome tardif. Le phagolysosome est finalement formé quand les phagosomes tardifs fusionnent avec les lysosomes remplis d'hydrolases (nucléases, lipases, glycosidases, protéases et cathepsines). Le pH interne devient alors très acide (pH <5.5), ce qui assure l'activité optimale des enzymes de dégradation et compromet la survie de nombreux microorganismes. Les lysosomes amènent aussi les protéines membranaires ainsi que l'ATPase de type V. Cette dernière est une pompe à protons qui concoure à l'acidification du contenu phagolysosomal (Vieira *et al.,* 2002).

4.2.2 Rôle bactéricide du macrophage

On distingue deux types de systèmes antimicrobiens chez le macrophage : les systèmes dépendants de l'oxygène qui impliquent la production d'espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène [1], et les systèmes indépendants de l'oxygène qui peuvent impliquer, la privation d'éléments nutritifs [2], l'acidification de la vacuole phagolysosomale [3], la production de défensines et d'autres peptides antimicrobiens [4] et l'action d'enzymes hydrolytiques lysosomales [5] (figure 18).

Les plus importants systèmes antimicrobiens des cellules phagocytaires sont les voies de la NADPH phagocyte oxydase (phox) et de l'iNOS, qui sont responsables de la génération de radicaux superoxydes (O_2^-) et d'oxyde nitrique (NO) respectivement. Bien que ces systèmes dépendent tous les deux de la NADPH et de l'oxygène, et fonctionnent parfois ensemble. Le radical superoxyde O_2^- est rapidement converti en ROS essentiel pour la fonction microbicide du phagocyte (Nunes *et al.,* 2013).

Priver le pathogène d'éléments nutritifs est une autre fonction antimicrobienne importante du phagocyte, qui comprend une isolation spatiale et des mécanismes moléculaires actifs de privation de nutriments. Par exemple, le fer et le manganèse sont activement exclus du phagosome par l'action d'un transporteur de métaux Nramp1 (Natural Resistance-Associated Membrane Protein) (Cellier *et al.,* 2007). Par ailleurs, des études ont montré une carence en d'autres nutriments indispensables à la multiplication bactérienne (acides aminés, pyrimidines, purines et vitamines) (Appelberg, 2006).

Les macrophages produisent des peptides antimicrobiens, qui sont des petits peptides qui exercent une activité microbicide en perturbant la membrane ou en créant des pores au niveau de la membrane du pathogène (Zavala *et al.,* 2018). Ils sont présents dans les granulations des cellules phagocytaires et sont capables d'éliminer un large spectre de micro-organismes (Wassing *et al.,* 2015).

Le dernier mécanisme utilisé pour éliminer les bactéries fait appel à plus de 50 hydrolases acides lysosomales différentes. Ainsi, l'action concertée de protéases, lipase, nucléases, glycosidases et phosphatases permet la complète désintégration d'un grand nombre de structures complexes telles que les micro-organismes mourants et permet une action antimicrobienne directe (Flannagan *et al.,* 2012).

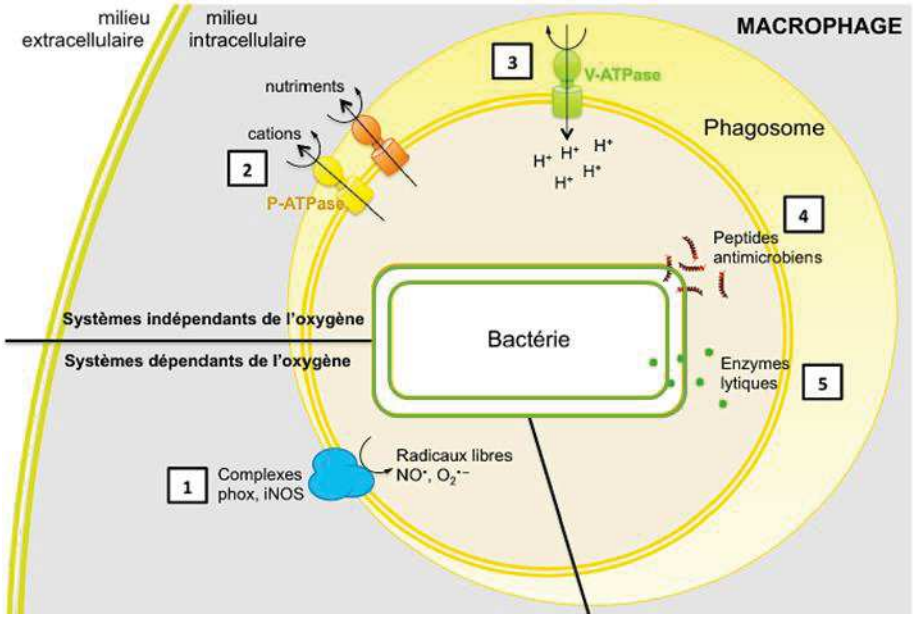


Figure 18. Réponses antimicrobiennes médiées par le macrophage. D'après (Thèse de doctorat, C. Belon. 2015).

4.2.3 Coopération macrophages-neutrophiles

Suite à l'activation de leurs récepteurs TLR-4 et TLR-5 par le LPS et la flagelline bactérienne, les macrophages alvéolaires murins sécrètent des chimiokines et des cytokines (TNF-α et IL-6), qui induisent le recrutement des neutrophiles. La réponse des macrophages alvéolaires induit également la sécrétion d'interleukine IL-1β, qui peut être détectée par les cellules épithéliales des voies respiratoires, qui à leur tour sécrètent des chimiokines attractants pour les neutrophiles (Lavoie *et al.,* 2011). Ainsi, les neutrophiles et les monocytes / macrophages coordonnent leurs activités, ce qui conduit à des vagues de recrutement alternées de ces deux types cellulaires au site de l'infection (figure 19) (Amulic *et al.,* 2012).

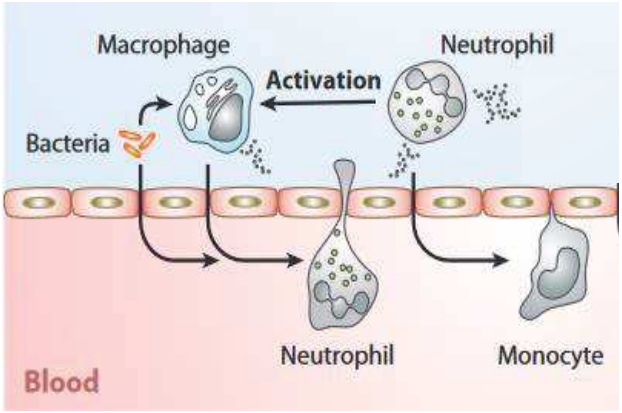


Figure 19. Coopération macrophages-neutrophiles et recrutement au site de l'infection. Adapté de (Amulic *et al.,* 2012).

4.3 Réponse altérée des macrophages dans le cas de la mucoviscidose

L'hypothèse selon laquelle les macrophages pourraient contribuer à la pathologie de la mucoviscidose a été proposée pour la première fois en 1982 (Wilson and Fudenberg, 1982), leur dysfonctionnement étant associé à une activation altérée définie par l'hyperactivité métabolique, avec une production élevée de cytokines pro-inflammatoires, d'élastase et de médiateurs des lésions tissulaires (Bruscia and Bonfield, 2016).

Des études ont montré que la fonction de phagocytose était significativement réduite dans les phagocytes pulmonaires issus de jeunes patients mucoviscidosiques (macrophages et neutrophiles) (Alexis *et al.,* 2006). Bien que le rôle des macrophages en réponse à l'infection par des agents pathogènes dans un contexte CF ne soit pas complètement compris, de nombreuses études ont montré une altération de la fonction des macrophages lors de l'infection (Tableau 1).

cellule immunitaire	Rôle fonctionnel	Défaut dans les poumons des malades CF
Macrophages	• Défense antibactérienne et antifongique de l'hôte • Élimination des cellules apoptotiques (efferocytose) • Présentation d'antigène • Sécrétion de Cytokines /chimiokines • Régulation immunitaire	• Augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires • Phagocytose altérée* • Élimination intracellulaire des bactéries altérée* • Acidification du phagolysosome altérée* • Métabolisme perturbé des céramides • Trafic dérégulé du TLR4 •défaut d'autophagie •Hyper-réactivité des macrophages envers le LPS • Hypo-réactivité des monocytes envers le LPS • Dérégulation de la réponse M1/M2* • Expression réduite des récepteurs scavenger • Clivage des récepteurs phosphatidylserine / défaut d'efferocytose

Tableau 1.Réponse immunitaire médiée par les macrophages dans le cas normale ou pathologique (mucoviscidose). * Études controversées. D'après (Hartl *et al.,* 2012).

4.3.1 Macrophage et CFTR

Le rôle du CFTR dans le contrôle de l'infection et en particulier au niveau des macrophages reste peu clair et controversé. D'une part, la controverse concerne l'expression ou non du gène *cftr* au niveau des macrophages. Un certain nombre d'études le soutienne, mais avec un niveau d'expression beaucoup plus faible que dans les cellules épithéliales (Del Porto *et al.,* 2011; Di *et al.,* 2006; Phennicie *et al.,* 2010).

L'autre controverse réside dans la contribution de CFTR à la réponse inflammatoire et/ou bactéricide des macrophages. Récemment, un nombre croissant de données ont indiqué que l'altération du CFTR dans les macrophages (par mutation ou via l'inhibiteur $CFTR_{inh}$-172), pourrait directement affecter l'activité bactéricide des macrophages vis-à-vis de *P. aeruginosa* (Del Porto *et al.,* 2011; Deriy *et al.,* 2009; Di *et al.,* 2006). L'altération de l'activité bactéricide du macrophage pourrait être liée à un défaut d'acidification des phagolysosomes, comme l'ont révélé plusieurs études (Deriy *et al.,* 2009; Di *et al.,* 2006; Zhang *et al.,* 2010), ainsi qu'à un défaut de production de stress oxydatif (Bernut *et al.,* 2019; Zhang *et al.,* 2010). De façon intéressante, une étude menée sur des macrophages issus de patients CF et non CF, a montré un effet significativement moins bactéricide des macrophages CF (Del Porto *et al.,* 2011). Par ailleurs, une diminution significative des capacités de phagocytose des macrophages CF par rapport à des macrophages non CF a également été montrée (Simonin-Le Jeune *et al.,* 2013).

Cependant, certaines données de la littérature ne montrent pas de différence entre les modèles de macrophages CF et non CF, concernant le défaut d'acidification (Haggie and Verkman, 2007), ou la

production de stress oxydatif (Cifani *et al.,* 2013; Di *et al.,* 2006)(figure 20). Ces différentes observations pourraient être expliquées par l'utilisation de différentes méthodes expérimentales.

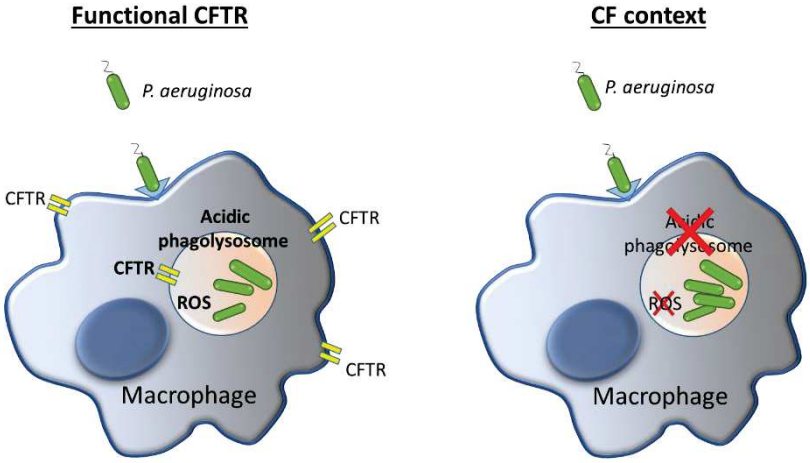


Figure 20. Rôle controversé du CFTR dans le macrophage.

5 Le poisson-zèbre comme modèle d'étude des interactions macrophage - *P. aeruginosa*

Plusieurs modèles animaux comprenant des souris, des furets et des porcs ont été générés pour étudier la physiopathologie de la mucoviscidose. Je me suis focalisée au cours de mon étude sur le modèle vertébré embryon de poisson-zèbre, qui présente certains avantages intéressants dans mon étude, qui seront présentés dans le paragraphe ci-après.

Depuis sa première manipulation il y a 40 ans, l'utilisation du modèle poisson-zèbre a été étendue d'un outil de dissection génétique du développement précoce des vertébrés (Streisinger *et al.,* 1981), à la compréhension fonctionnelle de l'organogenèse et de processus pathologiques tels que l'infection et le cancer. En effet, ses nombreux avantages lui ont valu de s'imposer progressivement comme un modèle de choix pour l'étude des maladies infectieuses. Dans cette partie, j'apporterai un intérêt particulier aux données actuelles concernant l'utilisation du poisson-zèbre pour l'étude des interactions macrophage-bactérie, pour l'étude de la pathogenèse de *P. aeruginosa* et pour l'étude de l'implication du Cftr au cours de l'infection.

5.1 Intérêt du poisson-zèbre comme modèle d'infection bactérienne

Le poisson-zèbre présente certains avantages par rapport à d'autres modèles vertébrés, deux se distinguent: la capacité à réaliser une imagerie *in vivo* et la disponibilité d'outils génétiques puissants (Renshaw and Trede, 2012). En effet, l'embryogenèse du poisson-zèbre est rapide, *ex utero*, et la transparence des embryons ainsi que leur petite taille permettent une manipulation grandement facilitée, et un suivi spatiotemporel non invasif de processus pathogéniques *in vivo* (Clatworthy *et al.,* 2009). Le poisson-zèbre est génétiquement maniable, cet organisme vertébré permet des approches génétiques, et des techniques variées utilisant des morpholinos (oligonucléotides antisens) pour contrôler la régulation génique chez le poisson-zèbre. De plus, au moins 70% du génome humain codant, y compris des gènes associés aux pathologies, ont un orthologue direct chez le poisson-zèbre (Torraca and Mostowy, 2018).

Le modèle poisson-zèbre présente également des inconvénients, du fait des nombreuses différences anatomiques avec les mammifères, comme l'absence de poumons, ou encore la nécessité de maintenir les embryons à une température comprise entre 26 et 29°C, qui peut limiter l'étude de certains facteurs bactériens dont l'activité dépend de la température de leur hôte mammifère (37°C) (Bernut *et al.,* 2015).

Collectivement, les embryons de poisson-zèbre sont largement acceptés en tant que modèles *in vivo* pour étudier les infections par différentes bactéries pathogènes (Torraca and Mostowy, 2018), notamment *M. marinum* (Davis *et al.,* 2002), qui est un pathogène naturel du poisson-zèbre étroitement apparenté à *M. tuberculosis, M. abscessus* (Bernut *et al.,* 2014), *Pseudomonas* (Brannon *et al.,* 2009; Clatworthy *et al.,* 2009), *B. cenocepacia* (Vergunst *et al.,* 2010), *Salmonella* (van der Sar *et al.,* 2003), *S. aureus* (Prajsnar *et al.,* 2008), *Listeria* spp. (Levraud *et al.,* 2009) et *Shigella* (Duggan and Mostowy, 2018) (figure 21).

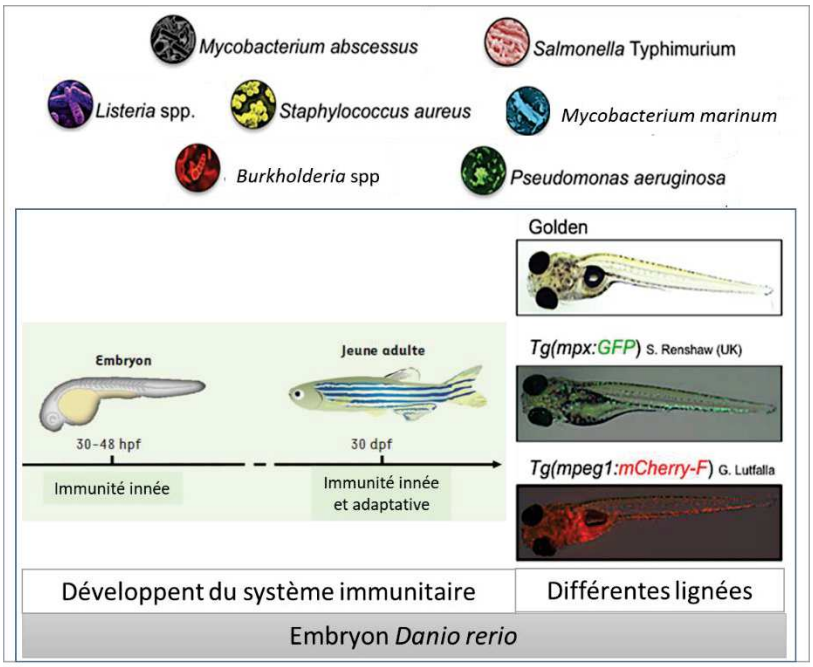


Figure 21. Utilisation de l'embryon de poisson-zèbre comme modèle d'étude des interactions système immunitaire-bactérie. Adapté de (Thèse de doctorat, C. Belon. 2015).

Diverses méthodes d'infection ont été utilisées dans le poisson-zèbre. Les infections visant à reproduire le mode naturel de contamination, en incubant les embryons (avec ou sans abrasion dermique préalable) dans une solution bactérienne, se révèlent généralement peu reproductibles et peu homogènes avec l'observation d'une grande variabilité de réponse individuelle à l'infection. La microinjection quant à elle parait être un moyen d'infection plus reproductible, elle permet de contrôler la dose de pathogènes délivrée, et permet d'induire des infections systémiques ou locales selon le site d'injection choisi (Bernut *et al.,* 2015) (figure 22).

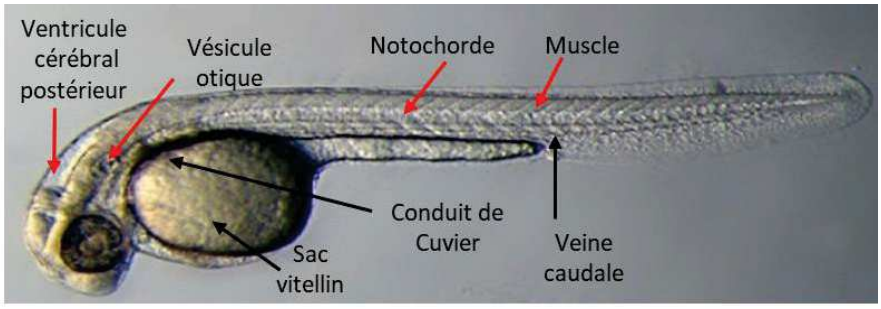


Figure 22. Sites d'injection utilisés pour les procédures expérimentales d'infection de l'embryon de poisson-zèbre.
Flèches noires : Infection systémique (veine caudale, sac vitellin, conduit de Cuvier).
Flèches rouges : Infection locale (muscle, vésicule otique, ventricule cérébral postérieur, notochorde).

5.2 Les embryons de poisson-zèbre pour l'étude des interactions macrophage-bactérie

Le poisson-zèbre a été largement adopté dans l'étude de l'interaction de divers pathogènes avec les acteurs du système immunitaire. La mise en place de lignées transgéniques impliquant le marquage fluorescent ou la manipulation de lignées de cellules immunitaires, a permis d'offrir une vision sans précédent de la dynamique du système immunitaire des vertébrés, et de ses interactions avec un certain nombre d'agents pathogènes humains (Kanther and Rawls, 2010). Le système immunitaire est particulièrement bien conservé entre le poisson-zèbre et les mammifères, tant dans la composition que dans la fonction cellulaire (Levraud and Boudinot, 2009). Pendant les 30 premiers jours après la fécondation (dpf), la défense de l'embryon contre les agents pathogènes repose uniquement sur le système immunitaire inné ce qui en fait un atout supplémentaire, qui offre la possibilité d'étudier la contribution de ce bras de l'immunité au cours d'un processus infectieux. 28 à 30 heures après la fécondation (hpf) les macrophages primitifs sont capables de phagocyter les microorganismes envahisseurs inoculés, tandis que la différenciation des neutrophiles primitifs est légèrement plus tardive, les neutrophiles fonctionnels apparaissant entre 32 et 48 hpf. En revanche, bien que les progénitures des cellules T commencent à peupler le thymus 3 dpf, la maturité fonctionnelle des cellules lymphoïdes de la réponse immunitaire adaptative n'apparait que 4 semaines après fécondation (Clatworthy *et al.,* 2009).

Gène d'intérêt	Description	Marquage cellulaire	Reference
pu.1	facteur de différenciation myéloïde	Lignée myéloïde (macrophages, neutrophiles)	(Berman *et al.*, 2005)
mpeg1	Macrophage expressed gene 1	Macrophages	(Ellett *et al.*, 2011)
irg1	Immunoresponsive gene 1	Macrophages activés	(Sanderson *et al.*, 2015)
fms	Colony stimulating factor 1 (CSF1R)	Macrophages et xanthophores cutanés	(Gray *et al.*, 2011)
mfap4	Microfibrillar-associated protein 4	Macrophages	(Walton *et al.*, 2015)

Tableau 2. Gènes ciblés dans les lignées transgéniques pour étudier le rôle des macrophages dans le poisson-zèbre vivant.

De nombreuses lignées transgéniques permettent d'induire l'expression d'une protéine d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur spécifique d'un tissu ou d'un type cellulaire. Ainsi, les lignées exprimant différents fluorochromes sous le contrôle de promoteurs spécifiques des macrophages (tableau 2) combinées à l'utilisation de bactéries fluorescentes, sont particulièrement remarquables pour l'étude des interactions macrophage-pathogène *in vivo.* Différents réactifs peuvent être également utilisés lors de l'infection, à titre d'exemple, pour le marquage de l'apoptose (acridine orange), la détection de la production de ROS (CellROX^{R}), ou encore l'utilisation de certaines sondes réagissant en environnement acide (LysoTracker et LysoSensor). Ces outils sont particulièrement utiles pour démonter le potentiel phagocytaire et autophagique des cellules immunes (Bernut *et al.,* 2019; Peri and Nüsslein-Volhard, 2008; Tucker and Lardelli, 2007). Enfin, La déplétion sélective de macrophages est utilisée pour étudier leur contribution et leur rôle pendant l'infection, en utilisant différentes stratégies comprenant le knock-down par morpholino, la mutation génétique ou encore le clodronate encapsulé dans le liposome (Morales and Allende, 2019; van Rooijen and Hendrikx, 2010).

5.3 Le poisson-zèbre comme modèle d'étude de la pathogenèse à *P. aeruginosa*

Le poisson-zèbre est relativement résistant à *Pseudomonas*, et de grands inoculas sont nécessaires pour induire une infection létale chez l'hôte (Brannon *et al.,* 2009; Clatworthy *et al.,* 2009) . Comme chez l'homme, l'absence des phagocytes chez les embryons peut augmenter leur sensibilité à *P. aeruginosa* (Belon *et al.,* 2015; Brannon *et al.,* 2009; Clatworthy *et al.,* 2009). En accord avec ce rôle clé des phagocytes dans le contrôle de l'infection à *Pseudomonas*, les macrophages et les neutrophiles peuvent rapidement engloutir et tuer les bactéries introduites par voie systémique (Brannon *et al.,* 2009; Clatworthy *et al.,* 2009; Phennicie *et al.,* 2010).

Le modèle embryon de poisson-zèbre-*P. aeruginosa* a été utilisé pour étudier différents aspects de l'infection, comme l'étude de facteurs de virulence bactériens. De nombreuses recherches utilisant ce modèle d'infection, ont permis de mettre en évidence le rôle clé de facteurs bactériens en lien avec les cellules de l'immunité innée, à l'exemple de MgtC et du SST3 qui jouent un rôle au niveau des phagocytes. En effet, les mutants *mgtC* et SST3 sont moins virulents que la souche sauvage lors de l'infection des embryons de poisson-zèbre. Par contre une fois les cellules phagocytaires déplétées, les mutants deviennent aussi virulents que la souche sauvage de *P. aeruginosa* (Belon *et al.,* 2015; Brannon *et al.,* 2009). De plus, ce modèle d'infection a permis d'étudier la protéomique et la transcriptomique de *P. aeruginosa* chez l'hôte, et a montré l'induction de certains facteurs de

virulence, tels que le SST3 et les protéines associées au flagelle, suite à l'infection des embryons par injection (Díaz-Pascual *et al.,* 2017; Kumar *et al.,* 2018).

Bien que l'embryon de poisson-zèbre soit un modèle d'infection aiguë, l'injection locale de *P. aeruginosa* au niveau du ventricule cérébral postérieure de l'embryon, a mis en évidence le développement de microcolonies, précurseurs de biofilm (Cafora *et al.,* 2019; Rocker *et al.,* 2015). L'infection avec une souche déficiente pour la production de Psl, entraîne la formation de microcolonies plus petites. Ces données suggèrent que ce modèle peut être adapté pour étudier la formation de biofilm *in situ* (Rocker *et al.,* 2015).

L'embryon de poisson-zèbre a également été utilisé dans le cadre de co-infection par deux pathogènes, et a permis de montrer *in vivo* l'effet de virulence synergique résultant des interactions entre *P. aeruginosa* et le champignon *Candida albicans.* En effet, la co-infection des embryons de poissons-zèbre par les deux microorganismes favorise l'invasion épithéliale de l'hôte par *C. albicans* et accroit la mortalité des embryons (Bergeron *et al.,* 2017).

Enfin, un modèle gnotobiotique poisson-zèbre-*P. aeruginosa* a également été mis au point afin d'identifier les facteurs bactériens impliqués dans la colonisation de l'intestin de l'embryon de poisson-zèbre. L'étude a montré entre autre que les souches de *P. aeruginosa* portant des mutations au niveau des gènes nécessaires à l'assemblage ou à la rotation du flagelle, provoquaient une réponse immunitaire innée atténuée chez l'embryon (Rawls *et al.,* 2007).

Les différents mutants chez *P. aeruginosa* étudiés dans ce modèle sont indiqués dans le tableau ci-après.

Gènes bactérien mutés	Facteurs bactériens régulés	Site d'injection	Observation chez l'hote	Références
- ***exsA*** - ***retS*** - ***pilA***	- SST3 - SST3 et EPS - Pili de type IV	Pas d'injection	- Pas d'effet sur la colonisation de l'intestin et l'expression des biomarqueurs de la réponse immunitaire innée	(Rawls *et al.*, 2007)
fliC* et *motABC	Flagelle et motilité	Pas d'injection	Atténuation des réponses immunitaires innées	
exsA* et *pscD	SST3	Veine caudale/ conduit de Cuvier	- Virulence du ΔSST3 atténuée, dépendante de la présence des phagocytes	(Brannon *et al.*, 2009; Clatworthy *et al.*, 2009)
mvfR	QS	conduit de Cuvier	-Virulence atténuée chez les embryons	(Clatworthy *et al.*, 2009)
lasR	QS	conduit de Cuvier	- Virulence atténuée chez les embryons à un stade avancé - Clairance bactérienne réduite chez les morphants *cftr*	(Clatworthy *et al.*, 2009; Phennicie *et al.*, 2010)
		Vessie	- Augmentation de la virulence de *C. albicans* en cas de co-infection avec *P. aeruginosa*	(Bergeron *et al.*, 2017)
-retS, gacS ***-phoR*** ***-copS*** ***-bqsS*** ***-phz1/2***	- Virulence - Rhamnolipide - Cuivre sensing - Biofilm - Phenazine	conduit de Cuvier	Virulence atténuée chez les embryons	(Chand *et al.*, 2011)
kinB	Alginate (biofilm) QS, et motilité	conduit de Cuvier	Virulence et survie bactérienne atténuées chez les embryons	
psl	EPS	Ventricule du cerveau postérieur	-Virulence atténuée chez les embryons - Formation de microcolonies plus petites qu'avec la souche sauvage	(Rocker *et al.*, 2015)
mgtC	Virulence	Veine caudale	Virulence atténuée, dépendante de la présence des macrophages	(Belon *et al.*, 2015)
sadC* et *warA	LPS /c-di-GMP	Ventricule du cerveau postérieur	- Virulence atténuée chez les embryons - Recrutement important des neutrophiles et expression élevée du TNFα	(McCarthy *et al.*, 2017)

Tableau 3. Facteurs bactériens de P. aeruginosa étudiés dans le modèle poisson-zèbre.

De fait, le poisson-zèbre a contribué à élucider les mécanismes de pathogenèse sous-jacents à l'infection opportuniste à *Pseudomonas* et constitue une plate-forme permettant de révéler les effecteurs bactériens nécessaires pour échapper à l'immunité innée. Il peut également être utilisé pour suggérer de nouvelles thérapies visant à renforcer la fonction immunitaire innée, afin de contrôler les infections bactériennes opportunistes chez l'homme.

5.4 Le Cftr chez le poisson-zèbre

Les structures récemment résolues du CFTR humain (hCFTR) et du poisson-zèbre (zCftr) ont offert une occasion sans précédent de comprendre le fonctionnement du CFTR au niveau moléculaire. Malgré des millions d'années de distance phylogénétique entre l'homme et le poisson, les structures du zCftr et du hCFTR présentent des similitudes remarquables (figure 23). Les deux protéines partagent 55% d'identité de séquences, et 42 des 46 sites de mutation faux-sens causant la mucoviscidose chez l'homme sont retrouvés dans le zCftr (Zhang and Chen, 2016). Le Cftr du poisson-zèbre joue un rôle essentiel dans la régulation de l'homéostasie des fluides (Bagnat *et al.,* 2010). Par ailleurs, l'altération du Cftr chez l'embryon de poisson-zèbre présente quelques similitudes avec la mucoviscidose. En effet, la perte de fonction du zCftr entraîne une destruction du pancréas exocrine, une pathologie similaire à l'insuffisante pancréatique chez les patients atteints de mucoviscidose (Navis and Bagnat, 2015), ainsi qu'un défaut de migration des cellules germinales primordiales chez les embryons induisant une forte baisse de fertilité chez les males à l'âge adulte (Liao *et al.,* 2018). De plus, le mutant *cftr* du poisson-zèbre présente des lésions hématopoïétiques primitives et définitives avec une signalisation Wnt altérée qui pourraient expliquer l'anémie chez les patients mucoviscidosiques (Sun *et al.,* 2018).

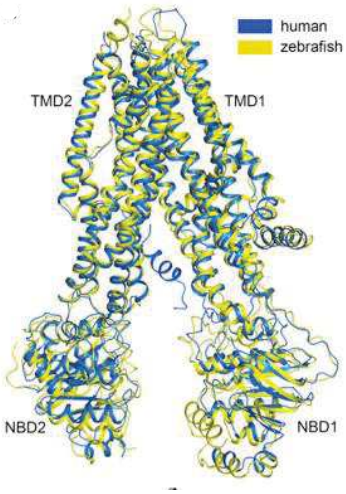


Figure 23. Superposition de la structure du CFTR humain avec celui du poisson-zèbre montrant la grande similitude des deux protéines. D'après (Liu *et al.,* 2017).

Le gène *cftr* est exprimé dans de nombreux organes du poisson-zèbre, incluant le foie, les reins, la rate et l'intestin. Fait intéressant, les transcrits *cftr* sont également détectés dans les cellules de la lignée myéloïdes qui comprend les macrophages et les neutrophiles (Phennicie *et al.,* 2010).

Chez le poisson-zèbre, la sécrétion des fluides régulée par le Cftr favorise la formation d'une seule lumière intestinale. La latéralisation est contrôlée par une structure transitoire remplie de liquide appelée vésicule de Kupffer (KV). La mutation du *cftr* (par la nucléase TAL ou le CRISPR CAS9) chez le poisson-zèbre entrave l'expansion de la lumière au niveau de la KV entrainant un défaut d'asymétrie droite-gauche. L'absence de la KV est un critère morphologique permettant de distinguer les mutants *cftr* (Cafora *et al.,* 2019; Navis *et al.,* 2013) (figure 24).

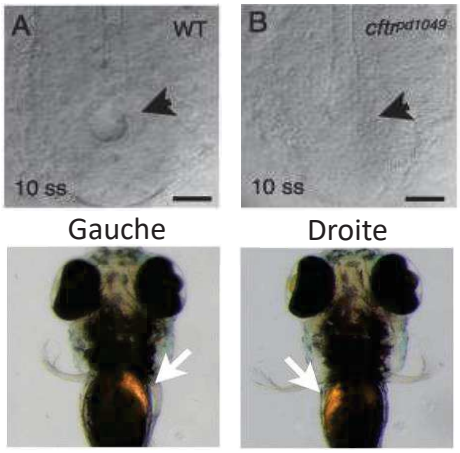


Figure 24. La latéralisation des organes est perturbée chez les embryons mutants *cftr*^{pd1049}. Le panel du haut montre la visualisation au microscope de la KV au stade 10 somites (10 ss). Le panel du bas montre une vue ventrale d'une larve sauvage et d'un mutant *cftr*^{pd1049} (délétion au niveau du *cftr*), agées de 4 dpf exprimant le dsRed au niveau du foie (flèche). D'après (Navis *et al.,* 2013).

5.5 Utilisation du poisson-zèbre comme modèle d'infection pour la mucoviscidose

Le poisson-zèbre représente un modèle intéressant pour la mucoviscidose. D'une part comme déjà indiqué, le canal Cftr du poisson-zèbre a une structure similaire à celle du CFTR humain et d'autre part, les embryons déficients en Cftr présentent un phénotype qui rappelle celui de la mucoviscidose. Bien que les poissons n'aient pas de poumon, ils expriment des mucines qui sont très homologues des mucines humaines en termes d'organisation génomique et de domaine protéique (Jevtov *et al.,* 2014). Phennicie et ses collaborateurs sont les premiers à avoir utilisé les embryons de poisson-zèbre avec une expression réduite du gène *cftr* (morphants *cftr*) comme modèle CF d'infection à *P. aeruginosa*. Dans cette étude, les morphants *cftr* ont présenté un métabolisme oxydatif (production de ROS) réduit et une migration diminuée des neutrophiles vers le site d'injection (Ventricule cérébral postérieur), supportant ainsi un lien entre la protéine Cftr et la réponse immunitaire innée. Ceci a été conforté par une étude récente qui a montré une activation réduite du Tnf-α et de l'Il-β chez les embryons CF comparé aux embryons sauvages (Cafora *et al.,* 2019; Phennicie *et al.,* 2010).

De plus, ces recherches ont montré que les morphants *cftr* infectés par *P. aeruginosa* présentaient des charges infectieuses plus importantes que les embryons sauvages, et ont permis de montrer l'implication spécifique de certains facteurs bactériens (comme le régulateur du QS, LasR) dans la susceptibilité augmentée des embryons Knock-down Cftr à *P. aeruginosa.* Fait intéressant, des microcolonies de plus grande taille semblent se former chez le modèle CF comparé aux embryons sauvages, suggérant une tendance de *P. aeruginosa* à former un biofilm plus important en absence de Cftr (figure 25) (Cafora *et al.,* 2019; Phennicie *et al.,* 2010).

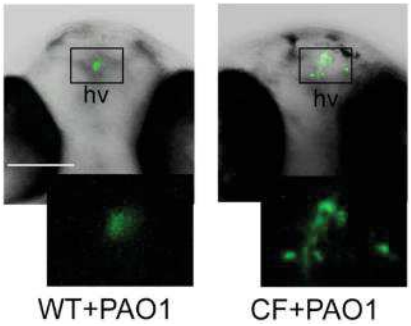


Figure 25. Formation de microcolonies PAO1 dans le ventricule cérébral postérieur d'embryons de poisson-zèbre WT et CF. La quantité de microcolonies à 18 hpi était supérieure à celle des WT ayant reçu la même quantité de PAO1 (100 cfu). La barre d'échelle indique 100 µm. hv: (Hindbrain Ventricule) ventricule cérébral postérieur. D'après (Cafora *et al.,* 2019).

Les mutants *cftr* d'embryons de poisson-zèbre (mutants et morphants Cftr) ont également été utilisés pour l'étude de *M. abscessus,* qui est impliqué dans les infections des malades mucoviscidosiques. Il a été montré que la perte du Cftr augmentait la susceptibilité des embryons à l'infection bactérienne, en raison d'un recrutement des neutrophiles réduit au site de l'infection et d'une restriction limitée de la croissance bactérienne intracellulaire par les macrophages de l'embryon. Cette étude a montré *in vivo* que la perte de fonction du Cftr dans les macrophages induisait une diminution de la production des ROS liée à un défaut de l'activité de la NOX2/NADPH oxydase (figure 26) (Bernut *et al.,* 2019).

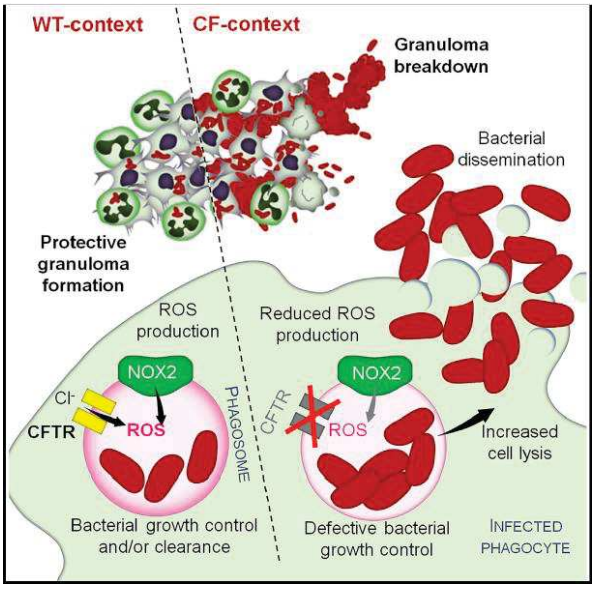


Figure 26. Mécanisme cellulaire lié au dysfonctionnement du Cftr induisant l'échappement des bactéries à l'action des macrophages. D'après (Bernut *et al.,* 2019).

Enfin, le modèle poisson-zèbre CF ouvre des perspectives thérapeutiques, puisqu'il a permis pour la première fois de tester sur un modèle animal des traitements d'infection à *P. aeruginosa* basés sur l'utilisation d'un cocktail de phages seuls ou en combinaison avec des antibiotiques. Des résultats positifs sur la survie des embryons infectés ont été obtenus (Cafora *et al.,* 2019), soulignant l'intérêt pour la découverte de nouvelles molécules à visée thérapeutique. Il est possible de visualiser et quantifier les éventuels effets toxiques survenant à la suite du traitement, ainsi que l'efficacité microbicide ou microbiostatique des composés sur des embryons infectés. Grace à ce modèle et à la mise en place de plates-formes automatisées pour le criblage à haut débit, il est dorénavant possible d'identifier de nouvelles molécules antimicrobiennes, première étape vers de futurs traitements (Bernut *et al.,* 2015).

II. Objectifs

P. aeruginosa occupe une position centrale dans la problématique actuelle des infections nosocomiales, et est la principale cause de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose. En raison de l'antibiorésistance de ce pathogène, des stratégies de lutte alternatives doivent être développées contre *P. aeruginosa*. Des études récentes soulignent l'importance d'une phase intramacrophagique chez ce pathogène extracellulaire. De ce fait, au laboratoire, on s'intéresse aux facteurs de virulence, OprF et MgtC, impliqués dans l'étape intramacrophagique de *P. aeruginosa.* Pour mieux comprendre le rôle de cette étape durant l'infection, que ce soit dans le contexte de la Mucoviscidose ou non, et développer des stratégies antivirulence.

Mon projet de thèse est financé par VLM (Vaincre la Mucoviscidose), dans le cadre d'un projet dont l'intitulé est "Rôle d'une étape intramacrophagique dans l'établissement et la dissémination de l'infection à *Pseudomonas aeruginosa*: analyse dans un contexte CF ou non-CF et inhibition de cette étape en ciblant un facteur de virulence bactérien spécifiquement impliqué". Mon objectif était de développer une stratégie antivirulence, et d'utiliser le modèle d'infection embryon de poisson-zèbre pour tester de nouvelles stratégies thérapeutiques, évaluer le rôle du macrophage dans l'infection à *P. aeruginosa,* et étudier l'implication du canal Cftr au niveau des macrophages dans l'élimination de *P. aeruginosa.*

1 Développement d'une stratégie antivirulence basée sur l'inhibition du facteur de virulence MgtC

MgtC présente l'avantage d'avoir un inhibiteur naturel connu, le peptide MgtR identifié chez *S.* Typhimurium. Le peptide MgtR peut interagir avec MgtC de *P. aeruginosa*, et son expression ectopique chez cette bactérie, induit un effet antivirulence contre *P. aeruginosa,* validant ainsi la pertinence de la cible MgtC. Cependant, l'efficacité de MgtR n'a été montrée que de façon endogène. Mon objectif, afin de développer une nouvelle stratégie thérapeutique, est de tester un peptide ajouté de façon exogène, visant à limiter la capacité de *P. aeruginosa* à survivre dans le macrophage.

Dans cette optique, la molécule MgtR a été synthétisée et un des principaux objectifs de ma thèse a été de tester l'effet du peptide synthétique sur la virulence de *P. aeruginosa.* Cette étude a été menée dans un modèle d'infection cellulaire de macrophages, lors de la formation de biofilm, et *in vivo* dans le modèle d'infection embryon de poisson-zèbre.

En parallèle à cette étude portant sur l'efficacité de MgtR contre *P. aeruginosa*, j'ai participé à la mise en œuvre d'une approche plus fondamentale visant à déterminer la structure de MgtC, puisqu'à ce jour aucune information structurale n'est disponible concernant le domaine membranaire de MgtC, cible de l'action du peptide antagoniste MgtR. Des données structurales de la protéine MgtC seule et

du complexe MgtC-MgtR permettraient de mieux comprendre la mécanistique de l'approche thérapeutique, et pourraient contribuer à l'optimiser.

2 Apport des mutants *mgtC et oprF* à l'étude du rôle de l'étape intramacrophagique dans l'infection à *P. aeruginosa*

Comme décrit précédemment, les mutants *mgtC* et *oprF* de *P. aeruginosa* sont déficients pour la survie intramacrophagique comparés à la souche sauvage (Belon *et al.,* 2015; Mittal *et al.,* 2016a). Afin d'élucider le mécanisme de résistance de *P. aeruginosa* à l'action bactéricide du macrophage, j'ai utilisé ces mutants dans des modèles *in cellulo* et *in vivo*, pour: (I) Tester le rôle des EPS dans la survie intramacrophagique du mutant *mgtC* de *P. aeruginosa*. (II) Évaluer l'implication de l'acidification du phagosome, un des principaux mécanismes de défense du macrophage, dans le devenir intracellulaire de *P. aeruginosa* (en particulier du mutant *oprF*). (III) Évaluer le rôle du macrophage *in vivo*, dans le contrôle de l'infection à *P. aeruginosa,* en utilisant le mutant *oprF* (phénotype plus marqué que le mutant *mgtC*). (IV) Enfin, évaluer *in vivo*, dans le modèle d'embryon de poisson-zèbre, le rôle du Cftr dans la clairance de *P. aeruginosa* et l'action bactéricide du macrophage. Ce rôle au niveau du macrophage (contribution à l'activité bactéricide, acidification) étant controversé, j'ai étudié pour la première fois l'embryon de poisson-zèbre *cftr*-/- dans le cas de l'infection à *P. aeruginosa.*

III. Résultats

1 Développement d'une stratégie antivirulence ciblant le facteur de virulence MgtC

1.1 Activité du peptide synthétique ciblant MgtC sur la survie intramacrophagique de *P. aeruginosa* et la formation de biofilm

1.1.1 Résumé de l'article 1 :

Parmi les espèces bactériennes hautement résistantes aux traitements antibiotiques, *Pseudomonas aeruginosa* pose un problème de santé majeur. Les stratégies antivirulence sont des moyens de luttes antimicrobiennes alternatifs qui visent à cibler des facteurs de pathogénicité tout en contournant la pression de sélection sur la bactérie.

La protéine membranaire MgtC a été proposée comme une cible intéressante, impliquée dans la capacité de *P. aeruginosa* à survivre dans les macrophages. En milieu de culture liquide, MgtC agit négativement sur la formation de biofilm. Cependant, le lien entre ces deux fonctions de MgtC (survie dans le macrophage et formation de biofilm) chez *P. aeruginosa* n'a pas été étudié expérimentalement.

Dans cette étude, nous avons examiné la contribution de différents composants d'exopolysaccharides (alginate, Psl, Pel), dans le défaut de survie intramacrophagique et l'augmentation de la formation de biofilm chez le mutant *mgtC* de *P. aeruginosa*. Nous avons montré qu'au cours de l'infection des macrophages, l'expression des gènes *psl* et *alg* est augmentée chez le mutant *mgtC* de *P. aeruginosa* par rapport à la souche sauvage. Ceci aurait pu expliquer le défaut de survie dans le macrophage du mutant *mgtC*. Cependant, l'introduction de la mutation *psl* ou *alg* n'a pas permis de restaurer la survie intramacrophagique du mutant *mgtC*, suggérant que le rôle intramacrophagique de MgtC n'est pas lié à la production des exopolysaccharides (EPS). Par contre, la formation élevée de biofilm du mutant *mgtC* a été partiellement atténuée par la mutation *psl*, indiquant une implication de Psl dans ce phénotype.

Ayant pour objectif de développer une stratégie antivirulence ciblant MgtC, basée sur l'utilisation du peptide antagoniste naturel MgtR, j'ai étudié pour la première fois l'effet biologique du peptide synthétique MgtR sur *P. aeruginosa.* Le traitement de la souche sauvage PAO1 de manière exogène par le peptide synthétique MgtR avant infection, a permis de réduire la survie intramacrophagique de la bactérie, mimant ainsi le phénotype du mutant *mgtC,* ainsi que l'effet du peptide MgtR produit de manière endogène. En corrélation avec ce résultat, l'ajout du peptide MgtR à la culture bactérienne réduit fortement le taux de protéines MgtC, sans avoir d'effet sur la croissance bactérienne ni la viabilité, ce qui rend le peptide MgtR différent des peptides antimicrobiens classiques. Par ailleurs,

l'ajout exogène de peptide MgtR n'a pas eu d'effet significatif sur la formation de biofilm, indiquant que l'action du peptide sur la protéine MgtC est indépendante du rôle de cette dernière sur la production d'EPS. Pris ensemble, nos résultats montrent une action antivirulence du peptide synthétique MgtR, et fournissent une preuve de concept pour une exploitation ultérieure de MgtR dans des stratégies de lutte anti-*Pseudomonas*.

Dans cette étude, les expériences d'expression génique intracellulaire ont été conduites par P. Garai, les expériences de biofilm ont été réalisées par P. Nogaret, et E. vives a réalisé la synthèse peptidique.

1.1.2 Article 1 – Activity of a Synthetic Peptide Targeting MgtC on *Pseudomonas aeruginosa* Intramacrophage Survival and Biofilm Formation

frontiers in Cellular and Infection Microbiology

ORIGINAL RESEARCH
published: 02 April 2019
doi: 10.3389/fcimb.2019.00084

Activity of a Synthetic Peptide Targeting MgtC on *Pseudomonas aeruginosa* Intramacrophage Survival and Biofilm Formation

Malika Moussouni[1,2], *Pauline Nogaret*[1,2†], *Preeti Garai*[1,2†], *Bérengère Ize*[3], *Eric Vivès*[4] and *Anne-Béatrice Blanc-Potard*[1,2*]

[1] Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, Université Montpellier, Montpellier, France, [2] CNRS, UMR5235, Montpellier, France, [3] Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, CNRS & Aix-Marseille University of Marseille, Marseille, France, [4] Centre de Recherche en Biologie cellulaire de Montpellier, CNRS UMR 5237, Montpellier, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Natalia V. Kirienko,
Rice University, United States

Reviewed by:
Ester Boix,
Autonomous University of Barcelona, Spain
Olivier Lesouhaitier,
Université de Rouen, France
Cezar M. Khursigara,
University of Guelph, Canada

***Correspondence:**
Anne-Béatrice Blanc-Potard
anne.blanc-potard@univ-montp2.fr

[†] These authors have contributed equally to this work

Specialty section:
This article was submitted to Clinical Microbiology, a section of the journal Frontiers in Cellular and Infection Microbiology

Received: 20 December 2018
Accepted: 11 March 2019
Published: 02 April 2019

Citation:
Moussouni M, Nogaret P, Garai P, Ize B, Vivès E and Blanc-Potard A-B (2019) Activity of a Synthetic Peptide Targeting MgtC on Pseudomonas aeruginosa Intramacrophage Survival and Biofilm Formation. Front. Cell. Infect. Microbiol. 9:84. doi: 10.3389/fcimb.2019.00084

Antivirulence strategies aim to target pathogenicity factors while bypassing the pressure on the bacterium to develop resistance. The MgtC membrane protein has been proposed as an attractive target that is involved in the ability of several major bacterial pathogens, including *Pseudomonas aeruginosa*, to survive inside macrophages. In liquid culture, *P. aeruginosa* MgtC acts negatively on biofilm formation. However, a putative link between these two functions of MgtC in *P. aeruginosa* has not been experimentally addressed. In the present study, we first investigated the contribution of exopolysaccharides (EPS) in the intramacrophage survival defect and biofilm increase of *mgtC* mutant. Within infected macrophages, expression of EPS genes *psl* and *alg* was increased in a *P. aeruginosa mgtC* mutant strain comparatively to wild-type strain. However, the intramacrophage survival defect of *mgtC* mutant was not rescued upon introduction of *psl* or *alg* mutation, suggesting that MgtC intramacrophage role is unrelated to EPS production, whereas the increased biofilm formation of *mgtC* mutant was partially suppressed by introduction of *psl* mutation. We aimed to develop an antivirulence strategy targeting MgtC, by taking advantage of a natural antagonistic peptide, MgtR. Heterologous expression of *mgtR* in *P. aeruginosa* PAO1 was shown to reduce its ability to survive within macrophages. We investigated for the first time the biological effect of a synthetic MgtR peptide on *P. aeruginosa*. Exogenously added synthetic MgtR peptide lowered the intramacrophage survival of wild-type *P. aeruginosa* PAO1, thus mimicking the phenotype of an *mgtC* mutant as well as the effect of endogenously produced MgtR peptide. In correlation with this finding, addition of MgtR peptide to bacterial culture strongly reduced MgtC protein level, without reducing bacterial growth or viability, thus differing from classical antimicrobial peptides. On the other hand, the addition of exogenous MgtR peptide did not affect significantly biofilm formation, indicating an action toward EPS-independent phenotype rather than EPS-related phenotype. Cumulatively, our results show an antivirulence action of synthetic MgtR peptide, which may be more potent against acute infection, and provide a proof of concept for further exploitation of anti-*Pseudomonas* strategies.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, antivirulence strategy, MgtC, peptide, macrophage, EPS

INTRODUCTION

The increasing understanding of bacterial pathogenesis has revealed potential strategies to develop novel drugs against infectious bacteria (Heras et al., 2015; Hauser et al., 2016; Mühlen and Dersch, 2016; Dickey et al., 2017). Interference with bacterial virulence is a promising alternative approach or a complementary adjunct to traditional antimicrobial therapy. This approach does not mediate direct bacterial killing, at least *in vitro*, therefore it is thought to apply less selective pressure for resistance and better preserve microbiota. The MgtC membrane protein has been proposed as a suitable target for antivirulence strategies because it is a virulence factor conserved in several bacterial pathogens (Alix and Blanc-Potard, 2007; Belon and Blanc-Potard, 2016). MgtC, which was first described in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S.* Typhimurium), is a critical factor for the intramacrophage survival of various unrelated intracellular pathogens (*Salmonella* spp., *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella suis* and *Burkholderia cenocepacia*), as well as so-called extracellular pathogens that can transiently reside within cells (*Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa*) (Blanc-Potard and Groisman, 1997; Buchmeier et al., 2000; Lavigne et al., 2005; Grabenstein et al., 2006; Maloney and Valvano, 2006; Belon et al., 2015).

The environmental bacterium and opportunistic human pathogen *P. aeruginosa* is responsible for a variety of acute infections and is a major cause of mortality in chronically infected cystic fibrosis (CF) patients. Due to the increasing number of antibiotic resistant clinical isolates, *P. aeruginosa* has been listed in the WHO top priority list for drug development (Tacconelli et al., 2018). The chronic infection of *P. aeruginosa* and its resistance to treatment is largely due to its ability to form biofilms, which relies on the production of exopolysaccharides (EPS), as reviewed by Klockgether and Tümmler (2017). Recent studies have highlighted the role of intracellular stages during *P. aeruginosa* infection, which may contribute to bacterial dissemination and *in vivo* resistance to antibiotics (Brannon et al., 2009; Buyck et al., 2013). In *P. aeruginosa*, *mgtC* expression is induced inside macrophages, which is consistent with its contribution to bacterial intramacrophage survival, and the *mgtC* mutant (in the PAO1 background) is attenuated in an acute model of infection in zebrafish embryos (Belon et al., 2015; Bernut et al., 2015). MgtC was also found to limit biofilm formation and EPS production in magnesium deprived medium, a condition known to activate *mgtC* transcription (Belon et al., 2015). Interestingly, MgtC has been shown to repress cellulose production in *S.* Typhimurium, which in turn promotes bacterial replication within macrophages (Pontes et al., 2015). Cellulose is not produced by *P. aeruginosa*, but these results suggested a potential link between the production of *P. aeruginosa* EPS and intramacrophage behavior (Belon et al., 2015; Bernut et al., 2015). Three polysaccharides, namely Psl, Pel and alginate, compose *P. aeruginosa* EPS (Wei and Ma, 2013), and contribute to the formation of biofilms (Ghafoor et al., 2011). Psl has a major contribution in biofilm formation, being required for adhesion of bacteria, which is critical for biofilm initiation, as well as maintenance of the biofilm structure. Pel is responsible for pellicle formation on air-liquid interface and formation of solid surface-associated biofilms. Pel could function together with other EPS throughout biofilm development in *P. aeruginosa* PAO1, although in a less important way as compared to Psl (Yang et al., 2011). Alginate is the exopolysaccharide that is mainly produced by *P. aeruginosa* clinical isolates from the lungs of CF patients, where it plays important roles in structural stability and protection of biofilms. However, it is not absolutely required during the formation of non-mucoid biofilms *in vitro*, as shown for PAO1 strain (Wozniak et al., 2003)

Of interest in the context of an antivirulence approach, a natural peptide antagonistic to MgtC has been described. This peptide, called MgtR, is a very small membrane protein of 30 amino-acids (thus referred as peptide) identified in *S.* Typhimurium, where it promotes the degradation of the MgtC virulence factor by FtsH protease (Alix and Blanc-Potard, 2008; Lee and Groisman, 2010). MgtR is part of a novel class of regulatory molecules that can interact with membrane proteins and can subsequently act on the stability of these membrane proteins (Alix and Blanc-Potard, 2009; Lippa and Goulian, 2009; Wang et al., 2017). Overexpression of *mgtR* reduced intramacrophage survival of a wild-type *Salmonella* strain, thus indicating that MgtR can lower *Salmonella* virulence (Alix and Blanc-Potard, 2008). MgtR has been shown to directly interact with the *Salmonella* MgtC membrane protein (Alix and Blanc-Potard, 2008). Moreover, the *Salmonella* MgtR membrane peptide can also interact with MgtC protein from *M. tuberculosis* and *P. aeruginosa* (Belon et al., 2015, 2016). *M. tuberculosis* and all *P. aeruginosa* strains naturally lack *mgtR* gene, but ectopic expression of *Salmonella mgtR* in mycobacteria and *P. aeruginosa* mimicked the phenotypes reported for *mgtC* deletion mutants (Belon et al., 2015, 2016). Thus, these findings show an antivirulence action of MgtR upon endogenous production in several bacterial pathogens.

In the present study, we addressed the contribution of EPS to the phenotypes of *P. aeruginosa mgtC* mutant and investigated further an antivirulence strategy targeting MgtC on *P. aeruginosa*. We first investigated the contribution of individual EPS components (alginate, Psl and Pel) to the intramacrophage survival defect of *P. aeruginosa mgtC* mutant as well as biofilm formation. Then, studies with synthetic peptide added exogenously were carried out for the first time to further evaluate the efficiency of an antivirulence strategy based on MgtR. We investigated the biological effect of a synthetic MgtR peptide toward *P. aeruginosa* ability to survive inside macrophages and form biofilm.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains and Growth Conditions

Bacterial strains and plasmids are described in **Table 1**. *P. aeruginosa* strains are in the PAO1 background. *P. aeruginosa* was grown at 37°C in Luria broth (LB). Growth in magnesium-deprived medium was done in No-carbon essential (NCE)-minimal medium (28 mM KH_2PO_4, 28 mM $K_2HPO_4{\cdot}3H_2O$, 16 mM $NaNH_4HPO_4{\cdot}4H_2O$) supplemented with 0.1% casamino

TABLE 1 | Bacterial strains and plasmids used in the study.

Name	Description	References
PAO1	Wild-type	Laboratory collection
PAO1 Δ*mgtC*		Belon et al., 2015
PAO1 Δ*alg8*	*alg8* deletion mutant	Periasamy et al., 2015
PAO1 Δ*mgtC* Δ*psl*	Δ*mgtC* Δ*pslD*	This study
PAO1 Δ*mgtC* Δ*alg*	Δ*mgtC* Δ*alg8*	This study
pRK2013	Tra^+, Mob^+, ColE1, KmR	Laboratory collection
pMF230	GFP*mut2*	Nivens et al., 2001
pKNG101	Suicide vector Sm^R; *sacB*$^+$	Kaniga et al., 1991
pKNG*pslD*	Δ*pslD* deletion in pKNG101	This study
pSBC44	Δ*mgtC* deletion in pKNG101	Belon et al., 2015

acids, 38 mM glycerol and 10 μM $MgSO_4$ as described earlier (Rang et al., 2007). Plasmid pMF230 (constitutive GFP expression, obtained from Addgene) was introduced in *P. aeruginosa* by conjugation, using an *E. coli* strain containing pRK2013. Recombinant bacteria were selected on *Pseudomonas* isolation agar (PIA) containing carbenicillin at the concentration of 300 μg/ml. Construction of *mgtC psl* and *mgtC alg* double mutant strains was done as described earlier (Belon et al., 2015) by allelic exchange of the *pslD* gene in *mgtC* mutant using a pKNG*pslD* suicide plasmid or allelic exchange of the *mgtC* gene in the *alg8* mutant (harboring a deletion of *alg* operon) using the pSBC44 suicide plasmid, respectively (**Table 1**).

Peptide Synthesis

MgtR peptide (MNRSPDKIIALIFLLISLLVLCLALWQIVF) was synthesized by a solid-phase method using the Fmoc methodology on an automated microwave peptide synthesizer (Liberty-1, CEM, Orsay, France) as previously described (Belon et al., 2016). H-Rink amide ChemMatrix resin (100 micromoles, substitution 0.37 mmol/g, Longjumeau, France) was used. The peptide was synthesized following a double-coupling step for each amino acid (400 micromoles) activated with TBTU (500 micromoles). Additionally an acetylation step was applied at the end of each amino-acid incorporation to prevent the formation of incomplete peptides. At the end of the assembly, the N-terminal Fmoc was kept on the peptide and the peptide/resin was stored at 4°C under inert atmosphere. When required, peptide/resin was treated to remove the Fmoc group, rinsed and dried under vacuum before the final deprotection procedure. The peptide/resin was then treated with 10 ml/g of cleavage cocktail (trifluoroacetic acid/triisopropylsilane/H_2O/1,2-ethanedithiol (94/1/2.5/2.5%: vol/vol) at room temperature for 90 min. The peptide was then precipitated with cold ether and centrifuged before resuspension in acetonitrile/water (30/70: vol/vol), freezing and freeze-drying. The final product was resuspended in isopropanol/water (50%/50%: vol/vol) without any purification and analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry. The expected mass is 3,456.39 and the measured one was 3,456.78 ($[MH]^+$). Circular dichroism spectra were recorded on a Jasco 810 (Japan) dichrograph in quartz suprasil cells (Hellma) with an optical path of 1 mm using 40 μM peptide in 30% isopropanol with and without SDS 4%. For experimentations, peptide was resuspended at a concentration of 3.2 mM in DMSO/water (50%/50%: vol/vol) and sonicated for 15 min before use. Using the same procedure, we also synthesized a scrambled peptide based on the amino-acid sequence of MgtR (permutation of the original peptide, ILFVADSLQMIPLCLRIWVALKINILFSVL). The measured mass correlated with the expected one.

Infection of Macrophages and Quantification of Intracellular Bacteria

J774 cells (J774A.1) were maintained at 37°C in 5% CO_2 in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco). The infection of J774 macrophages by *P. aeruginosa* was carried out essentially as described previously (Belon et al., 2015). Mid-log phase *P. aeruginosa* grown in LB broth was centrifuged and resuspended in PBS to infect J774 macrophages (5×10^5 cells/well) at an MOI of 10. After 5 min centrifugation of the 24-well culture plate for synchronization of infection, bacterial phagocytosis was allowed to proceed for 25 min. Cells were washed three times with sterile PBS and fresh DMEM media supplemented with 400 μg/ml gentamicin was added, which was retained throughout the infection. Macrophages were lysed after 20 min (T0) or 2 h (T1) of gentamicin treatment, by using 0.1% Triton X-100 and the number of viable bacteria was determined by subsequent plating onto LB agar plates. The percentage of survival was obtained by multiplying with 100 the ratio of the bacterial colony forming units (CFU) at T1 to that of T0.

RNA Extraction and Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

For bacterial RNA extraction from infected J774, 6.5×10^6 macrophages were seeded into a 100 cm^2 tissue culture dish and infected at an MOI of 10 as described above. One hour after phagocytosis, cells were washed three times with PBS, lysed with 0.1% Triton X100 and pelleted by centrifugation at 13,000 rpm for 10 min at 15°C. Bacteria were resuspended in 500 μl PBS and the non-resuspended cellular debris were discarded. 900 μl of RNA protect reagent (Qiagen) was added and incubated for 5 min. The sample was centrifuged at 13,000 rpm for 10 min. Bacteria in the pellet were lysed with lysozyme and RNA was prepared with RNEasy kit (Qiagen). Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) was used for reverse transcription. Controls without reverse transcriptase were done on each RNA sample to rule out possible DNA contamination. Quantitative real-time PCR (Q-RT-PCR) was performed using a Light Cycler 480 SYBR Green I Master mix in a 480 Light Cycler instrument (Roche). PCR conditions were as follows: 3 min denaturation at 98°C, 45 cycles of 98°C for 5 s, 60°C for 10 s, and 72°C for 10 s. The sequences of primers used for RT-PCR are listed in **Supplemental Table 1**.

LDH Assay

The cytotoxicity of synthetic peptide was assessed by release of lactate dehydrogenase (LDH) using the Pierce LDH cytotoxicity assay kit (Thermo Scientific). Macrophages were seeded in a 96 well plate and treated with peptide (120 μM) for 18 h. The assay

was performed on 50 µl of the culture supernatant according to manufacturer's instructions. The percentage of LDH release was first normalized to that of the untreated control and then calculated relatively to that of untreated cells lysed with Triton X-100, which was set at 100% LDH release.

Biofilm Formation

Biofilm formation in LB medium was carried out in 96-well plate. Overnight culture of PAO1, grown in LB, was diluted 1:100 in LB and 200 µl was aliquoted in 96-well plate in triplicates. Peptide was added at the concentration of 120 µM and DMSO (2% final) was used as solvent control. The plate was incubated at 28°C for 48 h under static condition. After 48 h, culture was discarded and wells were washed with water. Biofilm appeared in the form of rings on the walls of the wells. Crystal Violet (CV) was added to each well to stain the biofilm for 15 min at room temperature. After staining, wells were washed with water to remove excess of CV and 70% ethanol was added to dissolve the stain. The dissolved stain was taken in a fresh plate to measure the absorbance at 570 nm.

Biofilm formation in low magnesium medium was carried out in glass tubes. Overnight culture of bacterial strains, grown in LB, was washed with NCE medium and diluted 1:20 into 500 µl of NCE medium supplemented with 10 µM Mg^{2+} in the glass tube. MgtR peptide was added at the concentration of 120 µM and DMSO was used as solvent control. The glass tubes were incubated at 30°C for 24 h under static condition. Staining of biofilm ring with CV (0.1%) was quantified as described above. To measure bacterial viability, aliquots of bacterial culture and PBS-washed ring were diluted in PBS for CFU counting.

Preparation of Lysates From Bacterial Cultures Treated With Synthetic Peptide

Overnight culture of *P. aeruginosa* grown in LB medium was diluted 1:5 in LB and grown until OD_{600nm} of 0.8 to 1. Bacteria were washed in NCE medium (Blanc-Potard and Groisman, 1997) without magnesium and were resuspended in the same medium supplemented with 10 µM Mg^{2+} and synthetic peptides (at the indicated concentration) or DMSO as control. Bacteria were harvested after 4–5 h of incubation at 37°C. To prepare whole-cell extracts, cultures were normalized to OD_{600nm}, centrifuged, re-suspended in Laemmli buffer and lysed by heating at 95°C for 10 min before performing Western Blot assay.

Preparation of Anti-PA4635 Antibodies

A DNA fragment encoding the C-terminal domain of MgtC (PA4635) was amplified using primers indicated in **Supplemental Table 1** and cloned into pQE30 vector (Qiagen). Recombinant plasmid was introduced into M15/pRep4 *E. coli* strain to express and purify the His-tagged recombinant protein as described (Alix and Blanc-Potard, 2008). Polyclonal antibodies were produced upon immunization of rabbit with the PA4635 C-ter domain (Eurogentec).

Western Blot Analysis

Total bacterial lysates were electrophoresed on 12.5% SDS-PAGE gels and transferred onto nitrocellulose membrane (Invitrogen) for immunoblotting. Rabbit anti-PA4635 were used at 1:2,000 dilution and Mouse anti-EF-Tu antibody (Ball et al., 2016) was used at 1:20,000 dilution. Anti-rabbit or anti-mouse antibodies (dilution 1:30,000) labeled with fluorescent dye DyLight 800 (Thermoscientific) were used for the detection of PA4635 and EF-Tu using LICOR Odyssey Fc Imaging System (excitation 783 nm and emission 797 nm) to quantify the amount of proteins.

RESULTS AND DISCUSSION

Contribution of EPS to the Intramacrophage Survival Defect and Biofilm Phenotype of *P. aeruginosa*

In vitro, P. aeruginosa PAO1 produces mainly Psl and Pel, whereas alginate synthesis is negatively regulated in this non-mucoidal strain by the anti-sigma factor of MucA (Schurr et al., 1996; Franklin et al., 2011). However, the expression of EPS genes has not been measured when PAO1 resides in macrophages. To address a putative link between the intramacrophage survival defect of *P. aeruginosa mgtC* mutant and EPS production, we first analyzed the level of expression of candidate individual EPS genes, *pelA, pslA*, and *algE*, in *P. aeruginosa mgtC* mutant and wild-type strain residing in J774 macrophages. Each of these genes is a part of the respective operons required for synthesis of Pel, Psl and alginate polysaccharides (Franklin et al., 2011). A significant increased expression of *pslA* and, to a lesser extent, *algE* was detected in *mgtC* mutant as compared to wild-type strain, whereas *pelA* expression remained unaltered (**Figure 1**), suggesting a higher production of Psl and alginate inside macrophages by *mgtC* mutant.

A *Salmonella mgtC* mutant has been reported to exhibit increased production of cellulose, another type of exopolysaccharide, inside macrophages, and the intramacrophage replication defect of the *Salmonella mgtC* mutant could be reversed by an additional mutation in the *bcsA* gene that prevented cellulose synthesis (Pontes et al., 2015). To investigate whether the intramacrophage survival defect of the *P. aeruginosa mgtC* mutant could be related to increased Psl or alginate production within macrophages, we constructed *mgtC pslD,* and *mgtC alg8* double mutants (see Materials and Methods), because *pslD* and *alg8* are essential for Psl and alginate synthesis, respectively (Remminghorst and Rehm, 2006; Byrd et al., 2009). No rescue in the survival inside macrophages was observed for *mgtC* mutant in the presence of *psl* or *alg* mutation (**Figure 2A**), indicating that the survival defect of *P. aeruginosa mgtC* mutant is not linked to increased production of Psl or alginate. Thus, despite the observed increased expression of *psl* and *alg* genes, EPS did not contribute to the intramacrophage phenotype of *P. aeruginosa mgtC* mutant. These findings differ from the results obtained in *S.* Typhimurium with *mgtC bcsA* double mutant (Pontes et al., 2015). In contrast to *P. aeruginosa*, *Salmonella* actively replicates inside macrophages, and increased

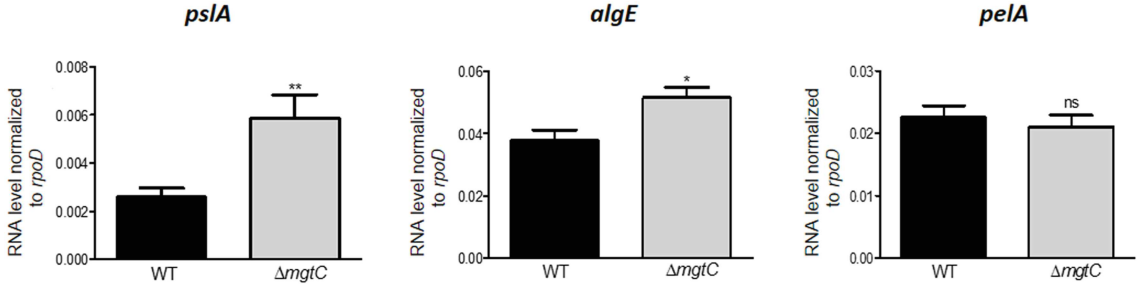


FIGURE 1 | Expression of EPS genes in *P. aeruginosa* strains residing in J774 macrophages. Expression of EPS genes in strains PAO1 wild-type (WT) and Δ*mgtC* mutant infecting J774 macrophages. RNA was extracted from bacteria isolated from infected macrophages 1 h after phagocytosis. The level of *pslA*, *algE*, and *pelA* transcripts relative to those of the house-keeping gene *rpoD* was measured by qRT-PCR and plotted on the Y-axis. Error bars correspond to standard errors from at least three independent experiments. The asterisks indicate *P*-values (Student's t-test $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$), showing statistical significance with respect to WT.

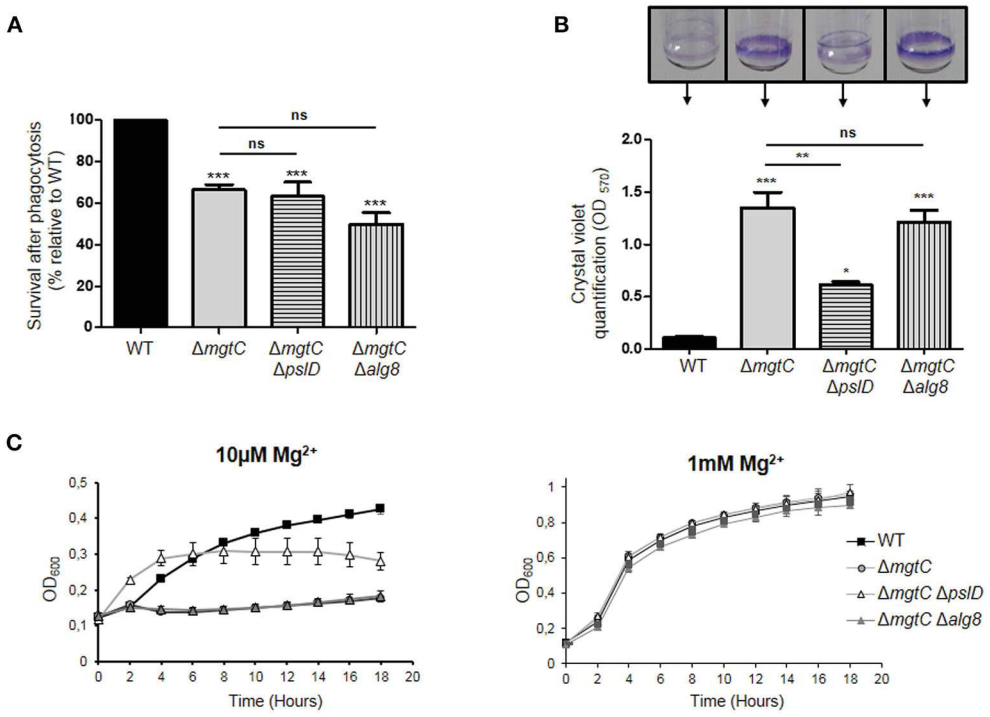


FIGURE 2 | Phenotypes of *mgtC pslD* and *mgtC alg8* double mutants. **(A)** Behavior of *mgtC pslD* and *mgtC alg8* double mutant within J774 macrophages. Survival of *P. aeruginosa* PAO1 WT, Δ*mgtC*, Δ*mgtC* Δ*pslD* and Δ*mgtC* Δ*alg8* strains was assessed upon phagocytosis by J774 macrophages. Results are expressed as percentage of surviving bacteria 2 h after phagocytosis compared to the number of bacteria 20 min after phagocytosis and are normalized to 100% for WT strain. Error bars correspond to standard errors from four independent experiments. The asterisks indicate *P*-values (One-way ANOVA followed by a Bonferroni post-test. $^{***}P < 0.001$). **(B)** Quantification of bacterial adherence to glass tubes to infer the ability of strains to form biofilm. *P. aeruginosa* strains PAO1 WT, Δ*mgtC,* Δ*mgtC* Δ*pslD*, and Δ*mgtC* Δ*alg8* were grown at 30°C for 24 h in NCE medium with 10 μM $MgSO_4$. The biofilm quantification is visualized by CV ring on the glass tubes and CV is quantified at 570 nm. Error bars correspond to standard errors (+SE) from three independent experiments and the asterisks indicate *P*-values (One-way ANOVA followed by a Bonferroni post-test, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$). **(C)** Growth curve of *P. aeruginosa* strains PAO1, Δ*mgtC,* Δ*mgtC* Δ*pslD* and Δ*mgtC* Δ*alg8* in NCE medium supplemented with 10 μM (left panel) or 1 mM (right panel) $MgSO_4$. The results are expressed as the mean ± SD of three independent experiments.

cellulose production may somehow contribute to the replication defect of *Salmonella mgtC* mutant within macrophages.

As reported earlier, the formation of biofilm was found to be significantly increased for *mgtC* mutant comparatively to wild-type strain in low magnesium medium (**Figure 2B**), a condition that induces expression of *mgtC* gene (Belon et al., 2015). The formation of biofilm of *mgtC alg8* double mutant was identical to the one of *mgtC* mutant, whereas the biofilm formation was significantly reduced in *mgtC pslD* double mutant comparatively to *mgtC* mutant (**Figure 2B**). This finding correlated with the growth curves of the different strains in low magnesium (10 μM) medium (**Figure 2C**), where growth of *mgtC* mutant

was impaired in low magnesium medium comparatively to wild-type strain, and presence of a *pslD* mutation, but not an *alg8* mutation, improved the growth of the *mgtC* mutant (**Figure 2C**). All strains grew similarly in medium supplemented with 1 mM magnesium (**Figure 2C**).

Non-mucoid *P. aeruginosa* strains, as PAO1, utilize primarily the Psl and Pel polysaccharides for biofilm formation, whereas alginate is the predominant extracellular polysaccharide of the matrix of mucoid strains (Wozniak et al., 2003). Our results indicate that Psl polysaccharide, which is known to be more important than Pel polysaccharide in *P. aeruginosa* PAO1 biofilm formation (Yang et al., 2011), contributes to the increased biofilm formation and impaired growth of *mgtC* mutant in magnesium deprived medium. The growth defect of the *mgtC* mutant in low magnesium medium is associated with the formation of bacterial aggregates both on the tube (at the air-liquid level) and within the culture, thus reminiscent of biofilm initiation. This is consistent with the contribution of Psl, which is known to be produced during planktonic growth, mediating attachment to surfaces and contributing to microcolony formation (Ghafoor et al., 2011).

Effect of Synthetic MgtR Peptide on Macrophage Survival of Wild-Type *P. aeruginosa* PAO1 Strain

P. aeruginosa naturally lacks *mgtR* gene, but ectopic expression of *Salmonella mgtR* in *P. aeruginosa* reduced intramacrophage survival, thus mimicking the phenotype reported for *mgtC* deletion mutant (Belon et al., 2015). To investigate the effect of exogenous addition of peptide, we added synthetic MgtR peptide to *P. aeruginosa*. The MgtR peptide, which harbors 73% of hydrophobic residues, is predicted to be organized in a single transmembrane helix (**Figure 3A**), which has been confirmed by an NMR structural analysis (Jean-Francois et al., 2014). MgtR was chemically synthesized using optimized protocol for hydrophobic peptides (see Materials and Methods) and the alpha-helical fold was verified by circular dichroism (**Supplemental Figure S1**). To address the effect of synthetic peptide on the ability of wild-type *P. aeruginosa* PAO1 strain to survive inside macrophages, bacteria were treated for 15 min, before phagocytosis, with 120 μM of peptide solubilized in DMSO. Bacteria pretreated with DMSO were used as control. Phagocytosis by J774 macrophages was allowed for 30 min before removing extracellular bacteria with PBS washes and gentamicin treatment. The bacterial survival was then monitored for 2 h after phagocytosis. Bacteria treated with MgtR peptide had a significantly lower intramacrophage survival than bacteria treated with DMSO, which is in the same range as the one observed for *mgtC* mutant (**Figure 3B**). Interestingly, addition of MgtR peptide did not lower the survival of *mgtC* mutant, suggesting that the presence of MgtC plays a role in the biological activity of the synthetic peptide toward macrophage infection (**Figure 3B**). In the condition used, the MgtR peptide is not cytotoxic to J774 cells as shown by quantification of LDH release (**Supplemental Figure S2**). We designed and synthesized a scrambled peptide that contained the amino-acids of MgtR in a scrambled order, thus retaining the hydrophobicity, but lacking a predicted membrane helix, as shown using the TMHMM program (**Figure 3A**). As expected, the scrambled peptide exhibited a circular dichroism spectra that differs from the one of MgtR, indicative of a loss of the alpha-helix structure (**Supplemental Figure S1**). Importantly, no significant decrease of intramacrophage survival was observed with this scrambled peptide used at 120 μM (**Figure 3C**), suggesting that the biological effect of the synthetic MgtR peptide is somehow linked to sequence specificity and not only to overall hydrophobicity.

Intramacrophage survival assay with wild-type *P. aeruginosa* strain showed that addition of exogenous MgtR peptide mimics the phenotype of *mgtC* mutant as well as the effect previously reported upon endogenous expression of the peptide in PAO1, supporting a biological activity exhibited by this synthetic peptide. Moreover, this biological activity is linked to the presence of MgtC.

Effect of Synthetic MgtR Peptide on MgtC Protein Level, Bacterial Growth and Biofilm Formation With *P. aeruginosa* Wild-Type PAO1

To address the mechanism of action of MgtR peptide, we have conducted additional experiments upon addition of the peptide to *P. aeruginosa* bacterial cultures. Because endogenous MgtR peptide drives MgtC to degradation in *S.* Typhimurium (Alix and Blanc-Potard, 2008), we investigated the effect of synthetic MgtR peptide on the level of *P. aeruginosa* MgtC protein. Total lysates were prepared from bacteria grown in magnesium deprived medium, a condition that induces expression of *mgtC* gene (Belon et al., 2015), treated or not with peptide. Western blotting was carried out with anti-MgtC antibodies (see Materials and Methods). Hybridization with antibodies against EF-Tu were used as control (Ball et al., 2016). Addition of peptide to bacterial culture caused a decrease in the level of MgtC in a dose responsive manner, with the highest reduction at a final concentration of 120 μM, whereas the level of EF-Tu control protein remained unchanged (**Figure 4A**). In contrast to MgtR, the scrambled peptide had only a minor effect on the level of MgtC protein (**Figure 4B**).

We also monitored the effect of MgtR on bacterial viability and growth, to determine whether MgtR behaves as the known antimicrobial peptides. The effect of MgtR on the level of MgtC protein is not related to an effect on bacterial viability in NCE medium (**Figure 4C**), which is consistent with the constant level of EF-Tu control protein. We have also shown that addition of MgtR peptide had no effect on bacterial growth in LB medium (**Figure 4D**), indicating that synthetic MgtR does not have a classical antibacterial effect.

We further investigated the effect of MgtR on the ability of *P. aeruginosa* to form biofilm. We first tested biofilm formation of PAO1 strain grown in LB medium. Addition of MgtR did not change significantly the ability of PAO1 to form biofilm (**Figure 5A**). Biofilm formation was also tested in magnesium deprived medium. As shown before, increased biofilm formation is seen with the *mgtC* mutant strain comparatively to wild-type strain, but no significant increase is detected upon

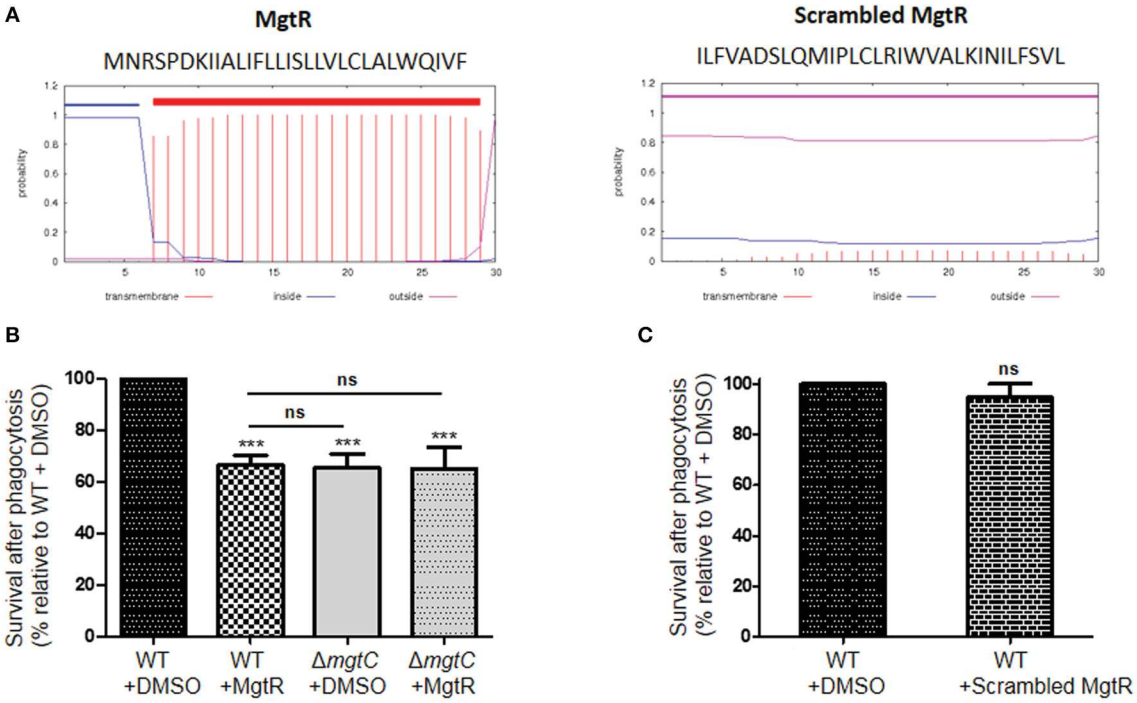


FIGURE 3 | Effect of synthetic MgtR peptide on *P. aeruginosa* intramacrophage survival. **(A)** Sequence and transmembrane helix prediction for MgtR and scrambled MgtR peptides, using TMHMM program (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/). **(B)** To test the effect of synthetic MgtR peptide on *P. aeruginosa* intramacrophage survival, PAO1 WT strain was treated with 120 μM of MgtR peptide or DMSO for 15 min before phagocytosis. A Δ*mgtC* mutant treated with DMSO or MgtR peptide (120 μM) is used as control. Error bars correspond to standard errors (+SE) from at least four experiments. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA followed by a Bonferroni post-test, ***$P < 0.001$. **(C)** To test the effect of synthetic scrambled MgtR peptide on *P. aeruginosa* intramacrophage survival, PAO1 WT strain was treated with 120 μM of MgtR scrambled peptide or DMSO for 15 min before phagocytosis. Error bar corresponds to standard errors (+SE) from at least three experiments. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA followed by a Bonferroni post-test.

addition of MgtR peptide to PAO1 strain in the condition tested (**Figure 5B**). Moreover, bacterial viability, in the ring or in the planktonic fraction, is not significantly modified in PAO1 treated with MgtR comparatively to non-treated bacteria (**Supplemental Figure S3**).

Cumulatively, we have shown that, in addition to reduce intramacrophage survival, the biological action of synthetic MgtR is associated with a decreased level of MgtC protein, without any effect on growth rate. Despite the decreased level of MgtC, the exogenous peptide had no effect on biofilm formation. A similar finding was found upon endogenous production of MgtR (**Supplemental Figure S4**). These results may indicate that the effect of MgtR is delayed upon long term phenotype, such as biofilm. We cannot exclude a deterioration of the peptide with time. In addition, or alternatively, MgtR may also act by preventing protein-protein interaction relevant for intramacrophage survival but not for biofilm formation.

CONCLUSION

Antivirulence strategies are being increasingly considered in the age of antibiotic resistance (Dickey et al., 2017) and we have previously proposed MgtC as a valuable target with a potent inhibitory peptide, MgtR. The function of MgtC has been mainly studied in *S.* Typhimurium, where it exhibits pleiotropic roles, including inhibition of F_1Fo ATP synthase (Lee et al., 2013) and modulation of cellulose production (Pontes et al., 2015). Our results provide a link between *P. aeruginosa* MgtC and EPS production and show an implication of EPS, more specifically Psl, for the increased biofilm formation of *mgtC* mutant in magnesium deprived medium. However, EPS are not involved in the intramacrophage behavior of *P. aeruginosa mgtC* mutant, thus differing from the role reported for cellulose in the intracellular pathogen *S.* Typhimurium.

Our previous results indicated that endogenous production of MgtR lowered the intramacrophage survival of wild-type *P. aeruginosa* PAO1 strain (Belon et al., 2015). Using for the first time a synthetic MgtR peptide on PAO1 strain led to a similar effect, associated with a decrease of MgtC protein level, thus supporting the use of such peptide to target the MgtC virulence factor. MgtR did however not increase significantly biofilm formation, indicating an action towards EPS-independent phenotype rather than EPS-related phenotype. The lack of significant effect with a synthetic scrambled peptide derived from MgtR suggested that biological activity of synthetic MgtR peptide is somehow linked to sequence specificity and not to overall hydrophobicity. Hydrophobic compounds as MgtR remain difficult to handle and therefore improving peptide solubility, while keeping efficiency, will be valuable. The interest for peptides as new therapeutic molecules has recently increased

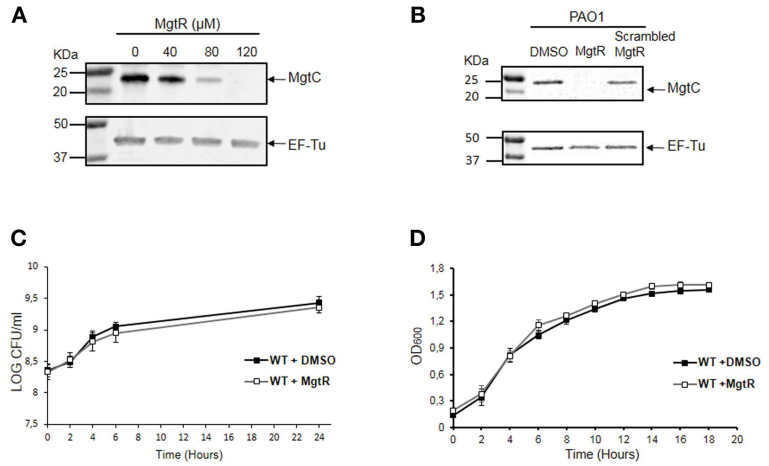


FIGURE 4 | Effect of synthetic MgtR peptide on the level of MgtC protein and on *P. aeruginosa* growth rate. **(A)** Effect of MgtR peptide on MgtC level is evaluated on total lysates of PAO1 WT bacteria incubated during 4 h with different concentrations of MgtR peptide in NCE medium supplemented with 10 μM $MgSO_4$. The membranes were probed with the anti-MgtC and anti-EF-Tu antibodies, as loading control. A representative experiment out of three independent experiments is shown. The quantified ratio PA4635/EF-Tu is 1, 0.95, 0.28, 0.01 for MgtR concentrations of 0, 40, 80, and 120 μM, respectively. **(B)** Effect of a scrambled peptide derived from MgtR on the level of MgtC protein. PAO1 WT bacteria were grown for 1.5 h in NCE medium supplemented with 10 μM $MgSO_4$ before addition of 120 μM MgtR or 120 μM scrambled MgtR and were incubated further for 5 h before harvesting total lysates for blotting. A representative experiment out of three independent experiments is shown. **(C)** Effect of MgtR peptide on bacterial viability in NCE medium. PAO1 WT strain was treated with 120 μM MgtR and incubated in NCE medium supplemented with 10 μM $MgSO_4$ for 24 h. At indicated time points, 10 μl of the culture was collected and diluted on LB agar plate to quantify CFUs. The results are expressed as the mean ± SD of three independent experiments. **(D)** Effect of MgtR peptide (120 μM) on the bacterial growth of PAO1 WT in LB medium. The results are expressed as the mean ± SD of three independent experiments.

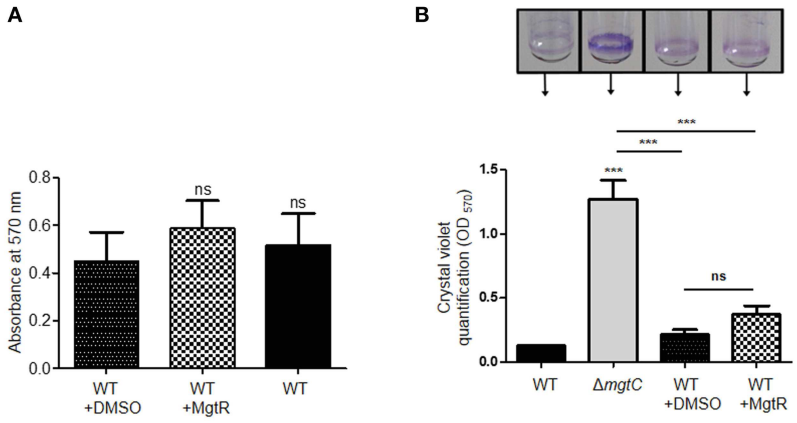


FIGURE 5 | Biofilm formation in the presence of synthetic MgtR peptide. **(A)** Quantification of bacterial adherence in LB medium. PAO1 WT strain was incubated with 120 μM MgtR peptide or DMSO as control in LB and allowed to form biofilm at 28°C for 48 h in 96 well plate. Biofilm was stained with crystal violet and absorbance was measured at 570 nm. Statistical analysis was done on three independent experiments by one way ANOVA, where all samples were compared to DMSO using Dunnet's multiple comparison post-test, showing statistical significance with respect to DMSO control (ns > 0.05, non-significant). **(B)** Quantification of bacterial adherence to glass tubes in magnesium deprived medium. Adherence assay was carried out with PAO1 WT and Δ*mgtC* strains grown at 30°C for 24 h in NCE medium with 10 μM $MgSO_4$ supplemented or not with 120 μM MgtR peptide. The ring on the glass tube is visualized by crystal violet staining and quantified by measuring OD_{570}. Error bars correspond to standard errors (+SE) from three independent experiments and the asterisks indicate *P*-values (One-way ANOVA followed by a Bonferroni post-test, ***$P < 0.001$).

(Kruger, 2017), and peptide modulators of protein-protein interaction in membranes are promising molecules (Stone and Deber, 2017). The present work thus identifies a synthetic hydrophobic peptide, issued from a natural bacterial peptide, which could limit bacterial pathogenesis and which differs from classical anti-microbial peptides (Mahlapuu et al., 2016) because of lack of effect on bacterial viability.

Further work will be required to decipher the mechanism of action of synthetic MgtR peptide. Our present results show that peptide addition is associated with a decreased level of MgtC protein but, as suggested earlier, MgtR may also prevent protein-protein interaction involving the MgtC protein (Belon et al., 2016). The lack of effect of MgtR peptide in the context of a *mgtC* mutant suggests that its biological effect is mainly related

to the presence of MgtC protein. Despite this finding and the absence of noticeable growth defect upon addition of MgtR, it would be of interest to test in a more general way the impact of synthetic MgtR on membrane fluidity and integrity. Interestingly, MgtR does not appear to modulate biofilm formation, suggesting that MgtR may act more specifically during acute infection than chronic infection. Given the proof of concept provided by our results on infected cells with PAO1 strain, further work will be required to test the efficiency of such peptide on *P. aeruginosa* clinical isolates and in an animal model of infection.

DATA AVAILABILITY

All datasets generated for this study are included in the manuscript and/or the **Supplementary Files**.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MM, PG, and A-BB-P conceived the project. MM, PN, PG, and A-BB-P designed and analyzed the experiments. MM, PN, and PG performed the experiments. BI performed construction of double mutants and EV carried out peptide synthesis and circular dichroism analysis. MM, PG, and A-BB-P wrote the paper and all authors edited and approved the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Scott Rice (NTU, Singapore) and Sophie Bleves (Marseille, France) for providing strains. We are grateful to Pascal Verdié from the SynBio3 platform for providing peptide synthesis facilities, to Albert Meyer for performing MALDI spectrometry analysis, both from the Institut des Biomolécules Max Mousseron, Montpellier. This work is supported by Vaincre La Mucoviscidose (RIF20170502042) and Association Gregory Lemarchal. MM is supported by Vaincre La Mucoviscidose (RIF20170502042) and PG is supported by the Association Méditerranée Infection.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2019.00084/full#supplementary-material

REFERENCES

Alix, E., and Blanc-Potard, A. B. (2007). MgtC: a key player in intramacrophage survival. *Trends Microbiol.* 15, 252–256. doi: 10.1016/j.tim.2007.03.007

Alix, E., and Blanc-Potard, A. B. (2008). Peptide-assisted degradation of the *Salmonella* MgtC virulence factor. *EMBO J.* 27, 546–557. doi: 10.1038/sj.emboj.7601983

Alix, E., and Blanc-Potard, A. B. (2009). Hydrophobic peptides: novel regulators within bacterial membrane. *Mol. Microbiol.* 72, 5–11. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06626.x

Ball, G., Antelmann, H., Imbert, P. R., Gimenez, M. R., Voulhoux, R., and Ize, B. (2016). Contribution of the twin arginine translocation system to the exoproteome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* 6:27675. doi: 10.1038/srep27675

Belon, C., and Blanc-Potard, A. B. (2016). Intramacrophage survival for extracellular bacterial pathogens: MgtC as a key adaptive factor. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6:52. doi: 10.3389/fcimb.2016.00052

Belon, C., Rosas Olvera, M., Vives, E., Kremer, L., Gannoun-Zaki, L., and Blanc-Potard, A. B. (2016). Use of the *Salmonella* MgtR peptide as an antagonist of the *Mycobacterium* MgtC virulence factor. *Future Microbiol.* 11, 215–225. doi: 10.2217/fmb.15.134

Belon, C., Soscia, C., Bernut, A., Laubier, A., Bleves, S., and Blanc-Potard, A. B. (2015). A Macrophage subversion factor is shared by intracellular and extracellular pathogens. *PLoS Pathog.* 11:e1004969. doi: 10.1371/journal.ppat.1004969

Bernut, A., Belon, C., Soscia, C., Bleves, S., and Blanc-Potard, A. B. (2015). Intracellular phase for an extracellular bacterial pathogen: MgtC shows the way. *Microb. Cell.* 2, 353–355. doi: 10.15698/mic2015.09.227

Blanc-Potard, A. B., and Groisman, E. A. (1997). The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J.* 16, 5376–5385. doi: 10.1093/emboj/16.17.5376

Brannon, M. K., Davis, J. M., Mathias, J. R., Hall, C. J., Emerson, J. C., Crosier, P. S., et al. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system interacts with phagocytes to modulate systemic infection of zebrafish embryos. *Cell. Microbiol.* 11, 755–768. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01288.x

Buchmeier, N., Blanc-Potard, A., Ehrt, S., Piddington, D., Riley, L., and Groisman, E. A. (2000). A parallel intraphagosomal survival strategy shared by *Mycobacterium tuberculosis* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* 35, 1375–1382. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01797.x

Buyck, J. M., Tulkens, P. M., and Van Bambeke, F. (2013). Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activity of antibiotics towards *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in a model of THP-1 human monocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2310–2318. doi: 10.1128/AAC.02609-12

Byrd, M. S., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Lu, H., Sprinkle, A. B., Richardson, S. H., et al. (2009). Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Mol. Microbiol.* 73, 622–638. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06795.x

Dickey, S. W., Cheung, G. Y. C., and Otto, M. (2017). Different drugs for bad bugs: antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 457–471. doi: 10.1038/nrd.2017.23

Franklin, M. J., Nivens, D. E., Weadge, J. T., and Howell, P. L. (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. *Front. Microbiol.* 2:167. doi: 10.3389/fmicb.2011.00167

Ghafoor, A., Hay, I. D., and Rehm, B. H. (2011). Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5238–5246. doi: 10.1128/AEM.00637-11

Grabenstein, J. P., Fukuto, H. S., Palmer, L. E., and Bliska, J. B. (2006). Characterization of phagosome trafficking and identification of PhoP-regulated genes important for survival of *Yersinia pestis* in macrophages. *Infect. Immun.* 74, 3727–3741. doi: 10.1128/IAI.00255-06

Hauser, A. R., Mecsas, J., and Moir, D. T. (2016). Beyond antibiotics: new therapeutic approaches for bacterial infections. *Clin. Infect. Dis.* 63, 89–95. doi: 10.1093/cid/ciw200

Heras, B., Scanlon, M. J., and Martin, J. L. (2015). Targeting virulence not viability in the search for future antibacterials. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 79, 208–215. doi: 10.1111/bcp.12356

Jean-Francois, F. L., Dai, J., Yu, L., Myrick, A., Rubin, E., Fajer, P. G., et al. (2014). Binding of MgtR, a *Salmonella* transmembrane regulatory peptide, to MgtC, a *Mycobacterium tuberculosis* virulence factor: a structural study. *J. Mol. Biol.* 426, 436–446. doi: 10.1016/j.jmb.2013.10.014

Kaniga, K., Delor, I., and Cornelis, G. R. (1991). A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene.* 109, 137–141. doi: 10.1016/0378-1119(91)90599-7

Klockgether, J., and Tümmler, B. (2017). Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen. *F1000Res.* 6:1261. doi: 10.12688/f1000research.10506.1

Kruger, R. P. (2017). The coming peptide tidal wave. *Cell*. 171:497. doi: 10.1016/j.cell.2017.10.010

Lavigne, J. P., O'Callaghan, D., and Blanc-Potard, A. B. (2005). Requirement of MgtC for *Brucella suis* intramacrophage growth: a potential mechanism shared by *Salmonella enterica* and *Mycobacterium tuberculosis* for adaptation to a low-Mg^{2+} environment. *Infect. Immun*. 73, 3160–3163. doi: 10.1128/IAI.73.5.3160-3163.2005

Lee, E. J., and Groisman, E. A. (2010). An antisense RNA that governs the expression kinetics of a multifunctional virulence gene. *Mol. Microbiol*. 76, 1020–1033. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07161.x

Lee, E. J., Pontes, M. H., and Groisman, E. A. (2013). A bacterial virulence protein promotes pathogenicity by inhibiting the bacterium's own F1Fo ATP synthase. *Cell*. 154, 146–156. doi: 10.1016/j.cell.2013.06.004

Lippa, A. M., and Goulian, M. (2009). Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide. *PLoS Genet*. 5:e1000788. doi: 10.1371/journal.pgen.1000788

Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., and Björn, C. (2016). Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 6:194. doi: 10.3389/fcimb.2016.00194

Maloney, K. E., and Valvano, M. A. (2006). The *mgtC* gene of *Burkholderia cenocepacia* is required for growth under magnesium limitation conditions and intracellular survival in macrophages. *Infect. Immun*. 74, 5477–5486. doi: 10.1128/IAI.00798-06

Mühlen, S., and Dersch, P. (2016). Anti-virulence strategies to target bacterial infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 398, 147–183. doi: 10.1007/82_2015_490

Nivens, D. E., Ohman, D. E., Williams, J., and Franklin, M. J. (2001). Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J. Bacteriol*. 183, 1047–1057. doi: 10.1128/JB.183.3.1047-1057.2001

Periasamy, S., Nair, H. A., Lee, K. W., Ong, J., Goh, J. Q., Kjelleberg, S., et al. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 exopolysaccharides are important for mixed species biofilm community development and stress tolerance. *Front. Microbiol*. 6:851. doi: 10.3389/fmicb.2015.00851

Pontes, M. H., Lee, E. J., Choi, J., and Groisman, E. A. (2015). *Salmonella* promotes virulence by repressing cellulose production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 112, 5183–5188. doi: 10.1073/pnas.1500989112

Rang, C., Alix, E., Felix, C., Heitz, A., Tasse, L., and Blanc-Potard, A. B. (2007). Dual role of the MgtC virulence factor in host and non-host environments. *Mol. Microbiol*. 63, 605–622. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05542.x

Remminghorst, U., and Rehm, B. H. (2006). *In vitro* alginate polymerization and the functional role of Alg8 in alginate production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol*. 72, 298–305. doi: 10.1128/AEM.72.1.298-305.2006

Schurr, M. J., Yu, H., Martinez-Salazar, J. M., Boucher, J. C., and Deretic, V. (1996). Control of AlgU, a member of the sigma E-like family of stress sigma factors, by the negative regulators MucA and MucB and *Pseudomonas aeruginosa* conversion to mucoidy in cystic fibrosis. *J. Bacteriol*. 178, 4997–5004. doi: 10.1128/jb.178.16.4997-5004.1996

Stone, T. A., and Deber, C. M. (2017). Therapeutic design of peptide modulators of protein-protein interactions in membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. 1859, 577–585. doi: 10.1016/j.bbamem.2016.08.013

Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., et al. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis*. 18, 318–327. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3

Wang, H., Yin, X., Wu Orr, M., Dambach, M., Curtis, R., and Storz, G. (2017). Increasing intracellular magnesium levels with the 31-amino acid MgtS protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 114, 5689–5694. doi: 10.1073/pnas.1703415114

Wei, Q., and Ma, L. Z. (2013). Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Mol. Sci*. 14, 20983–21005. doi: 10.3390/ijms141020983

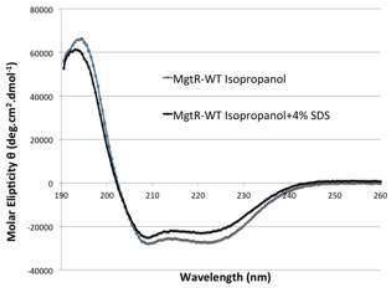
Wozniak, D. J., Wyckoff, T. J., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G. A., et al. (2003). Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 100, 7907–7912. doi: 10.1073/pnas.1231792100

Yang, L., Hu, Y., Liu, Y., Zhang, J., Ulstrup, J., and Molin, S. (2011). Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Environ. Microbiol*. 13, 1705–1717. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02503.x

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

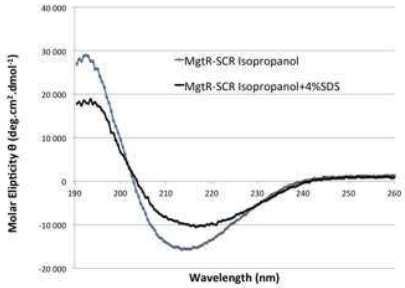
Copyright © 2019 Moussouni, Nogaret, Garai, Ize, Vivès and Blanc-Potard. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

MgtR



Used Program (CD Pro Package)	Alpha-Helical content Without/With 4% SDS	Beta-Sheet content Without/With 4% SDS	Unordered content Without/With 4% SDS
CDSSTR	88.7/90.6	0/1.5	11.3/7.9
CONTINLL	91.8/82.1	1.5/0.8	5.8/17
SELCON3	100.6/92.6	-6.8/5.2	12.6/14.4

Scrambled MgtR



Used Program (CD Pro Package)	Alpha-Helical content Without/With 4% SDS	Beta-Sheet content Without/With 4% SDS	Unordered content Without/With 4% SDS
CDSSTR	40.8/40.9	23/20.1	36/38.4
CONTINLL	34/34	21.3/21.3	44.8/44.8
SELCON3	36.1/36.1	16/16	49.5/49.5

FIGURE S1. Circular dichroism spectra for MgtR peptide. Peptides (40 μM) were resuspended in 30% isopropanol without SDS or in the presence of 4% SDS to mimic an hydrophobic environment. In both cases, MgtR peptide (MgtR-WT, left panel) adopted a pronounced α-helical structure, characterized by CD spectra with a maximum at 191 nm and two minima at 207 and 222nm (spectra were obtained from 3 accumulations between 190 and 260 nm with a data pitch of 0.5 nm, a bandwidth of 1 nm and a standard sensitivity). The MgtR scrambled peptide provided a different spectra (MgtR-SCR, right panel). The crude spectra were then converted in molar ellipticity per residue and processed using CDPro software package and the programs CDSSTR, CONTINLL and SELCON3 (Sreerame et al., 2000). All programs clearly indicated a strong alpha-helical structure for MgtR peptide but not for MgtR scrambled peptide.

Sreerama N, Woody RW. 2000. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. Anal Biochem. 287:252-60.

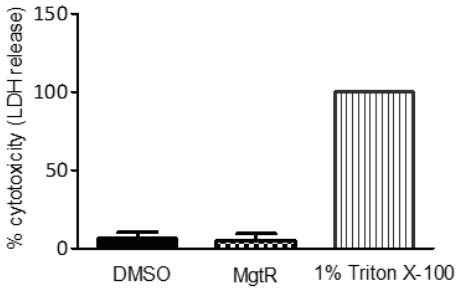


FIGURE S2. Assessment of peptides cytotoxicity toward macrophages using LDH release assay. J774 cells were treated with 120 μM of MgtR peptide or DMSO as control in DMEM, for 18 hours at 37°C and 5% CO_2. LDH released by the macrophages in the medium was quantified, normalized to DMEM medium control and plotted as percent cytotoxicity or LDH release, where the amount of LDH released by cells lysed by 1% Triton X-100 was considered as 100%.

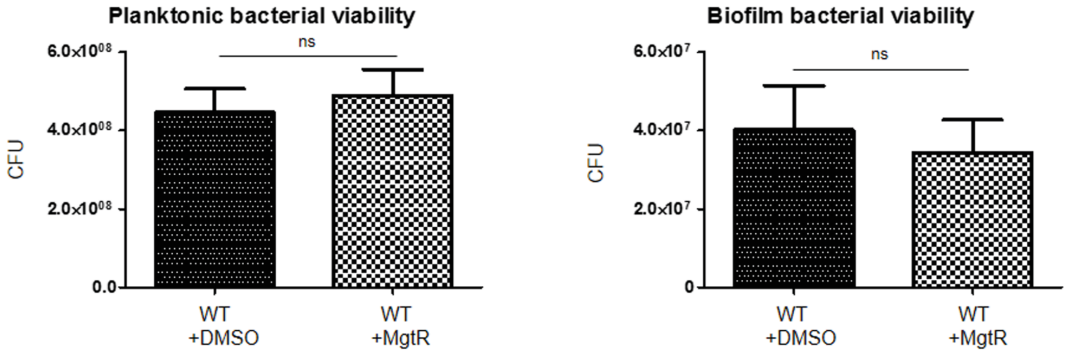


FIGURE S3. Effect of MgtR peptide on bacterial viability after static incubation. Bacterial viability after static incubation at 30°C for 24 hrs in NCE medium with 10 µM $MgSO_4$ was measured both in the planktonic fraction (left panel) and in the ring (right panel) by counting CFUs. Error bars correspond to standard errors (+ SE) from three independent experiments (Student's t test).

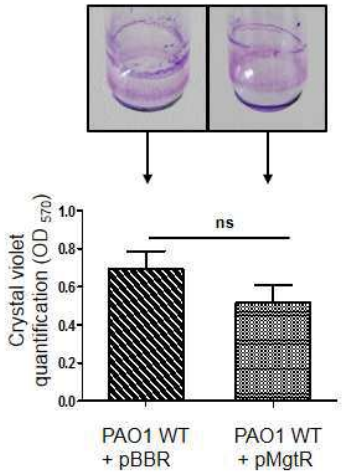


FIGURE S4. Biofilm formation in the presence of endogenously expressed MgtR peptide. Quantification of bacterial adherence to glass tubes was carried out with PAO1 WT carrying pBBR1MCS vector or pMgtR plasmid (Belon et al., 2015) at 30°C for 24 hrs in NCE medium with 10 µM $MgSO_4$. The ring on the glass tube is visualized by crystal violet staining and quantified by measuring OD_{570}. Error bars correspond to standard errors (+ SE) from three independent experiments (Student's t test).

SUPPLEMENTAL TABLE 1. List of primers

rpoD-RT-fwd	5'-GGGCGAAGAAGGAAATGGTC-3'
rpoD-RT-rev	5'-CAGGTGGCGTAGGTGGAGAA-3'
pslA-RT-fwd	5'-GTTTCCCTACCTCAGCAGCA-3'
pslA-RT-rev	5'-CGGATGTCGTGGTTGCGTA-3'
pelA-RT-fwd	5'-CCTTCAGCCATCCGTTCTTC-3'
pelA-RT-rev	5'-TCGCGTACGAAGTCGACCTT -3'
algE-RT-fwd	5'-GTTTCAGCGAATACCGCACC-3'
algE-RT-rev	5'-AGCTGGCCGGTATAGGTCTT-3'
PA4635 Cter F	5'-CGGGATCCGCCAGCGAGGCCGAGCAAC-3'
PA4635 Cter R	5'-CCCAAGCTTTCAGTCGGCCGCCAGTTC-3'

1.1.3 Résultats complémentaires

Dans le cadre du développement d'une stratégie antivirulence basée sur l'utilisation du peptide MgtR, des expériences supplémentaires ont été effectuées sur les macrophages J774 infectés, et les embryons de *Danio rerio* également infectés par la souche sauvage PAO1.

1.1.3.1 Étude de l'effet du peptide MgtR ajouté après infection des macrophages

Dans l'optique de développer un peptide thérapeutique, nous avons également vérifié si un effet du peptide synthétique MgtR pouvait être observé lorsque celui-ci était ajouté à des macrophages J774 infectés par la souche PAO1 (bactéries non préalablement traitées par MgtR comme décrit dans l'article). Suite à l'infection des macrophages, le peptide MgtR (120 µM) a été ajouté dans le milieu de culture des macrophages infectés (ou du DMSO en contrôle). De façon intéressante, une réduction significative de la survie bactérienne dans les macrophages a été observée (approximativement de 20 %) (Figure 27), suggérant que le peptide peut être internalisé par les macrophages et que celui-ci agit sur les bactéries internalisées et réduit leur survie dans le macrophage.

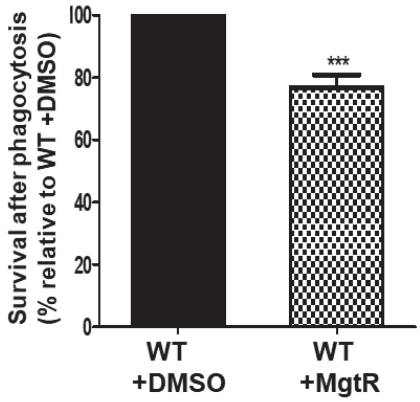


Figure 27. Effet du peptide MgtR (ajouté après infection des macrophages) sur la survie de PAO1 dans les macrophages. Le peptide a été préalablement soniqué 10 mn. Nombre d'expériences N= 3. ***, différence statistiquement significative (P<0.001) déterminée par le test *t* de Student.

Ce résultat est donc prometteur quant à l'action antivirulence de MgtR et nous a conduit à tester son effet dans un modèle animal.

1.1.3.2 Étude de l'effet du peptide MgtR sur les embryons de poissons-zèbre infectés

Deux approches majeures sont utilisées dans le cadre des essais de molécules thérapeutiques sur embryons de poisson-zèbre, le traitement par balnéation et la microinjection de la molécule. Afin de déterminer le mode adéquat de traitement et la bonne diffusion du peptide MgtR dans l'embryon de poisson, nous avons utilisé un peptide fluorescent MgtR-FITC facilement visualisable. Pour cela, les embryons âgés de 30 hpf ont été mis dans un milieu de vie contenant le peptide MgtR-FITC (120 µM) pour un test de balnéation (figure 28. B), ou injectés au niveau de la veine caudale avec le peptide fluorescent (figure 28. C).

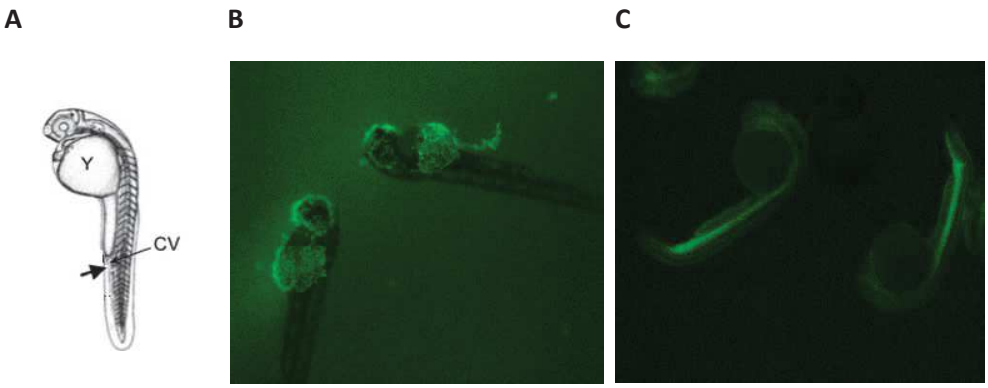
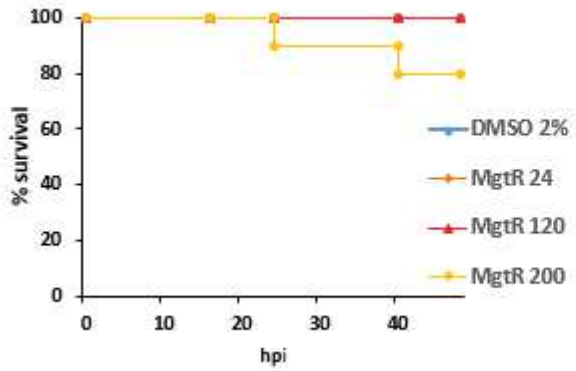


Figure 28. Visualisation du peptide fluorescent MgtR-FITC sur des embryons de poisson-zèbre. (A) Schéma d'un embryon de poisson-zèbre montrant le site de l'injection intraveineuse (flèche) au niveau de la veine caudale (CV). (B, C) Images représentatives des embryons de poisson mis en contact avec le peptide fluorescent à 30hpi, par balnéation (B), ou par injection intraveineux (C). Images prises avec un microscope à fluorescence (Olympus MVX10).

Les images de fluorescence des embryons mis en balnéation avec le peptide, montrent la présence d'une fluorescence correspondant au peptide MgtR-FITC uniquement à la surface des embryons, mais pas à l'intérieur de ce dernier, indiquant que le peptide MgtR ne pénètre pas à travers la peau de l'embryon, mais reste à la surface de celui-ci (figure 28. B), ce qui est en accord avec la taille importante du peptide (3.5 kDa). Par contre, l'injection intraveineuse du peptide fluorescent permet au peptide de circuler le long de la veine caudale comme le montrent les images (figure 28. C). Ces observations ont permis de choisir la microinjection comme moyen d'administration du peptide.

Une fois que le mode d'administration a été déterminé, des tests de toxicité du peptide ont été effectués. Pour cela, des doses de MgtR (préalablement soniqué), allant de 24 à 200 µM ont été injectés au niveau de la veine caudale des embryons de poisson-zèbre (figure 29. A). Les embryons injectés avec des concentrations de MgtR comprises entre 24 et 120 µM ou avec du DMSO 2% (correspondant au pourcentage de DMSO présent dans 120 µM de MgtR) ne présentent pas de signes de toxicité (signes morphologiques, viabilité), mais on note une légère mortalité sur les embryons injectés avec une concentration de 200 µM de MgtR, indiquant qu'on ne peut tester l'efficacité du peptide au-delà de cette concentration.

A



B

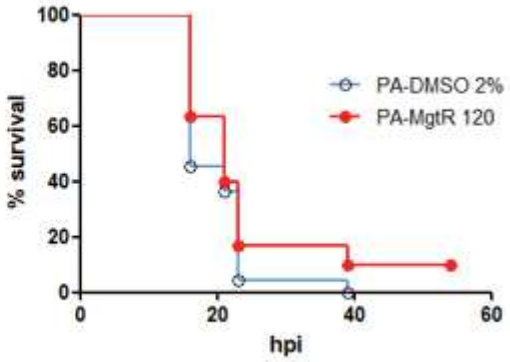


Figure 29. Effet du peptide MgtR sur la survie des embryons de poisson-zèbre. Les embryons de poisson âgés de 30 hpf sont injectés avec différentes doses de MgtR pour un test de toxicité (A), ou infectés par la souche PAO1 sauvage de *P. aeruginosa* (PA) (1000-1500 CFU) puis injectés avec MgtR pour un test d'efficacité (B), le DMSO est utilisé en contrôle. (B) Résultats poolés de 2 expériences indépendantes (22-30 embryons). Hpi : heures post infection. Différence statistiquement non significative entre MgtR et le DMSO d'après le test statistique de log-rank.

Pour les tests d'efficacité du peptide, les embryons âgés de 30hpf ont été infectés avec 1000-1500 CFU de PAO1, puis immédiatement injectés avec différentes doses de MgtR (24, 80, 120, 160 µM) ou avec des doses correspondant en DMSO. Le suivie de la survie des embryons a été fait sur 3 jours. La mortalité des poissons infectés et traités avec les différentes doses de MgtR reste importante et ne montre pas d'effet antivirulence du peptide comparé au contrôle DMSO (résultats non montrés), seul un faible effet mais statistiquement non significatif, sur la survie des embryons infectés est obtenu avec une concentration de 120 µM de MgtR (figure 29. B).

Une des raisons de l'absence d'effet antivirulence du peptide MgtR sur les embryons infectés, pourrait être son manque de solubilité, qui induit des difficultés lors de l'étape d'injection, puisque la formation d'agrégats bouche l'aiguille d'injection. Pour contrer ce problème, une des solutions serait d'améliorer la solubilité du peptide par l'utilisation de nanoparticules ou de liposomes.

1.2 Étude structurale du domaine d'interaction avec MgtR : Production de la protéine MgtC de *P. aeruginosa*

Malgré l'importance du facteur MgtC dans la survie intramacrophagique de différentes bactéries, aucune information structurale n'est disponible à ce jour concernant le domaine membranaire de la protéine, cible de l'action de notre peptide antagoniste, MgtR. Notre objectif était de produire et purifier MgtC, en vue d'une analyse structurale, en présence ou non du peptide antagoniste. Afin d'obtenir une structure moléculaire tridimensionnelle d'une protéine, celle-ci doit être produite en quantité adéquate et en qualité suffisamment pure. Plusieurs techniques existent afin de résoudre la structure d'une protéine et nous nous sommes focalisés initialement sur la cristallogenèse. Notre objectif était également de tester l'effet du peptide MgtR sur la dimérisation de MgtC, en utilisant la spectrométrie de masse (SM) native avec C. Bechara.

L'optimisation des systèmes de surexpression et les protocoles de purification est une condition préalable pour les études structurales des protéines membranaires. La surexpression et la purification des protéines membranaires telles que MgtC, représentent un véritable challenge. Afin d'augmenter nos chances de réussite, j'ai travaillé sur les 2 protéines homologues PA4635 (MgtC) et PA2558 (MgtC-like), qui possèdent 53% d'identité de séquence (77% pour les domaines transmembranaires TM3-TM4, domaines d'interaction avec MgtR) (figure 30). L'optimisation de l'expression a été réalisée lors de mon stage de Master2. La purification a été faite en collaboration avec C. Bechara (Institut de génétique fonctionnelle) et M. Cohen- Gonsaud (centre de biochimie structurale, CBS de Montpellier).

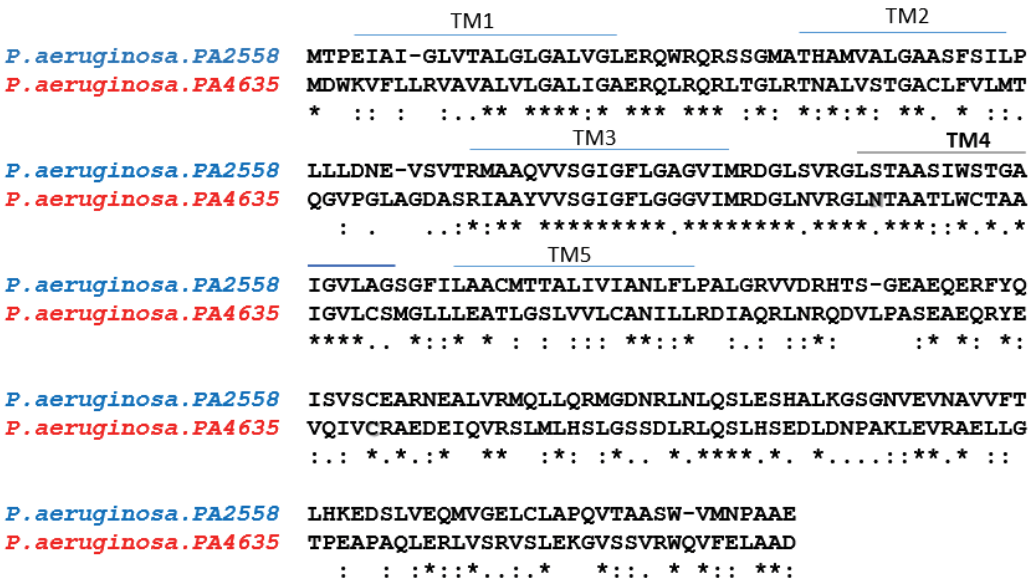


Figure 30. Alignement de séquences des protéines PA2558 et PA4635, la position des 5 domaines transmembranaires (TM) est indiquée.

1.2.1 Condition de production de MgtC

Un système d'expression dans la souche *Escherichia coli* (*E. coli*) C41 adaptée à la production de protéines membranaires a été utilisé, Les gènes d'intérêt ont été clonés dans les plasmides pET24b (en amont d'une étiquette poly-histidine), et ces derniers ont été utilisés pour transformer les C41 (figure 31).

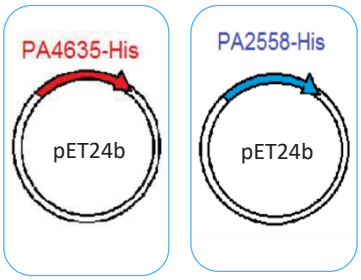


Figure 31. Schématisation du système d'expression C41 des protéines recombinantes MgtC (PA4635) et MgtC-like (PA2558).

Dans cette construction l'expression de la protéine est inductible à l'Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), mon travail consistait alors à déterminer la concentration adéquate d'IPTG, la durée et la température d'induction pour une expression optimale de la protéine d'intérêt. Les bactéries *E. coli* ont été mises en culture dans différentes conditions d'IPTG (0 – 0.05 - 0.1 - 0.5 mM), pendant 2h, 2h30 ou 20h, à des températures de 30 ou 37°C. Pour faciliter la détection de la protéine, nous avons d'abord révélé sa présence en Western Blot (WB) en utilisant un anticorps (Ac) anti-His (figure 32).

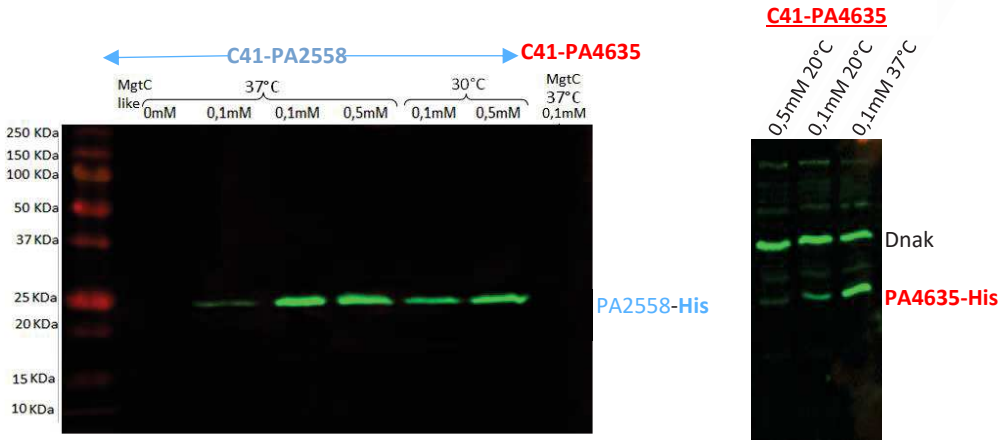


Figure 32. Conditions d'expression des protéines PA2558 et PA4635 testées et révélées sur WB. Avec un Ac anti-His sur le WB de gauche, et un Ac anti-PA4635 avec Ac anti-Dnak (contrôle) sur le WB de droite.

Sur ces WB, seules quelques conditions sont montrées, j'ai pu déterminer ici qu'une concentration d'IPTG comprise entre 0.1 et 0.5 mM à 37°C pendant 2h30 permet une meilleure expression de PA2558. Par contre, nous n'avons pas pu détecter la PA4635. Par la suite, nous avons fait l'expérience en WB avec l'Ac anti-PA4635 (figure 32, droite), qui nous a permis de révéler la protéine recombinante

PA4635 ainsi que les conditions optimales de son expression (semblables à celles de PA2558). Nous avons conclu alors que l'étiquette histidine devait être masquée ne permettant pas la détection avec l'Ac anti-His. Après fractionnement cellulaire (suite aux centrifugations), la présence des protéines PA2558 et PA4635 a pu être révélée sur gel coloré au bleu de coomassie dans la fraction membranaire (figure 33).

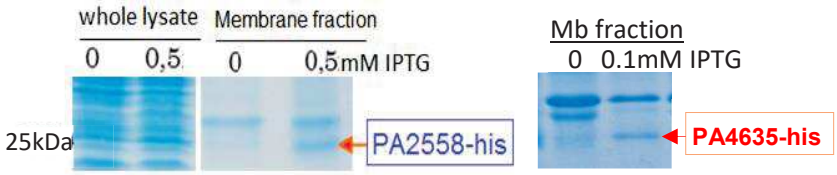


Figure 33. Visualisation des bandes correspondant aux protéines recombinantes PA2558 et PA4635 dans la fraction membranaire.

1.2.2 Criblage de détergents et solubilisation de la protéine

MgtC et MgtC-like sont des protéines ancrées dans la membrane, il faut donc les extraire de leur environnement lipidique avec un détergent adapté. Une des difficultés rencontrées à ce niveau, est le fait que les protéines membranaires ont tendance à se dénaturer si elles sont solubilisées avec les détergents. Pour cette raison, le choix des détergents constitue un facteur clé. C'est au niveau de la plateforme RoBioMol de Grenoble qu'un criblage de détergents a été effectué sur une fraction membranaire surexprimant PA2558 (Figure 34). Cette étape nous a permis de choisir le n-Dodecyl β-D-maltoside (DDM) qui est le mieux adapté à la purification et à l'étape de cristallogène.

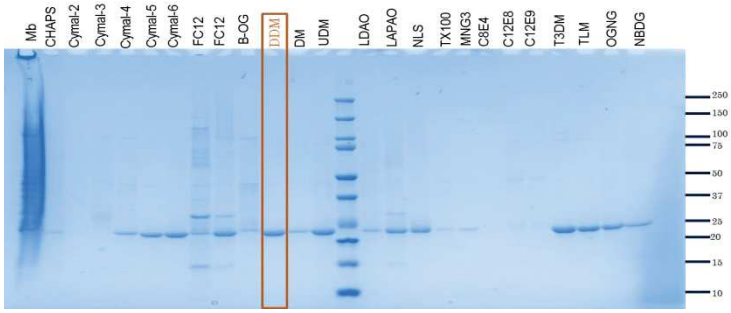


Figure 34. Gel coloré au bleu de coomassie montrant la solubilisation de la protéine PA2558 obtenue avec 24 détergents différents. Manipulation faite à la plateforme RoBioMol (ISBG).

1.2.3 Purification des protéines

De grands volumes de culture ont été nécessaires (4 L) afin de produire la quantité requise de protéines, les bactéries étaient ensuite cassées par sonication (10 mn au total) dans un tampon de lyse adapté, suivie des étapes de centrifugation et ultracentrifugation pour séparer la fraction membranaire. Les culots sont re-suspendus dans un tampon Tris contenant de l'antiprotéase pour éviter d'éventuelles dégradations de la protéine d'intérêt. C'est à cette étape là qu'une solution contenant 1% de DDM et 0.5% d'OGNG (Octyl Glucose Neopentyl Glycol) est ajoutée, et laissée toute

la nuit pour solubiliser la protéine. Suite à cela, des micelles se forment contenant des complexes protéines-lipides-détergent.

J'ai alors procédé à une première étape de purification des protéines sur colonne de nickel (His-trap 5 mL), les protéines recombinantes MgtC ou MgtC-like fusionnées à l'étiquette poly-his sont alors fortement accrochées à la colonne. Après des étapes de lavage, les protéines d'intérêt sont décrochées de la colonne avec un tampon d'élution contenant une forte concentration d'imidazole (500 mM). Les fractions collectées sont déposées sur gel SDS PAGE, afin de s'assurer de la présence de la protéine d'intérêt (figure 35. A). La fraction contenant MgtC/MgtC-like (taille 25 kDa) est alors purifiée une seconde fois par chromatographie d'exclusion sérique (SEC) (figure 35. B), et les différentes fractions collectées sont à leurs tours chargées sur gel SDS-PAGE, coloré au bleu de coomassie (figure 35. C).

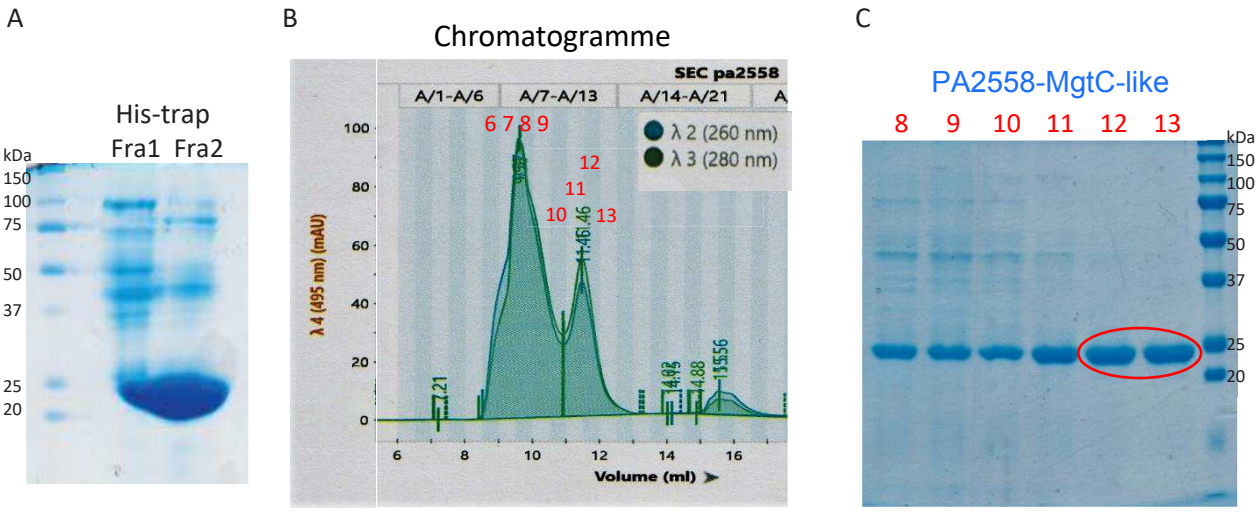


Figure 35. Purification de la protéine MgtC-like (PA2558).
(A) Profil des fractions PA2558 obtenues après purification sur colonne HIS-trap et migration sur gel coloré au bleu de Coomassie. (B) Chromatogramme obtenu suite à la SEC de la fraction 2 de PA2558 sur l'AKTA^{TM}. (C). Profil des fractions (8 à 13) PA2558 obtenues après SEC et chargées sur gel coloré au bleu de coomassie.

Le gel montre une pureté et quantité satisfaisante de la protéine MgtC-like pour les fractions 12 et 13 (figure 35. C), celles-ci ont été poolées (0.5 mg/L) et l'échantillon a été envoyé à la plateforme HTX (High Throughput Crystallization) de Grenoble pour la cristallogenèse. Les fractions ont été testées en SM native par C. Bechara pour vérifier l'état d'oligomérisation de la protéine, et des dimères et monomères ont été observés.

En parallèle, la protéine MgtC s'est révélée être plus instable et sensible aux étapes de purification et de concentration, et a nécessité plusieurs mises au point, notamment l'ajout d'une étape de dialyse avant la concentration de l'échantillon précédant l'étape de chromatographie SEC, et ce afin d'éviter de concentrer certains composés présents dans l'échantillon protéique, notamment l'imidazole et les

détergents. Ces modifications ont permis d'améliorer le rendement de purification de la protéine MgtC (figure 36).

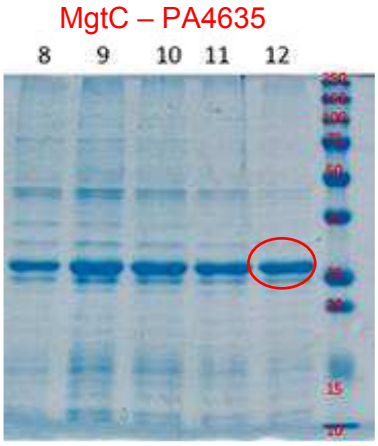


Figure 36. Purification de la protéine MgtC. Profil des différentes fractions de MgtC collectées après dialyse puis SEC et déposées sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie.

1.2.4 Étape de cristallogenèse

Plusieurs conditions de cristallogenèse ont été testées au niveau de la plateforme HTX afin de favoriser la cristallisation de la protéine MgtC-like (Température, pH, force ionique, nature du tampon…etc). Après plusieurs semaines, quelques structures ressemblant à des mini-cristaux s'étaient formées (figure 37. A), nous avons alors sélectionné l'un d'eux pour le soumettre à un faisceau de rayons X (figure 37. B).

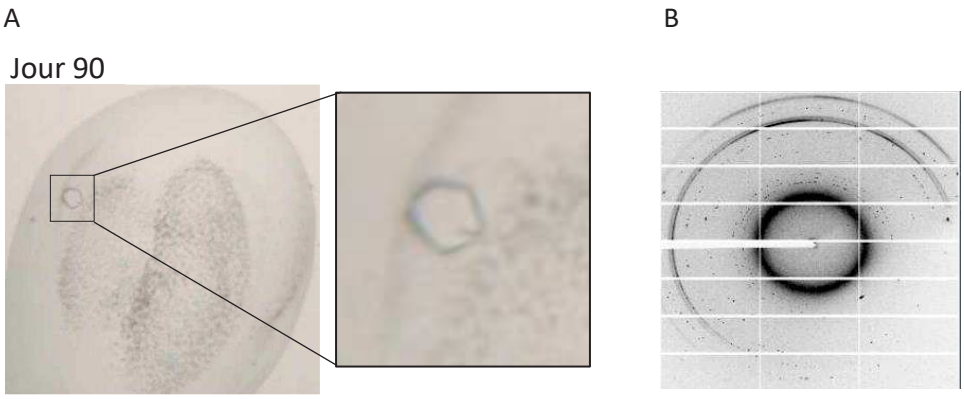


Figure 37. Photos de la formation d'un cristal de l'échantillon MgtC-like purifié dans une solution favorisant la cristallogenèse. (A) Apparition d'un cristal. (B) Profil de diffraction des rayons X du crystal obtenu. (Source, plateforme HTX de Grenoble).

Le motif de diffraction obtenu est de faible intensité et ne correspond pas au motif attendu d'un cristal de protéine. Malgré la pureté de l'échantillon, il est possible qu'un mélange de monomères et de dimères empêchent la cristallogenèse de la protéine.

1.2.5 État d'oligomérisation de la protéine MgtC

Il a été montré que la protéine MgtC de *M. tuberculosis* dimérise (Belon *et al.,* 2016), et les données de SM native (résultats non montrés) indiquent la présence de dimères pour MgtC de *P. aeruginosa* dans certaines fractions suite à la purification. Une de nos hypothèses est que cette dimérisation pourrait avoir un rôle important dans la fonction de la protéine MgtC, et le peptide MgtR pourrait interférer dans la formation de ce dimère, hypothèse soutenue par les résultats obtenus avec MgtC de *M. tuberculosis* (Belon *et al.,* 2016). J'ai alors testé l'état d'oligomérisation de la protéine sur gel SDS-PAGE, dans différentes conditions réductrices (avec B-Mercaptoéthanol), et non réductrices (sans B-Mercaptoéthanol), et avec ou sans chauffage de l'échantillon à 95°c (figure 38).

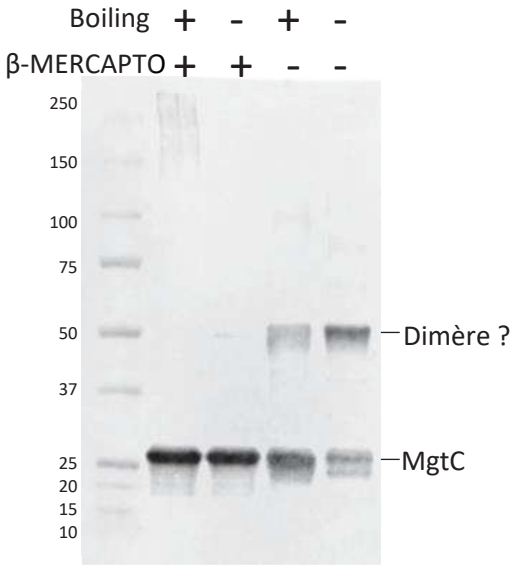


Figure 38. Visualisation de l'état d'oligomérisation de la protéine purifiée MgtC. Les échantillons protéiques ont été préparés avec ou sans ajout d'agent réducteur (β-Mercaptoéthanol), avec et sans chauffage à 95°C, puis déposés sur gel SDS-PAGE et révélés par l'Ac anti-PA4635.

On remarque sur le gel, la présence d'une bande unique de 25 kDa lorsque l'échantillon est préparé avec du B-Mercaptoéthanol, que ça soit en le chauffant ou non, cette bande correspond à la taille d'un monomère MgtC (25 kDa). Par contre l'échantillon non traité avec le B-Mercaptoéthanol (chauffé ou non) révèle la présence d'une bande supplémentaire de 50 kDa, cette bande correspond à la taille approximative d'un dimère MgtC. Ces résultats suggèrent que la protéine MgtC forme des dimères liés par pont disulfure. Cependant ces résultats nécessitent d'être confirmés par d'autres méthodes, notamment l'utilisation d'un gel natif (conditions non dénaturantes) et la SM native.

Afin d'identifier les résidus cystéines pouvant être impliqués dans la formation de dimères MgtC, j'ai induit des mutagenèses dirigées sur deux résidus C99 et C155 bien conservés dans la famille MgtC, et pouvant avoir un rôle important dans la fonction ou la stabilité de la protéine. Ces protéines mutées ont été produites et purifiées selon le protocole décrit plus haut. Les échantillons ont été préparés

avec ou sans ajout d'agent réducteur (β-Mercaptoéthanol), chargés sur gel SDS-PAGE et analysés avec des Ac anti-PA4635 (figure 39).

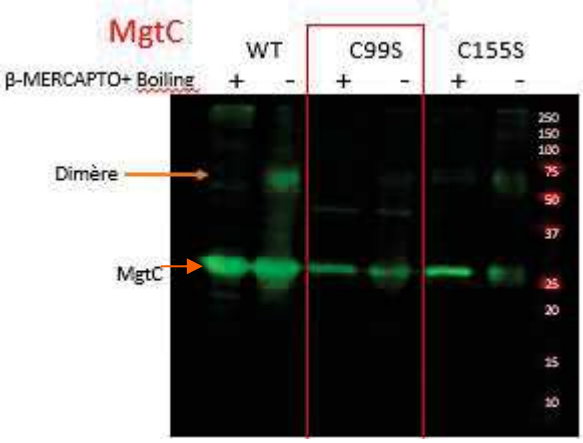


Figure 39. Visualisation de l'état d'oligomérisation des protéines purifiées MgtC, MgtC C99S et MgtC C155S. Les échantillons protéiques ont été préparés avec ou sans ajout d'agent réducteur (β-Mercaptoéthanol) puis chargés sur gel SDS-PAGE et révélés par l'Ac anti-PA4635.

Le WB montre que les protéines MgtC sauvages et mutées à la position 99 et 155 sont bien produites. Des bandes d'une taille correspondant à la forme de dimère de MgtC (50 kDa) sont clairement visibles lorsque les échantillons MgtC et MgtC C155S sont préparés sans ajout de l'agent réducteur, ce qui suggère que le résidu C155S n'est pas nécessaire à la formation de dimères. Par contre, pour la protéine MgtC C99S, en absence d'agent réducteur, on ne voit quasiment pas de bande de 50 kDa (taille du dimère MgtC), alors que l'intensité de la bande de 25 kDa est forte (comparable à celle de la protéine MgtC C155S). Ces données suggèrent que le résidu C99 pourrait être impliqué dans la formation de ponts disulfures au niveau des dimères MgtC.

1.2.6 Conclusion et perspectives

En conclusion la production et la purification des protéines homologues MgtC et MgtC-like a nécessité de nombreuses mises au point et a pu être établie avec succès pour la protéine MgtC-like. Des optimisations sont encore nécessaires pour la protéine MgtC. Nous avons utilisé la cristallogenèse afin de résoudre la structure tridimensionnelle de MgtC, et ce projet est actuellement poursuivi par l'équipe collaboratrice de M. Cohen-Gonsaud au CBS. Comme prévu initialement, les études de structures seront également menées suite à l'ajout du peptide MgtR afin de définir les changements structuraux induits par le peptide.

Les données de purification couplées aux analyses de SM native ont permis d'identifier la présence de dimères de la protéine MgtC (taille 50 kDa). La cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-MET) est une autre technique de choix pour résoudre la structure tridimensionnelle des protéines membranaires. Cette technique permet l'observation et la prise d'images d'échantillons d'une taille minimum de 40-50 kDa dans leur environnement physiologique (Boutin *et al.,* 2016), et la taille des dimères MgtC permettrait d'envisager l'utilisation de la cryo-MET comme alternative à la cristallographie.

Les analyses de mutants ont permis d'identifier le résidu C99 comme potentiellement impliqué dans la dimérisation de la protéine MgtC, et des expériences dans un système de double hybride bactérien ont récemment conforté ces résultats. L'objectif est de tester si le peptide MgtR pourrait interférer avec la dimérisation de MgtC, en utilisant la SM native et le double hybride bactérien. Il serait également intéressant d'identifier le rôle du dimère dans l'activité de MgtC, en analysant le phénotype de mutants MgtC C99S lors d'infection de macrophages.

2 Apport des mutants *oprF* et *mgtC* dans la compréhension du rôle du macrophage lors de l'infection à *P. aeruginosa*

2.1 Implication des facteurs de virulence OprF et MgtC dans le devenir intramacrophagique de *P. aeruginosa*

2.1.1 Résumé de l'article 2

La capacité des phagocytes professionnels à ingérer et tuer les microorganismes est primordiale pour la défense de l'hôte. Bien que *P. aeruginosa* soit considéré uniquement comme un agent pathogène extracellulaire, de plus en plus de preuves indiquent que *P. aeruginosa* rencontre un environnement intracellulaire dans divers types de cellules de mammifères, y compris les macrophages. Pour pouvoir échapper à l'élimination par les phagocytes, la bactérie a développé divers mécanismes.

Dans cette étude, nous avons analysé le devenir de *P. aeruginosa* au sein de macrophages en culture. Par des techniques de microscopie électronique et de microscopie en live, nous avons montré que *P. aeruginosa* résidait en premier lieu dans les vacuoles phagosomales et pouvait ensuite être détecté dans le cytoplasme, indiquant que la bactérie peut échapper à son environnement phagosomal. Ces données ont également été soutenues par les tests de rupture vacuolaire. Nous avons montré que les bactéries internalisées par les macrophages murins et par les macrophages primaires humains, pouvaient potentiellement induire la lyse de leurs cellules hôtes.

Deux facteurs bactériens, MgtC et OprF, récemment découverts comme étant impliqués dans la survie intramacrophagique de *P. aeruginosa*, semblent jouer un rôle dans ces mécanismes d'échappement phagosomale et de cytotoxicité causée par les bactéries internalisées. Nous avons pu montrer que l'expression de gènes codant pour le SST3 est réduite chez les mutants *mgtC* et *oprF*. Nous avons également montré que les bactéries internalisées dans les macrophages, utilisent leur SST3, et spécifiquement leur effecteur ExoS, pour pouvoir échapper aux phagosomes et promouvoir la lyse cellulaire. Enfin, cette capacité de *P. aeruginosa* à échapper au macrophage semble être dépendante du domaine GAP (GTPase Activating Protein) de l'effecteur du SST3, ExoS.

Par conséquent, nous décrivons dans cette étude, un stade transitoire de *P. aeruginosa,* qui met en évidence le SST3 et ExoS, dont l'expression est modulée par MgtC et OprF, en tant que facteurs clés du devenir intramacrophagique de *P. aeruginosa*. Ceci pourrait contribuer à la dissémination de la bactérie.

Ma contribution dans cette étude a été de; tester la survie intramacrophagique de différents mutants, qui a permis en partie de centrer l'étude sur les facteurs décrits dans l'article; Analyser par microscopie la colocalisation avec les vacuoles acides des mutants, *oprF, mgtC* et SST3 (ainsi que le mutant *exoS*).

Seule l'étude de la souche sauvage a finalement été montrée dans cet article; J'ai également participé aux expériences montrant la lyse cellulaire par les différentes souches étudiées (en particulier l'aspect microscopie).

2.1.2 Article 2- Killing from the inside: Intracellular role of T3SS in the fate of *Pseudomonas aeruginosa* within macrophages revealed by *mgtC* and *oprF* mutants

PLOS PATHOGENS

RESEARCH ARTICLE

Killing from the inside: Intracellular role of T3SS in the fate of *Pseudomonas aeruginosa* within macrophages revealed by *mgtC* and *oprF* mutants

Preeti Garai[1], Laurence Berry[1☯], Malika Moussouni[1☯], Sophie Bleves[2], Anne-Béatrice Blanc-Potard[1]*

1 Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, Université de Montpellier, CNRS-UMR5235, Montpellier, France, **2** LISM, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, CNRS & Aix-Marseille Univ, Marseille, France

☯ These authors contributed equally to this work.
* anne.blanc-potard@umontpellier.fr

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Garai P, Berry L, Moussouni M, Bleves S, Blanc-Potard A-B (2019) Killing from the inside: Intracellular role of T3SS in the fate of *Pseudomonas aeruginosa* within macrophages revealed by *mgtC* and *oprF* mutants. PLoS Pathog 15(6): e1007812. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007812

Editor: Joan Mecsas, Tufts University, UNITED STATES

Received: January 18, 2019

Accepted: May 2, 2019

Published: June 20, 2019

Copyright: © 2019 Garai et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: This work is supported by Vaincre La Mucoviscidose (http://www.vaincrelamuco.org/) (RF20150501356/1/1/47 and RIF20170502042) and Association Gregory Lemarchal (https://association-gregorylemarchal.org/). PG is supported by the Association Méditerranée Infection (http://www.mediterranee-infection.com/

Abstract

While considered solely an extracellular pathogen, increasing evidence indicates that *Pseudomonas aeruginosa* encounters intracellular environment in diverse mammalian cell types, including macrophages. In the present study, we have deciphered the intramacrophage fate of wild-type *P. aeruginosa* PAO1 strain by live and electron microscopy. *P. aeruginosa* first resided in phagosomal vacuoles and subsequently could be detected in the cytoplasm, indicating phagosomal escape of the pathogen, a finding also supported by vacuolar rupture assay. The intracellular bacteria could eventually induce cell lysis, both in a macrophage cell line and primary human macrophages. Two bacterial factors, MgtC and OprF, recently identified to be important for survival of *P. aeruginosa* in macrophages, were found to be involved in bacterial escape from the phagosome as well as in cell lysis caused by intracellular bacteria. Strikingly, type III secretion system (T3SS) genes of *P. aeruginosa* were downregulated within macrophages in both *mgtC* and *oprF* mutants. Concordantly, cyclic di-GMP (c-di-GMP) level was increased in both mutants, providing a clue for negative regulation of T3SS inside macrophages. Consistent with the phenotypes and gene expression pattern of *mgtC* and *oprF* mutants, a T3SS mutant (Δ*pscN*) exhibited defect in phagosomal escape and macrophage lysis driven by internalized bacteria. Importantly, these effects appeared to be largely dependent on the ExoS effector, in contrast with the known T3SS-dependent, but ExoS independent, cytotoxicity caused by extracellular *P. aeruginosa* towards macrophages. Moreover, this macrophage damage caused by intracellular *P. aeruginosa* was found to be dependent on GTPase Activating Protein (GAP) domain of ExoS. Hence, our work highlights T3SS and ExoS, whose expression is modulated by MgtC and OprF, as key players in the intramacrophage life of *P. aeruginosa* which allow internalized bacteria to lyse macrophages.

). MM is supported by Vaincre La Mucoviscidose (RIF20170502042). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

Author summary

The ability of professional phagocytes to ingest and kill microorganisms is central to host defense and *Pseudomonas aeruginosa* has developed mechanisms to avoid being killed by phagocytes. While considered an extracellular pathogen, *P. aeruginosa* has been reported to be engulfed by macrophages in animal models. Here, we visualized the fate of *P. aeruginosa* within cultured macrophages, revealing macrophage lysis driven by intracellular *P. aeruginosa*. Two bacterial factors, MgtC and OprF, recently discovered to be involved in the intramacrophage survival of *P. aeruginosa*, appeared to play a role in this cytotoxicity caused by intracellular bacteria. We provided evidence that type III secretion system (T3SS) gene expression is lowered intracellularly in *mgtC* and *oprF* mutants. We further showed that intramacrophage *P. aeruginosa* uses its T3SS, specifically the ExoS effector, to promote phagosomal escape and cell lysis. We thus describe a transient intramacrophage stage of *P. aeruginosa* that could contribute to bacterial dissemination.

Introduction

Pathogenic bacteria are commonly classified as intracellular or extracellular pathogens [1]. Intracellular bacterial pathogens, such as *Mycobacterium tuberculosis* or *Salmonella enterica*, can replicate within host cells, including macrophages. In contrast, extracellular pathogens, such as *Yersinia* spp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* or streptococci, avoid phagocytosis or exhibit cytotoxicity towards phagocytic cells, to promote their extracellular multiplication. However, recent data have emphasized that several extracellular pathogens can enter host cells *in vivo*, resulting in a phase of intracellular residence, which can be of importance in addition to the typical extracellular infection. For example, although *Yersinia* spp. subvert the functions of phagocytes from the outside, these bacteria also subvert macrophage functions within the cell [2]. Once considered an extracellular pathogen, it is now established that *S. aureus* can survive within many mammalian cell types including macrophages [3,4] and the intramacrophage fate of *S. aureus* has been deciphered [5,6]. Moreover, an intracellular phase within splenic macrophages has been recently shown to play a crucial role in initiating dissemination of *Streptococcus pneumoniae*, providing a divergence from the dogma that considered this bacterial pathogen a classical example of extracellular pathogens [7].

The environmental bacterium and opportunistic human pathogen *P. aeruginosa* is responsible for a variety of acute infections and is a major cause of mortality in chronically infected cystic fibrosis (CF) patients. The chronic infection of *P. aeruginosa* and its resistance to treatment is largely due to its ability to form biofilms, which relies on the production of exopolysaccharides (EPS), whereas the type III secretion system (T3SS) is reported to play a key role in the pathogenesis of acute *P. aeruginosa* infections [8]. Four T3SS effectors (ExoU, ExoS, ExoT, ExoY) have been identified so far, ExoS being nearly always mutually exclusive with the potent cytotoxin ExoU and more prevalent than ExoU [9–11]. ExoS has a dual function as it contains a GTPase activating protein (GAP) domain as well as an ADP ribosyltransferase (ADPRT) domain [10]. An intracellular step in airway epithelial cells has been proposed to occur before the formation of biofilm during the acute phase of infection [12,13] and the intracellular stage of *P. aeruginosa* within cultured epithelial cells has been fairly studied [14–16]. The principle that *P. aeruginosa* is not exclusively an extracellular pathogen has been convincingly established by the recent use of advanced imaging methods to track bacteria within epithelial cells [17]. The T3SS, more specifically its effector ExoS, has been implicated in the formation of membrane blebs-niche and avoidance of acidified compartments to allow bacterial

multiplication within epithelial cells [17–19]. Concordantly, T3SS genes were recently shown to be expressed in *P. aeruginosa* internalized in epithelial cells [17]. Regarding the interaction with macrophages, *P. aeruginosa* has developed mechanisms to avoid phagocytosis [20]. However, *P. aeruginosa* has been shown to be phagocytosed by macrophages in an acute model of infection in zebrafish embryos [21,22] and has been reported to be engulfed by alveolar macrophages in the lungs of mice early after pulmonary infection [23], suggesting that *P. aeruginosa* may need strategies to escape macrophage killing. Although *P. aeruginosa* has been localized within cultured macrophages during gentamicin protection assays [24–26], the intramacrophage fate of the bacteria has not been characterized and bacterial factors involved in this step remain largely unexplored.

Bacterial survival in a particular niche requires the development of an adaptive response, generally mediated by regulation of the bacterial genes involved in physiological adaptation to the microenvironment. The identification of mutants lacking the ability to survive within macrophages and the study of *P. aeruginosa* gene expression inside macrophages is critical to determine bacterial players in this step. We have previously uncovered MgtC as a bacterial factor involved in the intramacrophage survival of *P. aeruginosa* [25,27]. In agreement with this intramacrophage role, expression of *Pseudomonas mgtC* (PA4635) gene is induced when the bacteria reside inside macrophages [25]. MgtC is known to promote intramacrophage growth in several classical intracellular bacteria, including *Salmonella typhimurium* where it inhibits bacterial ATP synthase and represses cellulose production [28–30], and is considered as a clue to reveal bacterial pathogens adapted to an intramacrophage stage [30,31]. In addition, a recent study has implicated the outer membrane protein OprF in the ability of otopathogenic *P. aeruginosa* strains to survive inside macrophages [26]. OprF is an outer membrane porin that can modulate the production of various virulence factors of *P. aeruginosa* [32,33].

In the present study, we investigated the fate of *P. aeruginosa* within macrophages using wild-type PAO1 strain, which lacks ExoU, along with isogenic *mgtC* and *oprF* mutants. We also explored, for the first time, the regulation of T3SS genes when *P. aeruginosa* resides inside macrophages. The T3SS and ExoS effector, whose expression was found to be modulated by MgtC and OprF intracellularly, were seemingly involved in this intracellular stage, playing a role in vacuolar escape and cell lysis caused by intracellular bacteria.

Results

Intracellular *P. aeruginosa* can promote macrophage lysis

We previously visualized fluorescent *P. aeruginosa* residing within fixed macrophages [25]. To investigate the fate of *P. aeruginosa* after phagocytosis in a dynamic way, we monitored macrophages infected with fluorescent bacteria using time-lapse live microscopy. J774 macrophages were infected with wild-type PAO1 strain expressing GFP grown exponentially in LB medium (Multiplicity of infection or MOI = 10). After 25 minutes of phagocytosis, several washes were performed to remove non-internalized bacteria and gentamicin was added to kill the remaining extracellular bacteria. Microscopic observation of infected macrophages up to 3 hours showed cell lysis with increasing time (Fig 1), starting between 1.5 and 2 hours post-phagocytosis, which can be attributed to intracellular bacteria as gentamicin was retained throughout the experiment. No lysis of uninfected cells present in the same field was observed (Fig 1 and S1 Fig), as expected from an event due to intracellular bacteria rather than extracellular bacteria. The cell lysis appeared to take place within a rapid time frame of few seconds, as shown by the movie (S1 Movie), after which the bacteria seemed to be released from the host cell. We also infected human monocyte-derived macrophages (HMDMs) with GFP producing PAO1 strain under similar conditions and found lysed infected cells after 2 hours of phagocytosis (S2

Fig 1. Live imaging of macrophages infected with *P. aeruginosa*. J774 macrophages were infected with PAO1 wild-type (WT) strain expressing GFP. Time lapse imaging was started at 1.5 hrs post-phagocytosis. Cells were maintained in DMEM supplemented with gentamicin at 37˚C and 5% CO_2 throughout imaging. White arrows point at the cells that harbor intracellular bacteria and undergo lysis between 1.5 hrs and 3 hrs post-phagocytosis. Black arrow shows an uninfected and unlysed cell. Scale bar is equivalent to 10 μm.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007812.g001

Fig). Hence, the phenomenon of lysis of macrophages by intracellular PAO1 is not restricted to J774 murine cell line, but is extendable to primary human macrophages.

We further examined intracellular *P. aeruginosa* within macrophages in more detail using transmission electron microscopy (TEM). J774 macrophages infected with wild-type PAO1 strain, were subjected to fixation at early time post-infection (30 min after phagocytosis) or at later time of infection (3 hrs after phagocytosis). After phagocytosis, *P. aeruginosa* was present in membrane bound vacuoles inside macrophages (Fig 2A). At a later time point, some bacteria could be found in the cytoplasm with no surrounding membrane, suggesting disruption of the vacuole membrane (Fig 2B). The infected macrophage was damaged, displaying highly condensed chromatin and membrane blebbing, and lacking pseudopodia. Healthy infected cells were also observed, where bacteria were mostly found in vacuoles partially or totally filled with heterogeneous electron dense material, suggesting that the vacuole has fused with lysosomes (Fig 2C). To confirm this, we examined the association between fluorescent PAO1 bacteria and the LysoTracker probe during infection using fixed macrophages. Bacteria colocalizing with LysoTracker could be visualized (S3 Fig), thereby corroborating the TEM observation of fusion of vacuoles with lysosomes and the localization of bacteria in acidified compartment.

TEM analyses allowed us to conclude that wild-type PAO1 strain has the ability to reside within vacuoles and possibly escape from the phagosome into the cytoplasm, and promote cell damage. A rapid cell lysis event caused by intracellular *P. aeruginosa* visualized by live microscopy revealed that phagocytosed bacteria can escape from macrophage through cell lysis.

Intracellular *mgtC* and *oprF* mutants are compromised in cell lysis

Our previous results based on gentamicin protection assay on J774 infected macrophages and counting of colony forming units (CFU) indicated that *mgtC* mutant (generated in the PAO1 background) survived to a lesser extent than the wild-type strain [25]. More recently, an *oprF* mutant of an otopathogenic strain of *P. aeruginosa* was also found to be defective in intracellular survival in mouse bone marrow macrophages based on gentamicin protection assay [26]. To analyze the phenotypes of *oprF* mutant in the PAO1 background towards J774 macrophages and compare that with *mgtC* mutant, we used here a previously described *oprF* mutant generated in PAO1 strain [25,34].

Based on the finding that intracellular *P. aeruginosa* can cause macrophage lysis, we developed a suitable assay using fluorescent microscopic analysis to quantify cell damage caused by intracellular bacteria. Macrophages were infected with fluorescent bacteria, treated with

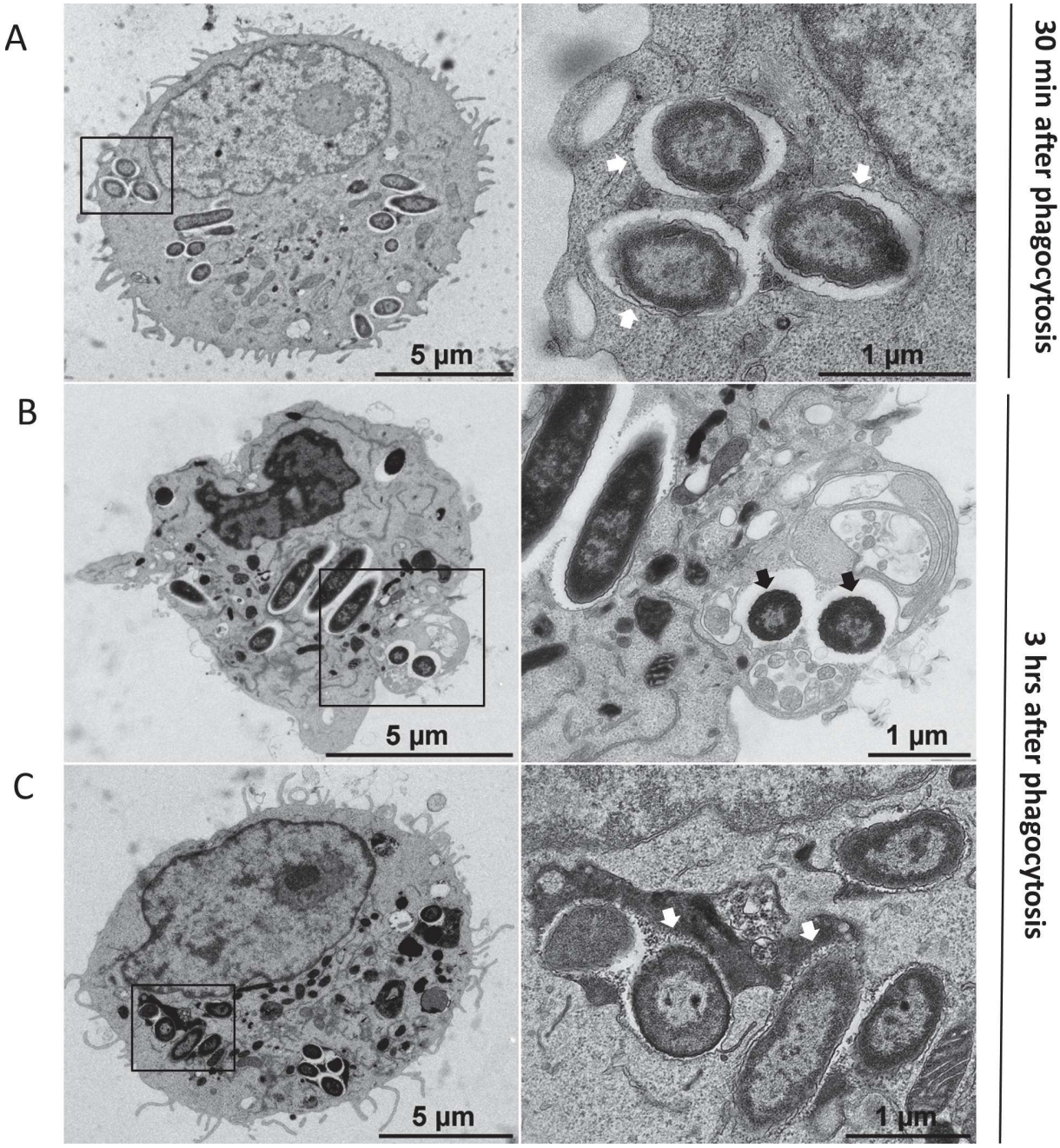


Fig 2. Transmission electron micrographs (TEM) of *P. aeruginosa* within macrophages. J774 macrophages were infected with *P. aeruginosa* for 30 min (A) or 3 hrs (B and C) and subjected to TEM (left panels). Black rectangles show intracellular bacteria that are shown at higher magnification in the right panels. A. At early time after phagocytosis, most of bacteria were found inside membrane bound vacuoles (white arrows). B. At later time, some bacteria can be observed in the cytoplasm with no surrounding membrane suggesting disruption of the vacuole membrane (black arrows). The infected macrophage in panel B shows an abnormal morphology, with highly condensed chromatin and membrane blebbing, but no pseudopodia. C. At later time, bacteria can also be found in vacuole partially or totally filled with heterogeneous electron dense material (white arrows), suggesting that the vacuole has fused with lysosomes. The infected macrophage shown in panel C appears normal.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007812.g002

gentamicin for 2 hours after phagocytosis, fixed and stained with phalloidin-TRITC to label F-actin and visualize macrophage morphology. A clear cortical red labeling was seen in most

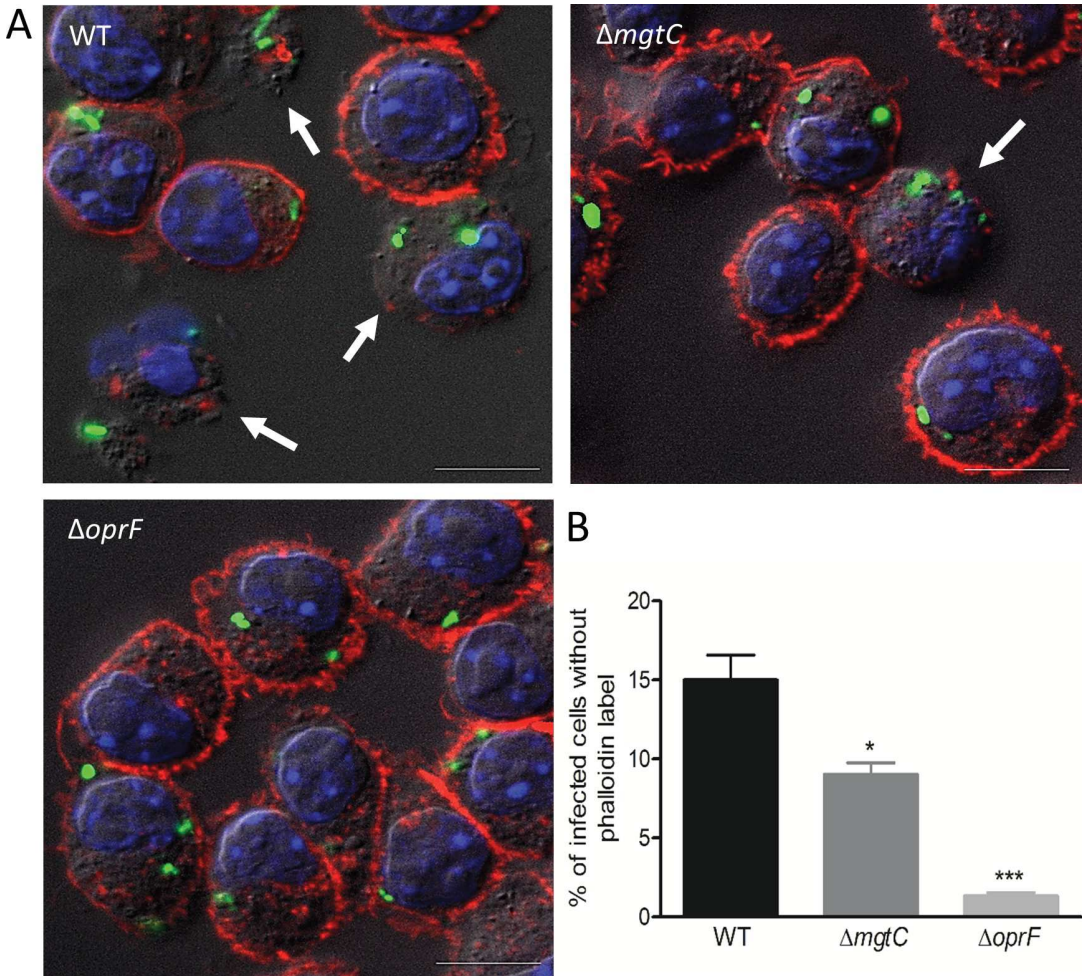


Fig 3. Visualization (A) and quantification (B) of lysed infected cells upon phalloidin labeling. GFP expressing PAO1 WT, Δ*mgtC* and Δ*oprF* strains were used for infecting J774 macrophages. Gentamicin was added after phagocytosis and cells were fixed at 2 hrs post-phagocytosis, stained with phalloidin and imaged with fluorescent microscope. DAPI was used to stain the nucleus. Cells that have intracellular bacteria, but lack the phalloidin cortical label were considered as lysed by intracellular bacteria (shown by arrows). Scale bar is equivalent to 10 μm. After imaging, infected cells were counted and percentage of lysed cells with intracellular bacteria out of total number of cells was plotted for each strain. Error bars correspond to standard errors from three independent experiments. At least 200 cells were counted per strain. The asterisks indicate *P* values (One way ANOVA, where all strains were compared to WT using Dunnett's multiple comparison post-test, $^{*}P < 0.05$ and $^{***}P < 0.001$), showing statistical significance with respect to WT.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007812.g003

cells, which is indicative of the plasma membrane-associated cortical actin. Few infected cells appeared lysed due to the loss of cortical actin staining (Fig 3A), which agrees with the observation of lysed macrophages in time lapse fluorescence microscopy (Fig 1). The loss of cortical actin staining was found to be due to internalized bacteria because upon arresting phagocytosis, by treating macrophages with cytochalasin D, bacteria were not internalized and loss of cortical actin staining was not observed (S4 Fig). Hence, any delayed effect of extracellular bacteria occurring before gentamicin treatment or a contribution of extracellular bacteria that would resist gentamicin treatment can be ruled out. Quantification of the number of cells without phalloidin labelling showed highest value for cells infected with wild-type strain, intermediate with *mgtC* mutant and lowest with *oprF* mutant (Fig 3B). Thus, both intracellular *mgtC* and *oprF* mutants appeared compromised for cell lysis. This feature is not linked to a

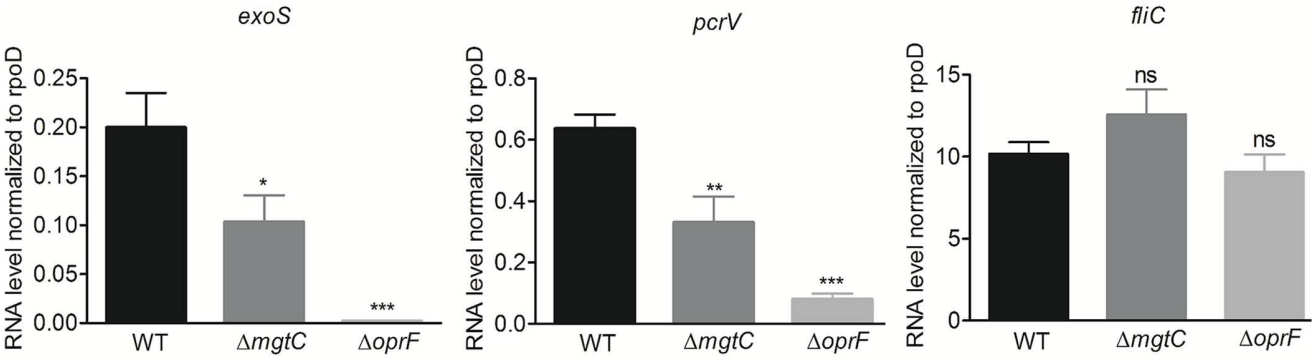


Fig 4. Expression of T3SS genes in *P. aeruginosa* strains residing in J774 macrophages. J774 macrophages were infected with PAO1 WT, Δ*mgtC* and Δ*oprF* strains. After phagocytosis, cells were maintained in DMEM supplemented with gentamicin. RNA was extracted from bacteria isolated from infected macrophages 1 hr after phagocytosis. The level of *exoS*, *pcrV* and *fliC* transcripts relative to those of the house-keeping gene *rpoD* was measured by qRT-PCR and plotted on the Y-axis. Error bars correspond to standard errors from at least three independent experiments. The asterisks indicate *P* values (One way ANOVA, where all strains were compared to WT using Dunnett's multiple comparison post-test, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ and ns = $P > 0.05$ or non-significant), showing statistical significance with respect to WT.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007812.g004

lower internalization rate of the mutant strains, because *mgtC* mutant is known to be more phagocytosed than wild-type strain [25] and a similar trend was found for *oprF* mutant (not shown). Since T3SS has been involved in the intracellular life of *P. aeruginosa* in other cell types [17], we next monitored the expression of T3SS genes during the residence of bacteria within macrophages.

Down-regulation of T3SS gene expression in *mgtC* and *oprF* mutants inside macrophages

The *P. aeruginosa oprF* mutant was reported to be defective in the secretion of T3SS effectors in liquid culture and in the production of PcrV, the T3SS needle tip protein [32,34], but the effect of OprF on transcription of T3SS genes has not been tested so far. We thus investigated the expression of the effector gene *exoS* along with the gene *pcrV* in *oprF* mutant strain in comparison to wild-type strain upon macrophage infection. As a control, we tested flagellin coding gene *fliC*, which is not part of the T3SS regulon, but was proposed to be secreted by the T3SS [35]. Expression of both *pcrV* and *exoS* genes was found to be remarkably reduced in the *oprF* mutant (Fig 4). Strikingly, the *mgtC* mutant also exhibited significantly reduced expression of these two T3SS genes (Fig 4), although to a lesser extent than the *oprF* mutant, indicating an unexpected interplay between MgtC and T3SS. On the other hand, *fliC* expression was not altered in both mutants.

Since we observed a decreased transcriptional level of T3SS genes in the *oprF* mutant, we further examined the link between intramacrophage expression of T3SS and cell lysis in this mutant. A recombinant plasmid allowing IPTG-inducible overproduction of ExsA, a master transcriptional activator of T3SS genes [36], was introduced in the *oprF* mutant. Upon induction of *exsA* expression with 0.01 mM IPTG, *oprF* mutant promoted macrophage lysis like the wild-type strain (S5 Fig), supporting a model whereby the effect of OprF is the result of its positive regulatory effect on T3SS expression.

To address the mechanism behind the downregulation of transcription of T3SS in *oprF* and *mgtC* mutant strains, we evaluated the level of the second messenger c-di-GMP, as it is known to participate in T3SS repression in *P. aeruginosa* [37]. The *oprF* mutant was already reported to have high production of c-di-GMP in liquid culture [34]. We used a fluorescence-based

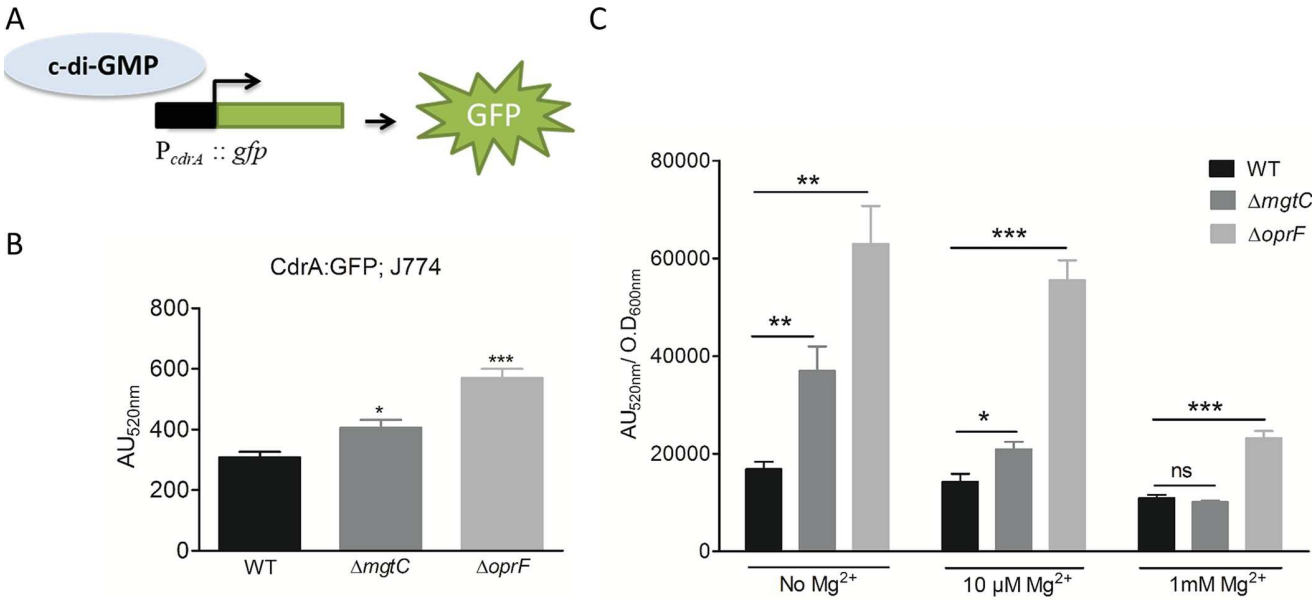


Fig 5. Measurement of c-di-GMP level in Δ*mgtC* and Δ*oprF* mutants. PAO1 WT, Δ*mgtC* and Δ*oprF* harboring reporter plasmid pCdrA::*gfp*, which expresses GFP under the control of the promoter of c-di-GMP responsive gene *cdrA* (A), were used to infect J774 cells and fluorescence was measured (B). After phagocytosis, DMEM containing 300 μg/ml of amikacin was added to eliminate extracellular bacteria. Fluorescence (excitation, 485 nm and emission, 520 nm) was measured 1 hour after phagocytosis and plotted as arbitrary units (AU). Error bars correspond to standard errors from four independent experiments. The asterisks indicate *P* values (One way ANOVA, where all strains were compared to WT using Dunnett's multiple comparison post-test, $^{*}P < 0.05$ and $^{***}P < 0.001$), showing statistical significance with respect to WT. (C) PAO1 WT, Δ*mgtC* and Δ*oprF* harboring reporter plasmid pCdrA::*gfp*, were grown in NCE medium with varying concentration of Mg^{2+}. After 1 hour of growth, fluorescence (excitation, 485 nm and emission, 520 nm) of the culture was measured along with its OD_{600nm}. The fluorescence was plotted as arbitrary units (AU_{520nm}) after normalizing with OD_{600nm}. Error bars correspond to standard errors from three independent experiments. The asterisks indicate *P* values showing statistical significance with respect to WT in the respective condition, using Student's t test (ns = $P > 0.05$, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$).

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007812.g005

reporter (Fig 5A) that has been validated to gauge c-di-GMP level inside *P. aeruginosa* [38]. The pCdrA::*gfp* plasmid was introduced into wild-type and mutant strains, and fluorescence was measured in infected macrophages (Fig 5B). Both *oprF* and *mgtC* mutants exhibited significantly increased activity of the *cdrA* promoter comparatively to wild-type strain, indicative of higher levels of c-di-GMP than the wild-type strain. To better appreciate the differences monitored within macrophages, we also measured fluorescence of strains grown in culture medium with various magnesium concentrations (Fig 5C). The *oprF* mutant exhibited a two to three-fold increase in the activity of the *cdrA* promoter comparatively to wild-type strain, which is in the same range as the increase observed within macrophages (Fig 5B), and agrees with published data obtained with this indirect strategy and direct c-di-GMP measurement [34]. Under magnesium limitation, a condition known to induce *mgtC* expression, the *mgtC* mutant also showed increased activity of the *cdrA* promoter comparatively to wild-type strain, with a two-fold increase in the absence of Mg^{2+}, and a minor, but significant, increase in the presence of 10 μM Mg^{2+} (that is similar to what is observed within macrophages). On the other hand, the level of fluorescence of wild-type strain and *mgtC* mutant was identical in medium supplemented with 1 mM Mg^{2+}, a condition that prevents *mgtC* expression [25]. Taken together, these results indicate that the production of c-di-GMP is increased relatively to wild-type strain in both *oprF* and *mgtC* mutants, with a more pronounced effect for *oprF*, when bacteria reside within macrophages, thus providing a mechanistic clue for the negative effect on T3SS gene expression.

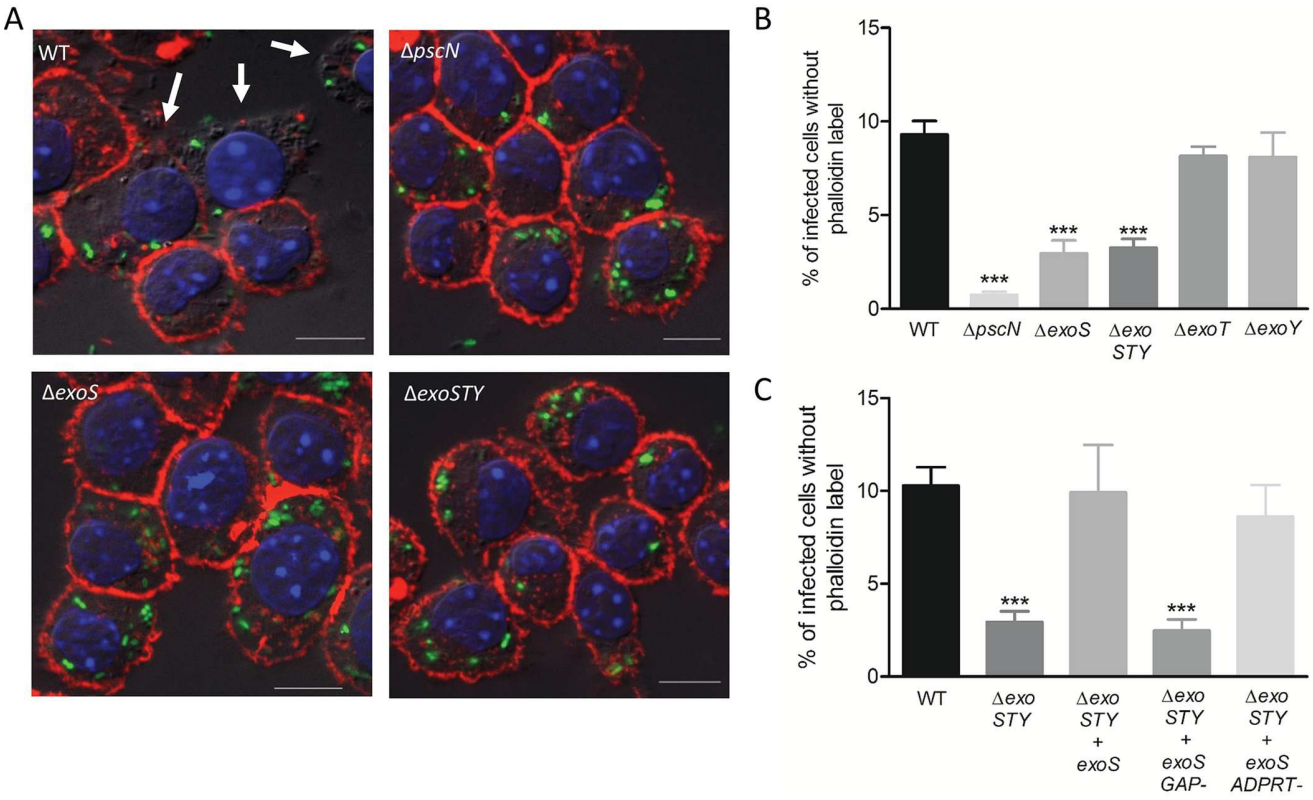


Fig 6. Assessment of role of T3SS and its effectors in cell lysis induced by intracellular PAO1. J774 macrophages were infected with GFP expressing strains as indicated. After phagocytosis, cells were maintained in DMEM supplemented with gentamicin. Cells were imaged 2 hrs post-phagocytosis after staining with phalloidin (A). Scale bar is equivalent to 10 μm. Lysis was quantified (B & C) by counting infected cells lacking cortical labeling (indicated by arrows). Percentage of lysed cells with intracellular bacteria out of total number of infected cells was plotted. Error bars correspond to standard errors from at least three independent experiments. At least 200 cells were counted per strain. The asterisks indicate *P* values (One way ANOVA, where all strains were compared to WT using Dunnett's multiple comparison test, $^{***}P < 0.001$), showing statistical significance with respect to WT.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007812.g006

A T3SS mutant is defective for cell death driven intracellularly in an ExoS-dependent manner

Given the effect of both *oprF* and *mgtC* deletions on the expression of T3SS genes within macrophages, we investigated the fate of a T3SS mutant upon phagocytosis. We first used a *pscN* mutant that is defective for the ATPase function of the T3SS machinery [36]. Intracellular T3SS mutant did not induce loss of cortical phalloidin staining, as shown by fluorescent imaging and subsequent quantification, indicating lack of cell lysis (Fig 6A and 6B). Thus, the phenotype of T3SS mutant is consistent with that of *mgtC* and *oprF* mutants and is in correlation with their level of T3SS gene expression. We further examined the relevance of our findings to primary human macrophages, by assessing the lysis of HMDMs driven intracellularly by wild-type *P. aeruginosa* or *oprF* and *pscN* mutants. The count of intracellularly lysed cells was significantly different between wild-type and each mutant strain (Fig 7), with a similar trend to that of J774 macrophages (Fig 3 and Fig 6), thus confirming the importance of T3SS in intracellularly driven lysis of primary human macrophages as well.

To address the implication of T3SS effector proteins in this process, we used mutant strains for individual effector genes *exoS*, *exoT* and *exoY*, and *exoSTY* triple mutant. The intracellular lysis of macrophages was found to be reduced for the *exoSTY* triple mutant and to a similar extent for the *exoS* mutant (Fig 6A and 6B), suggesting a major contribution of ExoS.

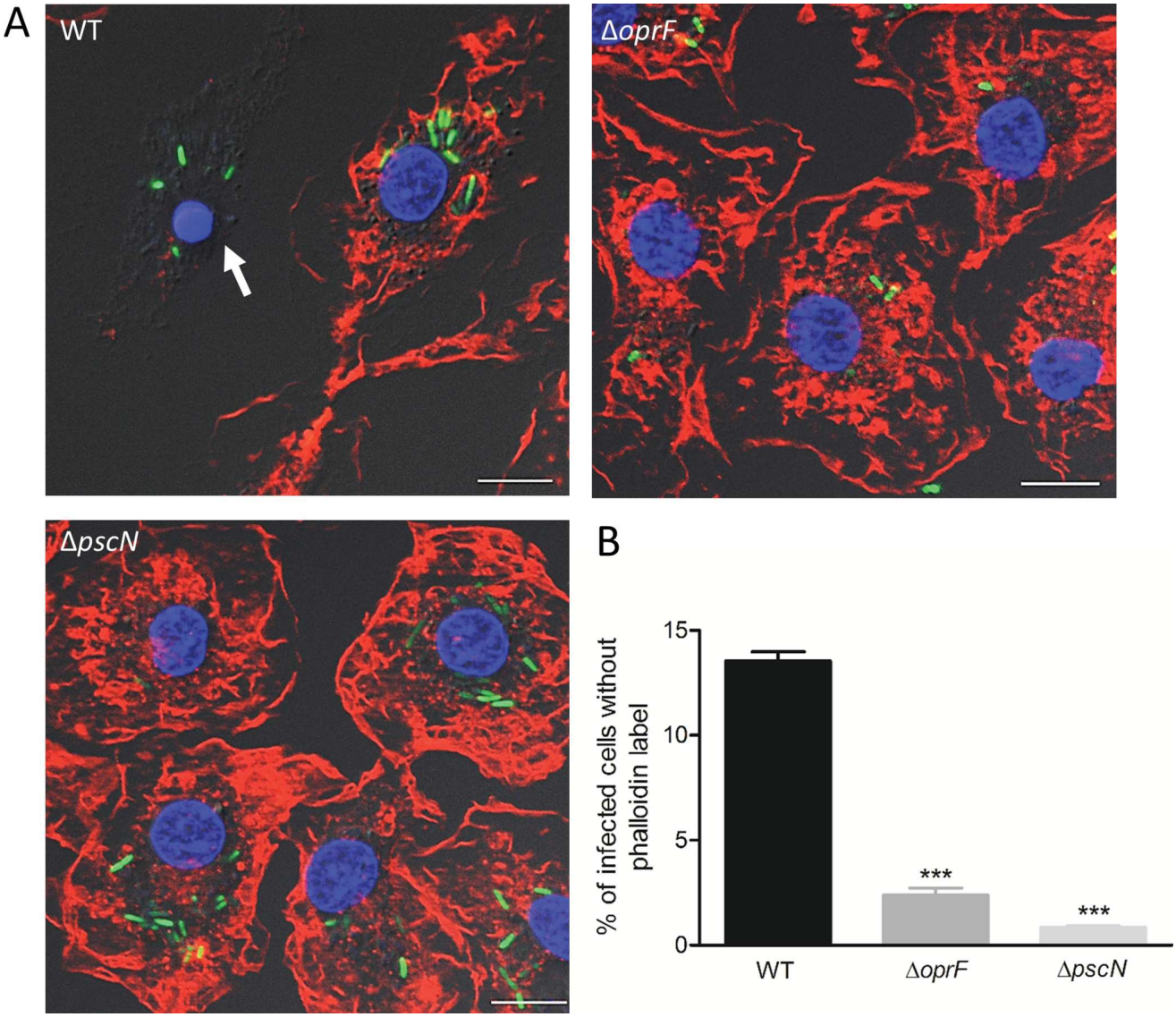


Fig 7. Visualization and quantification of lysis of infected primary human macrophages driven intracellularly by *P. aeruginosa* strains. HMDMs were infected with GFP expressing PAO1 WT, Δ*oprF*, and Δ*pscN* strains. After phagocytosis, cells were maintained in RPMI supplemented with gentamicin. Cells were imaged 2 hrs post-phagocytosis after staining with phalloidin (A) and lysis was quantified (B) by counting infected cells lacking cortical labeling (indicated by arrows). Scale bar is equivalent to 10 μm. Percentage of lysed cells with intracellular bacteria out of total number of infected cells was plotted. Error bars correspond to standard errors from two independent experiments. At least 200 cells were counted per strain. The asterisks indicate *P* values (One way ANOVA, where all strains were compared to WT using Bonferroni's multiple comparison test, $^{***}P < 0.001$), showing statistical significance with respect to WT.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007812.g007

Accordingly, *exoT* and *exoY* mutants behave similarly to wild-type strain (Fig 6B). Moreover, complementation of the *exoSTY* mutant with *exoS* restored the wild-type phenotype (Fig 6C). Although the lysis by *exoS* mutant strain was substantially higher than that of *pscN* mutant, these results suggest that the T3SS-mediated intracellular lysis of macrophages by *P. aeruginosa* relies mainly on the T3SS effector ExoS. Thus, this ExoS-dependent cytotoxic effect mediated by intracellular bacteria differs from the classical T3SS-dependent cytotoxicity driven by extracellular bacteria towards macrophages that has been reported to be mostly independent of ExoS [39–41]. To confirm this difference between intracellular and extracellular bacteria

mediated lysis, we measured the lactate dehydrogenase (LDH) release when infection was carried out without removing extracellular bacteria. As expected, similar values were obtained for wild-type strain and *exoS* mutant, whereas a *pscN* mutant showed significantly reduced LDH release (S6 Fig), which agrees with the reported T3SS-dependent but ExoS independent cytotoxicity caused by extracellular bacteria. This is also consistent with trypan blue exclusion assay, which monitors cell death based on penetration of a membrane impermeable dye, when the assay is done immediately after phagocytosis (S7 Fig, panel A).

ExoS possesses GAP domain as well as ADPRT domain and complementing strains retaining only one of these two domains have been constructed earlier [42]. To determine which domain of ExoS plays a role in intracellular cytotoxicity, we carried out the phalloidin-based lysis assay using the *exoSTY* mutant producing either ADPRT (GAP-) or GAP (ADPRT-) domain of ExoS. Our results clearly showed that the strain retaining GAP activity of ExoS but lacking ADPRT activity (Δ*exoSTY* + *exoS* ADPRT-) could complement the phenotype to an extent similar to the strain complemented with *exoS* (Fig 6C), which is also equivalent to the wild-type. To strengthen our findings, we performed trypan blue exclusion assay after 2hrs of gentamicin treatment post-phagocytosis. The results are consistent with phalloidin assay, supporting the implication of ExoS, and more specifically its GAP domain, for macrophage death induced by intracellular bacteria (S7 Fig, panel B). This contrasts with the results of trypan blue exclusion assay performed immediately after phagocytosis, where a low level of T3SS-dependent cell death is observed, but not linked to ExoS function (S7 Fig, panel A).

Hence, our results indicate that, in contrast to extracellular *P. aeruginosa*, intracellular *P. aeruginosa* uses an ExoS-dependent T3SS mediated mechanism to promote macrophage lysis. Moreover, only the GAP activity of ExoS is required for this process.

P. aeruginosa T3SS, *oprF* and *mgtC* mutants displayed lower vacuolar escape than wild-type PAO1

The phagosomal environment of the macrophage is hostile for bacterial pathogens and TEM analysis indicated that PAO1 can be found in the cytoplasm, suggesting escape from the phagosomal vacuole (Fig 2B). We decided to address the intracellular role of T3SS, OprF and MgtC in the phagosomal escape of *P. aeruginosa* to the cytoplasm of macrophages. To monitor *P. aeruginosa* escape from phagosome, we used the CCF4-AM/β-lactamase assay that has been developed for tracking vacuolar rupture by intracellular pathogens [43]. This assay takes advantage of the natural production of β-lactamase by *P. aeruginosa* [44], which can cleave a fluorescent β-lactamase substrate, CCF4-AM, that is trapped within the host cytoplasm. CCF4-AM emits a green fluorescence signal, whereas in the presence of β-lactamase activity, a blue fluorescence signal is produced. The detection of blue fluorescent cells at 2 hrs post-phagocytosis indicated bacterial escape from the phagosome to the cytoplasm (Fig 8A). The escape of wild-type strain was compared to that of *mgtC*, *oprF* and *pscN* mutants by quantifying the percentage of blue fluorescent cells out of total green fluorescent cells. Wild-type strain showed significantly higher percentage of phagosomal escape than all mutants tested (Fig 8B). No significant difference in terms of cleavage of CCF4-AM was measured for the mutants with respect to wild-type in liquid cultures (S8 Fig), indicating that the lower amount of blue fluorescent cells with the mutants is not due to reduced production of endogenous β-lactamase. In agreement with the finding of phagosomal escape by CCF4-AM/β-lactamase assay, ruptured phagosomal membrane could be visualized by TEM in macrophages infected with PAO1 wild-type strain (Fig 8C). Both *exoS* and *exoSTY* effector mutants also displayed a low percentage of phagosomal escape, which appeared similar to that of *pscN* mutant (S9 Fig). These results indicate that the T3SS, through the ExoS effector, plays role in the escape of *P. aeruginosa* from the

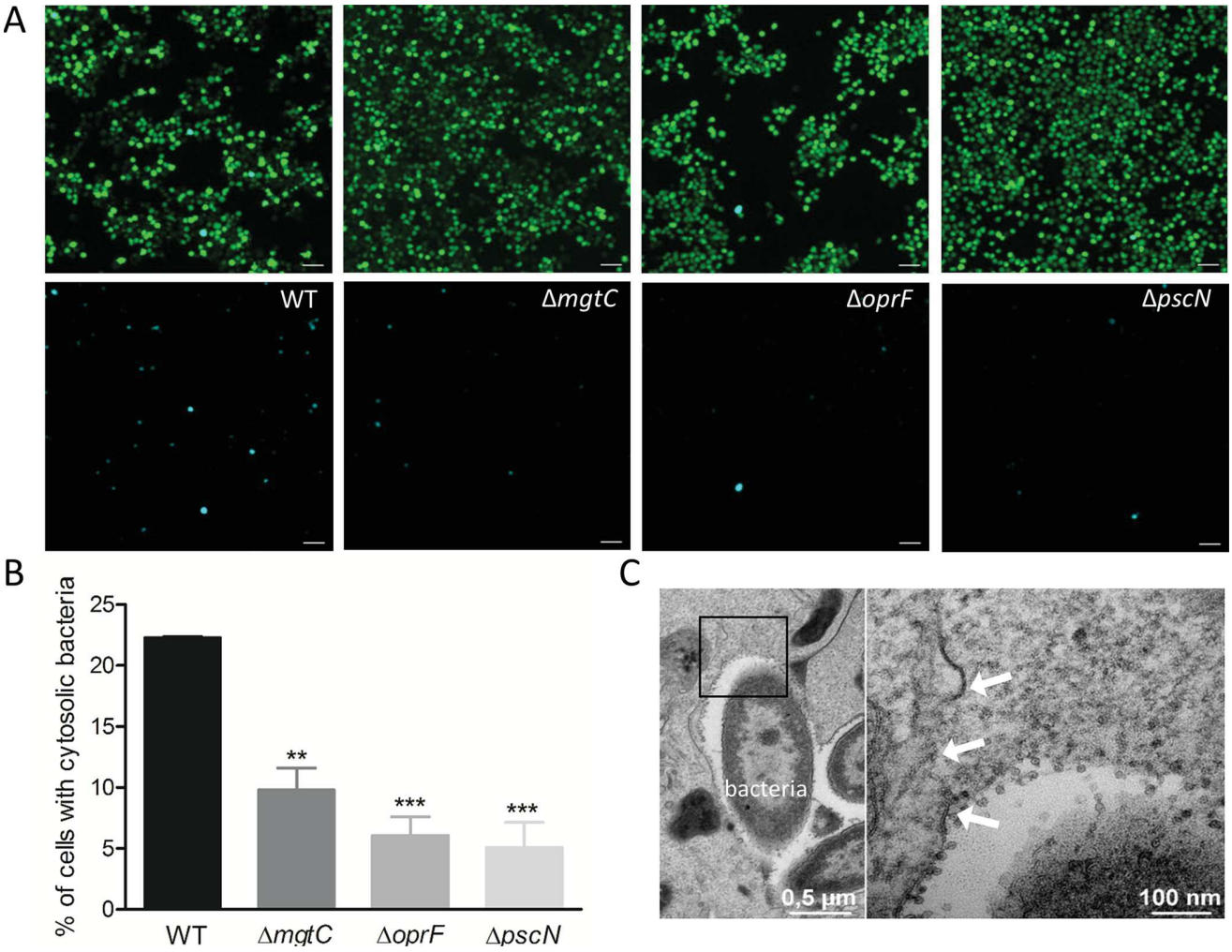


Fig 8. Assessment of access of *P. aeruginosa* to host cytosol using phagosome escape assay. J774 macrophages were infected with PAO1 WT, Δ*mgtC*, Δ*oprF* and Δ*pscN* strains. After phagocytosis, cells were stained with CCF4-AM in presence of gentamicin. 2 hrs post-phagocytosis, the cells were imaged with 10X objective using FITC and DAPI channels. Upon escape of bacteria from phagosome to the cytosol, the CCF4-AM FRET is lost, producing blue color. (A) Representative pictures are shown with the following channels: Total cell population is shown in merged green and blue cells, whereas cells with cleaved CCF4 probe are shown in blue in the lower panel. Scale bar is equivalent to 50 μm. (B) Images were analyzed and quantified by Cell Profiler software to calculate the percentage of blue cells out of total green cells. At least 200 cells were counted per strain. Error bars correspond to standard errors from three independent experiments. The asterisks indicate *P* values (One way ANOVA, where all strains were compared to WT using Dunnett's multiple comparison post-test, $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$), showing statistical significance with respect to WT. (C) Electron micrograph showing a disrupted vacuole membrane (white arrows) in a macrophage infected with PAO1 strain. The right panel shows higher magnification of the black square in the left panel.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007812.g008

phagosome to the cytoplasm. The effect of MgtC and OprF in this process may as well be mediated by their effect on T3SS gene expression (Fig 4).

Cumulatively, our results support a T3SS-dependent vacuolar escape for *P. aeruginosa*, leading to the localization of bacteria in the cytoplasm and cell lysis as depicted in the proposed model (Fig 9).

Discussion

The ability of professional phagocytes to ingest and kill microorganisms is central to innate immunity and host defense. *P. aeruginosa* is known to avoid being killed by phagocytes through the destruction of immune cells extracellularly as well as avoidance of phagocytosis

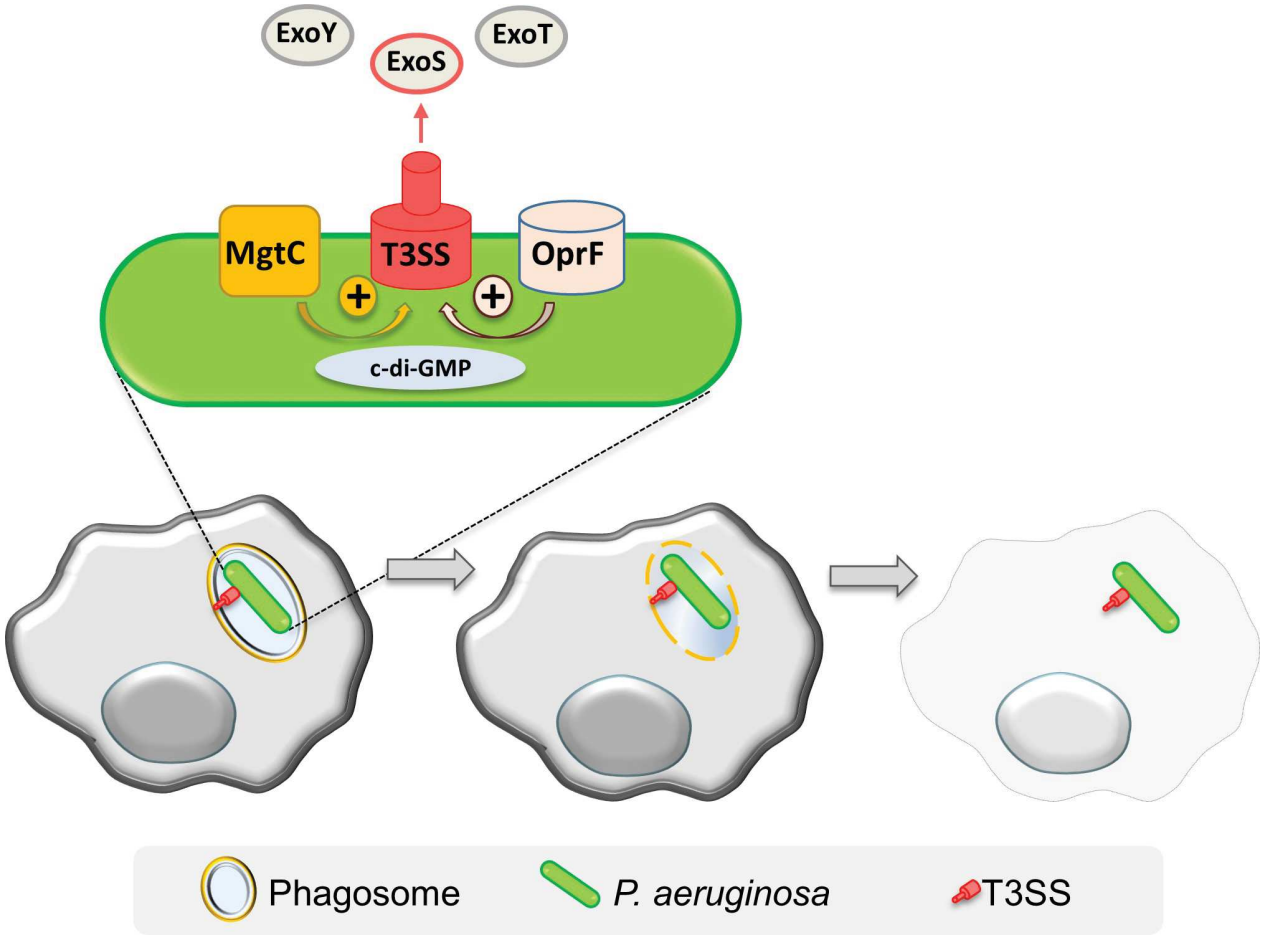


Fig 9. Model for intramacrophage fate of *P. aeruginosa*. Phagocytosed *P. aeruginosa* PAO1 first resides in a vacuole, before escaping the phagosome and promoting macrophage lysis. This cell lysis driven by intracellular *P. aeruginosa* involves the T3SS and more specifically ExoS. MgtC and OprF act positively on the expression of T3SS, possibly by reducing c-di-GMP level, a negative regulator of T3SS expression. Thereby T3SS and its effector ExoS play a role in phagosomal escape and cell lysis. Further work will be required to address secretion of ExoS from intracellularly expressed T3SS as well as identify host targets.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007812.g009

[20]. However, *P. aeruginosa* has been reported to be engulfed by macrophages in animal infection models [21–23]. In addition, *P. aeruginosa* has been visualized in phagocytes in cell culture models in several studies, where MgtC and OprF have been shown to be involved in the ability of *P. aeruginosa* to survive in cultured macrophages [25,26]. The virulence of *P. aeruginosa mgtC* mutant can be restored in zebrafish embryos upon macrophages depletion, suggesting that MgtC acts to evade phagocytes [25]. Interestingly, a similar behavior has been reported for a T3SS mutant in the same infection model [21]. We show here that MgtC and OprF regulate T3SS when *P. aeruginosa* resides in macrophages and we describe a novel strategy used by *P. aeruginosa* to escape from macrophages that relies on a T3SS-dependent cell lysis induced by intracellular bacteria (Fig 9).

Using electron microscopy, we demonstrate that upon phagocytosis, *P. aeruginosa* PAO1 strain resides in membrane bound vacuoles, whereas a cytosolic location can be observed at later time of infection, which corroborates the observation of an otopathogenic *P. aeruginosa* clinical strain in HMDMs [26]. Microscopic analysis of live and fixed cells revealed macrophage lysis driven by intracellular bacteria, with J774 macrophage cell line as well as HMDMs. This

cell lysis is a rapid process associated with the loss of cortical actin from plasma membrane. We propose that the cell lysis induced by intracellular *P. aeruginosa* is linked to the phagosomal escape of bacteria as indicated by the observation of cytosolic bacteria and ruptured phagosomal membrane by TEM as well as CCF4-AM/β-lactamase based phagosomal rupture assay.

To better characterize the *P. aeruginosa* factors involved in its intramacrophage fate, we investigated intracellular expression of T3SS genes in *mgtC* and *oprF* mutants. Expression of T3SS genes upon macrophage infection was significantly decreased in *mgtC* mutant and abrogated in *oprF* mutant. The production of T3SS effectors or needle component was previously known to be altered in the *oprF* mutant [32,34], but a direct effect at the transcriptional level was not investigated before. This regulation could be mediated by c-di-GMP, a known negative regulator of T3SS expression [37], as the reporter assay revealed an increased level of c-di-GMP in both *oprF* and *mgtC* mutants upon monitoring infected macrophages, with a more pronounced effect for *oprF* mutant. An increased level of c-di-GMP in *oprF* mutant is consistent with previous results obtained *in vitro* [34]. The moderate, but significant, increase in the level of c-di-GMP in *mgtC* mutant in macrophages with respect to wild-type strain is equivalent to the fold increase obtained in low-Mg^{2+} cultures. It is of interest to note that a *Salmonella mgtC* mutant also exhibited increased c-di-GMP level intracellularly and under low-Mg^{2+} condition [29]. The *P. aeruginosa mgtC* and *oprF* mutants showed a moderate and a more pronounced decrease, respectively, in cytotoxicity driven by intracellular bacteria and phagosomal escape. These phenotypes could be linked to the pattern of T3SS expression in *mgtC* and *oprF* mutants because a T3SS mutant appeared to lack cytotoxicity driven by intracellular bacteria and showed reduced phagosomal escape. Accordingly, inducing expression of *exsA* gene, a master activator of T3SS, in *oprF* mutant promoted macrophage lysis driven by intracellular bacteria to a similar level to that of wild-type strain, supporting the model whereby the phenotype of *oprF* mutant is the result of a negative regulation of T3SS expression.

Our data indicate that the T3SS-mediated cytotoxicity driven by intracellular *P. aeruginosa* is largely dependent on the ExoS effector. ExoS, which has a dual function [10], was known to play a role in the intracellular life of *P. aeruginosa* in cell types other than macrophages. The T3SS and ExoS are indeed key factors for intracellular replication of *P. aeruginosa* in epithelial cells, with a main role of the ADPRT domain in the formation of replicative niche in membrane blebs [18,19,45]. ExoS and ExoT ADPRT domains also promote bacterial survival in neutrophils [46], by having a protective role against NADPH-oxidase activity [47]. However, the effect of T3SS towards macrophages was so far restricted to the well-known cytotoxicity caused by extracellular *P. aeruginosa* [39,48–50]. In *P. aeruginosa* strains lacking ExoU toxin, such as PAO1, this cytotoxicity is due to inflammasome activation, which is dependent on T3SS translocation apparatus, but is independent of the ExoS effector [39–41,51]. Accordingly, this T3SS-dependent ExoS-independent cytotoxity was observed in our assays when extracellular bacteria were not removed. In contrast, upon removal of extracellular bacteria, a T3SS-mediated cytotoxicity implicating ExoS was uncovered. Hence, ExoS appears to be associated with cell damage only when it is secreted from internalized bacteria. Moreover, phagosomal rupture assay indicated that ExoS plays role in the escape of *P. aeruginosa* from the phagosome to the cytoplasm and we propose that upon phagosomal rupture, the cytoplasmic location of *P. aeruginosa* induces inflammasome, possibly through the release of bacterial lipopolysaccharides (LPS) in the cytoplasm, which would promote cell death. Therefore, in addition to the inflammasome activation caused by extracellular *P. aeruginosa* and, as very recently described, by intracellular T3SS-negative *P. aeruginosa* in the context of long-term infection [52], our study suggests that inflammasome and subsequent macrophage death can also be caused by intracellular T3SS-positive *P. aeruginosa*. Further studies will be required to characterize inflammasome activation and pathways that lead to cell death.

The intracellular implication of ExoS in both macrophages and epithelial cells suggests that the intracellular life of *P. aeruginosa* in macrophages shares features with the intracellular life of the pathogen in epithelial cells, even though the outcome is different. While bacteria actively replicate in epithelial cells, within bleb niches or in the cytosol [17], replication of bacteria is barely seen within macrophages resulting instead in cell lysis and bacterial escape from macrophages. Our results further indicate that the macrophage damage caused by intracellular *P. aeruginosa* is due to ExoS GAP domain, which thus differs from the reported role of the ADPRT domain of ExoS in blebs formation associated with intracellular replication of *P. aeruginosa* within epithelial cells [18,19,45]. On the other hand, the implication of GAP domain of ExoS towards epithelial cells in promoting cell rounding, actin reorganization or cell death has not been specifically associated with intracellular bacteria [53,54]. Although ExoS and ExoT GAP domain have similar biochemical activities, these effectors may differ in their localization inside host cells or they may interact with different host factors to bring about their effect. This is supported by the fact that apoptosis is induced in epithelial cells by ExoT GAP domain, a feature that was not reported for ExoS GAP domain [55] and by our finding that, unlike ExoS, ExoT is not involved in the intramacrophage phenotypes. Importantly, we show that the extent of phagosomal escape of *pscN* and *exoSTY* mutants was similar to that of *exoS* mutant alone, suggesting that ExoS is the main effector protein involved in the exit of *P. aeruginosa* from the phagosome. In epithelial cells, ExoS has been involved in avoidance of acidified compartment [18,19]. Considering our findings, ExoS may allow avoidance of acidification in macrophages and may also contribute to the vacuolar escape in epithelial cells. Further studies will be required to decipher in more detail, the function of ExoS inside macrophages, including a better understanding of its role in phagosomal escape and identification of its host targets within macrophages. ExoS-positive strains represent a large number of clinical isolates but the number of ExoS-negative strains is nevertheless substantial (about one third of isolates), especially among strains associated with bacteremia [10,11,56]. However, strains lacking ExoS usually encode the potent cytotoxin ExoU, thus exhibiting high toxicity towards eukaryotic cells from outside and less susceptibility to encounter an intracellular stage.

In conclusion, our results indicate that *P. aeruginosa* shares common feature with other so-called extracellular pathogens, such as *S. aureus*, which can reside transiently within macrophages [4] and require bacterial factors to survive this stage [57]. The present study uncovered bacterial factors allowing internalized *P. aeruginosa* to lyse macrophages. This should let bacteria to evade macrophages and an important issue now is to better evaluate the contribution of intramacrophage stage to disease outcome during *P. aeruginosa* infection. Survival of *P. aeruginosa* within macrophages and subsequent bacterial release may play a role in the establishment and dissemination of infection. There is also evidence that intracellular survival may contribute to persistence of the infection by creating a niche refractory to antibiotic action [24], highlighting the potential importance of this overlooked phase of *P. aeruginosa* infection.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

Bacterial strains and plasmids are described in Table 1. *P. aeruginosa* mutant strains (all in the PAO1 background) have been described and phenotypically characterized previously (Table 1). The *oprF* mutant (strain H636) is derived from PAO1 wild-type strain H103 [34], which exhibits the same level of ExoS secretion under T3SS-inducing conditions as PAO1, the isogenic strain for *mgtC* and T3SS mutants (S10 Fig). *P. aeruginosa* was grown at 37˚C in Luria broth (LB). Growth in magnesium-defined medium was done in NCE-minimal medium [58] supplemented with 0.1% casamino acids, 38 mM glycerol, without $MgSO_4$ or containing

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in the study.

Name	Description	Reference
PAO1		Laboratory collection
PAO1 Δ*mgtC*	Δ*mgtC*	[25]
H636	Δ*oprF*	[34]
PAO1 Δ*pscN*	Δ*pscN* T3SS ATPase mutant	[36]
PAO1 Δ*exoS*	Δ*exoS*	[50]
PAO1 Δ*exoY*	Δ*exoY*	[50]
PAO1 Δ*exoT*	Δ*exoT*	[50]
PAO1 Δ*exoSTY*	Δ*exoSTY*	[50]
PAO1FΔ3Tox/ExoS	Δ*exoS* Δ*exoT* Δ*exoY attB*::*exoS*	[42]
PAO1FΔ3Tox/ExoS$_{GAP}$-	Δ*exoS* Δ*exoT* Δ*exoY attB*::*exoS*-$R_{146}K$	[42]
PAO1FΔ3Tox/ExoS $_{ADPR}$ -	Δ*exoS* Δ*exoT* Δ*exoY attB*::*exoS*-$E_{379}D/E_{381}D$	[42]
pRK2013	Tra$^+$, Mob$^+$, ColE1, Km^r	Laboratory collection
pMF230	GFP*mut2*, Amp^r	[59]
pTn7CdrA::*gfp*^{C}	Amp^r, Gm^r	[38]
pSBC6	*exsA* cloned in pMMB190 under control of *tacp* Amp^r	[36]

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007812.t001

10 μM or 1mM $MgSO_4$. Plasmid pMF230 expressing GFP constitutively [59] (obtained from Addgene), was introduced in *P. aeruginosa* by conjugation, using an *E. coli* strain containing helper plasmid pRK2013. Recombinant bacteria were selected on *Pseudomonas* isolation agar (PIA) containing carbenicillin at the concentration of 300 μg/ml.

Infection of J774 macrophages

J774 cells (murine macrophage cell line J774A.1, gifted by Gisèle Bourg, Inserm U 1047, Nîmes, France) were maintained at 37˚C in 5% CO_2 in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco). The infection of J774 macrophages by *P. aeruginosa* was carried out essentially as described previously [25]. Mid-log phase *P. aeruginosa* grown in LB broth was centrifuged and resuspended in PBS to infect J774 macrophages (5×10^5 cells/well) at an MOI of 10. After centrifugation of the 24-well culture plate for 5 min for synchronization of infection, bacterial phagocytosis was allowed for 25 min. Cells were washed three times with sterile PBS and fresh DMEM medium supplemented with 400 μg/ml gentamicin was added and retained throughout the infection.

Infection of human primary macrophages

Purified monocytes isolated as described from blood of healthy donors were frozen in liquid nitrogen [60,61]. Cells were thawed for experiment and seeded onto 24-well plates at a density of $7x10^5$ per well in complete culture medium (RPMI containing 10% FCS) and differentiated into macrophages with rh-M-CSF (10 ng/ml) (purchased from Al-Immuno tools) for 7 days. HMDMs were infected with exponentially growing *P. aeruginosa* cultures (OD_{600} = 0.8) at an MOI of 10, as described above.

Live microscopy

J774 macrophages were seeded in ibidi μ-slide (8 wells) in DMEM medium supplemented with 10% FBS and infected with *P. aeruginosa* PAO1 expressing GFP as described in the

previous section. Imaging started after 30 min of phagocytosis, when the media was changed to DMEM supplemented with 400 μg/ml gentamicin until 3 hrs post phagocytosis. Cells were imaged using an inverted epifluorescence microscope (AxioObserver, Zeiss), equipped with an incubation chamber set-up at 37˚C and 5% CO_2 and a CoolSNAP HQ2 CCD camera (Photometrics). Time-lapse experiments were performed, by automatic acquisition of random fields using a 63X Apochromat objective (NA 1.4). The frequency of acquisition is indicated in figure legends. Image treatment and analysis were performed using Zen software (Zeiss).

Transmission electron microscopy

Macrophages were seeded on glass coverslips and infected as described above. Infected cells were fixed for 4 hrs at room temperature with 2.5% gluteraldehyde in cacodylate buffer 0.1 M pH 7.4 with 5mM $CaCl_2$, washed with cacodylate buffer, post-fixed for 1 hr in 1% osmium tetroxide and 1.5% potassium ferricyanide in cacodylate buffer, washed with distilled water, followed by overnight incubation in 2% uranyl acetate, prepared in water. Dehydration was performed through acetonitrile series and samples were impregnated in epon 118: acetonitrile 50:50, followed by two times for 1 hr in 100% epon. After overnight polymerization at 60˚C, coverslips were detached by thermal shock with liquid nitrogen. Polymerization was then prolonged for 48 hrs at 60˚C. Ultrathin sections of 70 nm were cut with a Leica UC7 ultramicrotome (Leica microsystems), counterstained with lead citrate and observed in a Jeol 1200 EXII transmission electron microscope. All chemicals were from Electron Microscopy Sciences (USA) and solvents were from Sigma. Images were processed using Fiji software.

Colocalization of *P. aeruginosa* with acidic compartments

Macrophages were infected with GFP labelled *P. aeruginosa* as described above. After 2.5 hrs of gentamicin treatment, infected J774 cells were washed twice with PBS and incubated with 50 nM Lysotracker red DND-99 (Molecular Probes) in DMEM for 10 min to stain lysosomes. Cells were then washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS and mounted on glass slides in Vectashield (Vector Laboratories, Inc) with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to stain the nucleus. The slides were examined using an upright fluorescence microscope (Axioimager Z2, Zeiss) equipped with an Apotome 1 for optical sectioning. A 63X Apochromat Objective (NA 1.4) was used, transmitted light was acquired using differential interference contrast (DIC), Fluorescein isothiocyanate (FITC) filter was used to visualize GFP expressing bacteria and Lysotracker red fluorescence was acquired using a texas red filter set.

Phalloidin labeling

J774 macrophages were seeded on glass coverslips and infected with GFP expressing bacteria as described in the previous sections. For cytochalasin treatment, DMEM containing 2 μM cytochalasin D (Sigma) was added to the macrophages 1 hour before infection and maintained during phagocytosis. After phagocytosis, the cells were maintained in 1 μM cytochalasin D till the end of the experiment. For untreated control, 0.2% DMSO (solvent control) in DMEM was added to the cells before and during phagocytosis. After phagocytosis, cells were maintained in 0.1% DMSO. After fixation with 4% paraformaldehyde (EMS, USA) in PBS for 5 min, cells were washed once with PBS and permeabilized by adding 0.1% triton X-100 for 1 min 30 sec. Cells were then washed once with PBS and incubated with 1 μg/ml Tetramethylrhodamine B isothiocyanate (TRITC)-labeled phalloidin (Sigma-Aldrich) in PBS for 30 min in dark. Cells were washed twice with PBS and coverslips were mounted on glass slides in Vectashield with DAPI (Vector Laboratories, Inc). The slides were examined using an upright

fluorescence microscope (Axioimager Z1, Zeiss) equipped with an Apotome 1 for optical sectioning. A 63X Apochromat Objective (NA 1.4) was used and transmitted light was acquired using DIC. FITC and texas red filters were used to visualize GFP expressing bacteria and phalloidin respectively. Cell nuclei were visulalized using DAPI filter. Images were processed using ZEN software (Zeiss). Cells were counted manually, where infected cells lacking the phalloidin stain were considered as lysed. Percentage of such lysed cells with intracellular bacteria out of total number of infected cells was calculated and plotted for each strain.

Strains containing pSBC6 plasmid (expressing *exsA* under the control of *tac* promoter) were grown before infection in LB or in LB supplemented with 0.01 mM IPTG. Because these strains did not harbor GFP producing plasmid, the number of total cells without phalloidin label was counted and percentage out of total number of cells was plotted. The percent of lysed cells for wild-type strain was similar to that found with GFP positive PAO1 strain.

LDH cytotoxicity assay

The cytotoxicity was assessed by release of LDH from infected J774 macrophages infected, using the Pierce LDH cytotoxicity assay kit (Thermo Scientific). Macrophages were infected for 2 hrs at an MOI of 10 as described above, except that cells were seeded in a 96 well plate and extracellular bacteria were not removed. The assay was performed on 50 μl of the culture supernatant according to manufacturer's instructions. LDH release was obtained by subtracting the 680 nm absorbance value from 490 nm absorbance. The percentage of LDH release was first normalized to that of the uninfected control and then calculated relatively to that of uninfected cells lysed with Triton X-100, which was set at 100% LDH release.

Trypan Blue exclusion test of cell viability

The membrane impermeable dye Trypan Blue was used to quantify cell viability after phagocytosis or after 2 hrs of gentamicin treatment following phagocytosis. Trypan Blue stain (0.4%) was added in 1:1 ratio with PBS for 3 min at room temperature, replaced by PBS and the cells were imaged using an optical microscope in bright field mode. Dead cells appear blue as they take up the stain, in contrast to healthy cells that appear transparent because of the exclusion of the dye. Cells were counted and the percentage of dead cells out of total cells (blue + colorless) was calculated.

RNA extraction and quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

For bacterial RNA extraction from infected J774, $6.5x10^6$ macrophages were seeded into a 100 cm^2 tissue culture dish and infected at an MOI of 10 as described above. 1 hour after phagocytosis, cells were washed three times with PBS, lysed with 0.1% Triton X100 and pelleted by centrifugation at 13000 rpm for 10 min at 15˚C. Bacteria were resuspended in 500 μl PBS and the non resuspended cellular debris was discarded. 900 μl of RNA protect reagent (Qiagen) was added and incubated for 5 min. The sample was centrifuged at 13000 rpm for 10 min. Bacteria in the pellet were lysed with lysozyme and RNA was prepared with RNeasy kit (Qiagen). Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) was used for reverse transcription. Controls without reverse transcriptase were done on each RNA sample to rule out possible DNA contamination. Quantitative real-time PCR (q-RT-PCR) was performed using a Light Cycler 480 SYBR Green I Master mix in a 480 Light Cycler instrument (Roche). PCR conditions were as follows: 3 min denaturation at 98˚C, 45 cycles of 98˚C for 5 sec, 60˚C for 10 sec and 72˚C for 10 sec. The sequences of primers used for RT-PCR are listed in S1 Table.

Cyclic di-GMP reporter assay

The strains were transformed by electroporation with the plasmid pCdrA::*gfp* [34,38], which expresses GFP under the control of the promoter of *cdrA*, a c-di-GMP responsive gene, and carries a gentamicin resistance gene. Overnight cultures, grown in LB with 100 μg/ml gentamicin, were subcultured in LB. These cultures were used to infect J774 cells seeded in a 96 well plate (Greiner, Flat-Bottom), containing 10^5 cells per well with an MOI of 20 after normalizing the inoculum to their OD_{600}. After phagocytosis, DMEM containing 300 μg/ml of amikacin, instead of gentamicin, was added to eliminate extracellular bacteria, as these strains are resistant to gentamicin. At the required time point, Tecan fluorimeter (Spark 20M) was used to measure fluorescence (excitation, 485 nm and emission, 520 nm) of cells at the Z point where emission peak could be obtained in comparison to the blank. Fluorescence was plotted for each strain in terms of arbitrary units (AU). CdrA activity of all strains was also measured in liquid cultures under changing concentrations of magnesium. All strains, grown overnight in LB, were diluted in LB and grown until OD_{600} of 0.6, washed in NCE medium without magnesium and resuspended in NCE medium containing 1 mM, 10 μM or no magnesium for 1 hour in 96 well plate (Greiner, Flat-Bottom). Their fluorescence (excitation, 485 nm and emission, 520 nm) and OD_{600nm} were measured. Fluorescence (AU_{520nm}) was normalized to OD_{600nm} and plotted for each strain.

CCF4 fluorometric assay to monitor the escape of *P. aeruginosa* in host cytosol

The vacuole escape assay was adapted from the CCF4 FRET assay [43] using the CCF4-AM LiveBlazer Loading Kit (Invitrogen) and an image-based quantification [62]. Briefly, J774 macrophages were seeded in 96 well plate (Greiner, Flat-Bottom), containing $5x10^4$ cells per well. Overnight bacterial cultures were subcultured in LB with 50 μg/ml of ampicillin to enhance the expression of beta-lactamase, present naturally in *P. aeruginosa*. Infection was carried out as mentioned in the previous sections at the MOI of 10. After phagocytosis, the cells were washed thrice with PBS to remove extracellular bacteria. 100 μl of HBSS buffer containing 3 mM probenecid and gentamicin (400 μg/ml), was added in each well. The substrate solution was prepared by mixing 6 μl of CCF4-AM (solution A), 60 μl of solution B and 934 μl of solution C. 20 μl of the substrate solution was added to each well and the plate was incubated in dark at 37˚C with 5% CO_2. After 2 hrs, the cells were imaged as described in the Live Imaging section, using a 10X objective. FITC and DAPI channels were used to visualize CCF4-FRET (Green) and loss of FRET (Blue) respectively. Each sample was taken in triplicate and image acquisition was performed by automated random acquisition. Images were analyzed by Cell Profiler software to calculate the number of blue and green cells. The threshold for detection of blue signal by the software was normalized to uninfected control i.e. no blue cells could be detected in the uninfected control. The percentage of blue cells, representing the cells with cytosolic bacteria, out of total green cells was plotted. All strains were tested for their ability to cleave CCF4 *in vitro*, before carrying out the vacuole rupture assay. Overnight cultures grown in LB were subcultured at the ratio of 1:20 in LB with 100 μg/ml of ampicillin. After 2 hours of growth, the cultures were centrifuged and resuspended in PBS. 100 μl of this was aliquoted in 96 well plate (Greiner, Flat-Bottom) and 20 μl of CCF4 substrate solution (A+B +C) was added. Tecan fluorimeter (Spark 20M) was used to measure fluorescence (excitation, 405 nm and emission, 450 nm) using PBS as blank. Blue fluorescence (AU_{450nm}) was observed for all strains and none of the mutants exhibited significantly lower value than the wild-type strain.

Ethics statement

Monocytes were issued from blood of anonymous donors obtained from the French blood bank (Etablissement Français du Sang, approval EFS-OCPM n˚ 21PLER2018-0057).

Supporting information

S1 Fig. Live imaging of macrophages infected with *P. aeruginosa*. J774 macrophages were infected with PAO1 wild-type strain expressing GFP. Time lapse imaging was started at 1.5 hrs post-phagocytosis. Cells were maintained in DMEM supplemented with gentamicin, at 37˚C and 5% CO_2 throughout imaging. White arrows point at infected cells that undergo lysis, whereas black arrows indicate uninfected cells that do not lyse. Images were taken between 1.5 hrs and 3 hrs post-phagocytosis as shown on the panels. Scale bar is equivalent to 10 μm.
(PDF)

S2 Fig. Live imaging of primary human macrophages infected with *P. aeruginosa*. HMDMs were infected with PAO1 wild-type (WT) strain expressing GFP. Time lapse imaging was started at 1.5 hrs post-phagocytosis. Cells were maintained in RPMI supplemented with gentamicin at 37˚C and 5% CO_2 throughout imaging. White arrows point at the cells that harbor intracellular bacteria and undergo lysis between 1.5 hrs and 3 hrs post-phagocytosis. Black arrow shows an uninfected and unlysed cell. Scale bar is equivalent to 20 μm.
(PDF)

S3 Fig. Colocalization of *P. aeruginosa* with a probe that labels acidic compartments. J774 macrophages were infected with PAO1 expressing GFP. After 2.5 hrs of gentamicin treatment, infected J774 cells were incubated with Lysotracker for 10 min, a red fluorescent weak base that accumulates in acidic compartments. Cells were then fixed and imaged with fluorescence microscope. (A) The image shows individual panels for Differential Interference Contrast (DIC), lysosomal compartment (red), bacteria expressing GFP (green), the nucleus (blue) and merged image of all channels. The solid arrow shows colocalization of bacteria with lysotracker and dashed arrow shows non-colocalization. Scale bar is equivalent to 5 μm. (B) 3D-reconstructed image of the same area of (A).
(PDF)

S4 Fig. Visualization (A) and quantification (B) of lysed infected cells upon cytochalasin D treatment. GFP expressing PAO1 was used for infecting J774 macrophages. DMEM containing 2 μM cytochalasin D was added to the macrophages 1 hour before infection and maintained during phagocytosis. After phagocytosis, cells were maintained in 1 μM cytochalasin D in DMEM supplemented with gentamicin till the end of the experiment. 0.2% DMSO in DMEM was added to the cells as solvent control before and during phagocytosis. After phagocytosis, cells were maintained in 0.1% DMSO in DMEM with gentamicin, fixed 2 hrs post-phagocytosis, stained with phalloidin and imaged with fluorescent microscope. DAPI was used to stain the nucleus. Cells that have intracellular bacteria, but lack the phalloidin cortical label, were considered as lysed by intracellular bacteria (shown by arrows). Scale bar is equivalent to 10 μm. Percentage of lysed cells with intracellular bacteria out of total number of cells was plotted. Error bars correspond to standard errors from two independent experiments. At least 200 cells were counted per strain. The asterisks indicate *P* values (Student's t-test, $^{**}P < 0.01$), showing statistical significance with respect to DMSO control.
(PDF)

S5 Fig. Quantification of dying cells infected with *P. aeruginosa* strains overexpressing *exsA*. PAO1 WT, Δ*oprF*, PAO1 WT + p*exsA* and Δ*oprF* + p*exsA* strains were used for infecting J774 macrophages. Expression of *exsA* was induced by adding 0.01 mM IPTG for the strains PAO1 WT + p*exsA* and Δ*oprF* + p*exsA*. Gentamicin was added after phagocytosis and cells were fixed at 2 hrs post-phagocytosis, stained with phalloidin and imaged with fluorescent microscope. DAPI was used to stain the nucleus. Cells that lacked the phalloidin cortical label

were considered as lysed by intracellular bacteria. After imaging, percentage of lysed cells out of total number of cells was plotted for each strain. Error bars correspond to standard errors from at least three independent experiments. At least 200 cells were counted per strain. The asterisks indicate *P* values (One way ANOVA, where all strains were compared to each other using Bonferroni's multiple comparison post-test, $^{**}P < 0.01$ and ns = $P > 0.05$), showing statistical significance with respect to WT.
(PDF)

S6 Fig. Quantification of cell lysis driven by extracellular bacteria. Release of LDH was measured from J774 macrophages infected for 2 hrs with PAO1 WT, Δ*pscN*, Δ*exoS* and Δ*exoSTY* strains to quantify the cytotoxicity. The percentage of LDH release was calculated relatively to that of total uninfected cells lysed with Triton X-100, which was set at 100% LDH release. Error bars correspond to standard errors (SE) from at least four independent experiments. The asterisks indicate *P* values (One way ANOVA, where all strains were compared to WT using Dunnett's multiple comparison post-test, $^{**}P < 0.01$), showing statistical significance with respect to WT.
(PDF)

S7 Fig. Quantification of lysed cells by staining with Trypan Blue. J774 macrophages were infected with the strains as indicated. After phagocytosis, cells were maintained in DMEM supplemented with gentamicin. Cells were stained with trypan blue at (A) 30 min or (B) 2 hrs post-phagocytosis and imaged. Lysed cells were quantified by counting cells stained with trypan blue and the percentage of lysed cells out of total number of cells was plotted. Error bars correspond to standard errors from at least three independent experiments. At least 400 cells were counted per strain. The asterisks indicate *P* values (One way ANOVA, where all strains were compared to WT using Dunnett's multiple comparison test, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$), showing statistical significance with respect to WT.
(PDF)

S8 Fig. Assessment of β-lactamase activity in liquid culture. PAO1 WT, Δ*mgtC*, Δ*oprF*, Δ*pscN*, Δ*exoS* and Δ*exoSTY* strains grown in presence of ampicillin, were incubated with CCF4-AM for 1 hour. The blue fluorescence generated as a result of loss of FRET of CCF4 was measured (excitation, 420 nm and emission, 450 nm) and plotted as arbitrary units (AU). Error bars correspond to standard errors from four independent experiments. All strains were compared to WT using One way ANOVA, Dunnett's multiple comparison post-test. No significant difference was found between the mutant strains and WT.
(PDF)

S9 Fig. Phagosome escape assay of T3SS mutants. J774 macrophages were infected with PAO1 WT, Δ*pscN*, Δ*exoS* and Δ*exoSTY* strains. After phagocytosis, cells were stained with CCF4-AM in presence of gentamicin. 2 hrs post-phagocytosis, the cells were imaged with 10X objective using FITC and DAPI channels. Upon escape of bacteria from phagosome to the cytosol, the CCF4-AM FRET is lost, producing blue color. Images were analyzed and quantified by Cell Profiler software to calculate the percentage of blue cells out of total green cells. At least 200 cells were counted per strain. Error bars correspond to standard errors from four independent experiments. The asterisks indicate *P* values (One way ANOVA, where all strains were compared to WT using Dunnett's multiple comparison post-test, $^{*}P < 0.05$), showing statistical significance with respect to WT.
(PDF)

S10 Fig. Comparison of secreted protein profiles and ExoS production under T3SS-inducing conditions in two PAO1 strains. Immunodetection of the ExoS effector in culture

supernatant of PAO1 and PAO1 H103 (isogenic WT strain for *oprF* mutant) grown in exponential phase at 37˚C under T3SS-inducing (– Ca^{2+}) or non-inducing (+ Ca^{2+}) conditions. The bacterial culture supernatant (equivalent of 1 OD_{600} unit) was loaded on an SDS gel containing 10% polyacrylamide. As control, cellular fraction (equivalent of 0.1 OD_{600} unit) was loaded. Upper panels show Western blot using anti-ExoS antibodies (Soscia et al., 2007; doi: 10.1128/JB.01677-06) and lower panels show Coomassie stained gels.
(PDF)

S1 Movie. Live microscopy movie imaging cell lysis in real time. J774 macrophages were infected with PAO1 WT strain expressing GFP. Cells were maintained in DMEM supplemented with gentamicin, at 37˚C and 5% CO_2 throughout imaging. Imaging was started at 3 hrs post-phagocytosis and continued for 10 min with interval of 30 sec between frames. The time frame is displayed in the movie in the format of minutes:seconds:milli seconds. The movie shows quick lysis of macrophages harboring intracellular bacteria occurring within a minute.
(MOV)

S1 Table. List of primers used for RT-PCR.
(PDF)

Acknowledgments

We thank Sylvie Chevalier (Rouen), Ina Attrée and Sylvie Elsen (Grenoble) for providing strains and plasmids, the Montpellier RIO Imaging microscopy platform for photonic Microscopy and the Electron Microscopy facility of the University of Montpellier (MEA) for sample preparation and transmission electron microscopy. We thank Bérengère Ize and Laila Gannoun-Zaki for critical reading of the manuscript, Matteo Bonazzi and Fernande Siadous for their expertise with the CCF4 assay, Chantal Soscia for testing ExoS secretion.

Author Contributions

Conceptualization: Preeti Garai, Laurence Berry, Anne-Béatrice Blanc-Potard.

Data curation: Preeti Garai.

Formal analysis: Preeti Garai, Malika Moussouni.

Funding acquisition: Anne-Béatrice Blanc-Potard.

Investigation: Preeti Garai, Laurence Berry, Malika Moussouni, Anne-Béatrice Blanc-Potard.

Methodology: Preeti Garai, Laurence Berry, Anne-Béatrice Blanc-Potard.

Project administration: Anne-Béatrice Blanc-Potard.

Resources: Sophie Bleves, Anne-Béatrice Blanc-Potard.

Supervision: Anne-Béatrice Blanc-Potard.

Validation: Preeti Garai, Anne-Béatrice Blanc-Potard.

Visualization: Preeti Garai, Malika Moussouni.

Writing – original draft: Preeti Garai, Anne-Béatrice Blanc-Potard.

Writing – review & editing: Preeti Garai, Laurence Berry, Malika Moussouni, Sophie Bleves, Anne-Béatrice Blanc-Potard.

References

1. Silva MT (2012) Classical labeling of bacterial pathogens according to their lifestyle in the host: inconsistencies and alternatives. Front Microbiol 3: 71. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00071 PMID: 22393329
2. Pujol C, Bliska JB (2005) Turning Yersinia pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. Clin Immunol 114: 216–226. https://doi.org/10.1016/j.clim.2004.07.013 PMID: 15721832
3. Kubica M, Guzik K, Koziel J, Zarebski M, Richter W, et al. (2008) A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of S. aureus phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. PLoS One 3: e1409. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001409 PMID: 18183290
4. Garzoni C, Kelley WL (2009) *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. Trends Microbiol 17: 59–65. https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.005 PMID: 19208480
5. Flannagan RS, Heit B, Heinrichs DE (2016) Intracellular replication of *Staphylococcus aureus* in mature phagolysosomes in macrophages precedes host cell death, and bacterial escape and dissemination. Cell Microbiol 18: 514–535. https://doi.org/10.1111/cmi.12527 PMID: 26408990
6. Jubrail J, Morris P, Bewley MA, Stoneham S, Johnston SA, et al. (2016) Inability to sustain intraphagolysosomal killing of *Staphylococcus aureus* predisposes to bacterial persistence in macrophages. Cell Microbiol 18: 80–96. https://doi.org/10.1111/cmi.12485 PMID: 26248337
7. Ercoli G, Fernandes VE, Chung WY, Wanford JJ, Thomson S, et al. (2018) Intracellular replication of *Streptococcus pneumoniae* inside splenic macrophages serves as a reservoir for septicaemia. Nat Microbiol.
8. Klockgether J, Tummler B (2017) Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen. F1000Res 6: 1261. https://doi.org/10.12688/f1000research.10506.1 PMID: 28794863
9. Engel J, Balachandran P (2009) Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. Curr Opin Microbiol 12: 61–66. https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.12.007 PMID: 19168385
10. Hauser AR (2009) The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. Nat Rev Microbiol 7: 654–665. https://doi.org/10.1038/nrmicro2199 PMID: 19680249
11. Feltman H, Schulert G, Khan S, Jain M, Peterson L, et al. (2001) Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 147: 2659–2669. https://doi.org/10.1099/00221287-147-10-2659 PMID: 11577145
12. Garcia-Medina R, Dunne WM, Singh PK, Brody SL (2005) *Pseudomonas aeruginosa* acquires biofilm-like properties within airway epithelial cells. Infect Immun 73: 8298–8305. https://doi.org/10.1128/IAI.73.12.8298-8305.2005 PMID: 16299327
13. Sana TG, Hachani A, Bucior I, Soscia C, Garvis S, et al. (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 PMID: 22665491
14. Mittal R, Grati M, Gerring R, Blackwelder P, Yan D, et al. (2014) *In vitro* interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with human middle ear epithelial cells. PLoS One 9: e91885. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091885 PMID: 24632826
15. Kazmierczak BI, Jou TS, Mostov K, Engel JN (2001) Rho GTPase activity modulates *Pseudomonas aeruginosa* internalization by epithelial cells. Cell Microbiol 3: 85–98. PMID: 11207623
16. Angus AA, Lee AA, Augustin DK, Lee EJ, Evans DJ, et al. (2008) *Pseudomonas aeruginosa* induces membrane blebs in epithelial cells, which are utilized as a niche for intracellular replication and motility. Infect Immun 76: 1992–2001. https://doi.org/10.1128/IAI.01221-07 PMID: 18316391
17. Kroken AR, Chen CK, Evans DJ, Yahr TL, Fleiszig SMJ (2018) The Impact of ExoS on *Pseudomonas aeruginosa* Internalization by Epithelial Cells Is Independent of fleQ and Correlates with Bistability of Type Three Secretion System Gene Expression. MBio 9.
18. Angus AA, Evans DJ, Barbieri JT, Fleiszig SM (2010) The ADP-ribosylation domain of *Pseudomonas aeruginosa* ExoS is required for membrane bleb niche formation and bacterial survival within epithelial cells. Infect Immun 78: 4500–4510. https://doi.org/10.1128/IAI.00417-10 PMID: 20732998
19. Heimer SR, Evans DJ, Stern ME, Barbieri JT, Yahr T, et al. (2013) *Pseudomonas aeruginosa* utilizes the type III secreted toxin ExoS to avoid acidified compartments within epithelial cells. PLoS One 8: e73111. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073111 PMID: 24058462
20. Lovewell RR, Patankar YR, Berwin B (2014) Mechanisms of phagocytosis and host clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 306: L591–603. https://doi.org/10.1152/ajplung.00335.2013 PMID: 24464809

21. Brannon MK, Davis JM, Mathias JR, Hall CJ, Emerson JC, et al. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* Type III secretion system interacts with phagocytes to modulate systemic infection of zebrafish embryos. Cell Microbiol 11: 755–768. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01288.x PMID: 19207728

22. Kumar SS, Tandberg JI, Penesyan A, Elbourne LDH, Suarez-Bosche N, et al. (2018) Dual Transcriptomics of Host-Pathogen Interaction of Cystic Fibrosis Isolate *Pseudomonas aeruginosa* PASS1 With Zebrafish. Front Cell Infect Microbiol 8: 406. https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00406 PMID: 30524971

23. Schmiedl A, Kerber-Momot T, Munder A, Pabst R, Tschernig T (2010) Bacterial distribution in lung parenchyma early after pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. Cell Tissue Res 342: 67–73. https://doi.org/10.1007/s00441-010-1036-y PMID: 20838814

24. Buyck JM, Tulkens PM, Van Bambeke F (2013) Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activity of antibiotics towards *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in a model of THP-1 human monocytes. Antimicrob Agents Chemother 57: 2310–2318. https://doi.org/10.1128/AAC.02609-12 PMID: 23478951

25. Belon C, Soscia C, Bernut A, Laubier A, Bleves S, et al. (2015) A Macrophage Subversion Factor Is Shared by Intracellular and Extracellular Pathogens. PLoS Pathog 11: e1004969. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004969 PMID: 26080006

26. Mittal R, Lisi CV, Kumari H, Grati M, Blackwelder P, et al. (2016) Otopathogenic *Pseudomonas aeruginosa* Enters and Survives Inside Macrophages. Front Microbiol 7: 1828. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01828 PMID: 27917157

27. Bernut A, Belon C, Soscia C, Bleves S, Blanc-Potard AB (2015) Intracellular phase for an extracellular bacterial pathogen: MgtC shows the way. Microb Cell 2: 353–355. https://doi.org/10.15698/mic2015.09.227 PMID: 28357311

28. Lee EJ, Pontes MH, Groisman EA (2013) A bacterial virulence protein promotes pathogenicity by inhibiting the bacterium's own F1Fo ATP synthase. Cell 154: 146–156. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.004 PMID: 23827679

29. Pontes MH, Lee EJ, Choi J, Groisman EA (2015) *Salmonella* promotes virulence by repressing cellulose production. Proc Natl Acad Sci U S A 112: 5183–5188. https://doi.org/10.1073/pnas.1500989112 PMID: 25848006

30. Alix E, Blanc-Potard AB (2007) MgtC: a key player in intramacrophage survival. Trends Microbiol 15: 252–256. https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.03.007 PMID: 17416526

31. Belon C, Blanc-Potard AB (2016) Intramacrophage Survival for Extracellular Bacterial Pathogens: MgtC As a Key Adaptive Factor. Front Cell Infect Microbiol 6: 52. https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00052 PMID: 27242970

32. Fito-Boncompte L, Chapalain A, Bouffartigues E, Chaker H, Lesouhaitier O, et al. (2011) Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. Infect Immun 79: 1176–1186. https://doi.org/10.1128/IAI.00850-10 PMID: 21189321

33. Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, Maillot O, Lesouhaitier O, et al. (2017) Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. FEMS Microbiol Rev 41: 698–722. https://doi.org/10.1093/femsre/fux020 PMID: 28981745

34. Bouffartigues E, Moscoso JA, Duchesne R, Rosay T, Fito-Boncompte L, et al. (2015) The absence of the *Pseudomonas aeruginosa* OprF protein leads to increased biofilm formation through variation in c-di-GMP level. Front Microbiol 6: 630. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00630 PMID: 26157434

35. Ince D, Sutterwala FS, Yahr TL (2015) Secretion of Flagellar Proteins by the *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion-Injectisome System. J Bacteriol 197: 2003–2011. https://doi.org/10.1128/JB.00030-15 PMID: 25845843

36. Soscia C, Hachani A, Bernadac A, Filloux A, Bleves S (2007) Cross talk between type III secretion and flagellar assembly systems in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 189: 3124–3132. https://doi.org/10.1128/JB.01677-06 PMID: 17307856

37. Moscoso JA, Mikkelsen H, Heeb S, Williams P, Filloux A (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP signalling. Environ Microbiol 13: 3128–3138. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02595.x PMID: 21955777

38. Rybtke MT, Borlee BR, Murakami K, Irie Y, Hentzer M, et al. (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 PMID: 22582064

39. Coburn J, Frank DW (1999) Macrophages and epithelial cells respond differently to the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. Infect Immun 67: 3151–3154. PMID: 10338535

40. Franchi L, Stoolman J, Kanneganti TD, Verma A, Ramphal R, et al. (2007) Critical role for Ipaf in *Pseudomonas aeruginosa*-induced caspase-1 activation. Eur J Immunol 37: 3030–3039. https://doi.org/10.1002/eji.200737532 PMID: 17935074

41. Galle M, Schotte P, Haegman M, Wullaert A, Yang HJ, et al. (2008) The *Pseudomonas aeruginosa* Type III secretion system plays a dual role in the regulation of caspase-1 mediated IL-1beta maturation. J Cell Mol Med 12: 1767–1776. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00190.x PMID: 18081695

42. Huber P, Bouillot S, Elsen S, 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. https://doi.org/10.1007/s00018-013-1451-9 PMID: 23974244

43. Keller C, Mellouk N, Danckaert A, Simeone R, Brosch R, et al. (2013) Single cell measurements of vacuolar rupture caused by intracellular pathogens. J Vis Exp: e50116. https://doi.org/10.3791/50116 PMID: 23792688

44. Tsutsumi Y, Tomita H, Tanimoto K (2013) Identification of novel genes responsible for overexpression of *ampC* in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Antimicrob Agents Chemother 57: 5987–5993. https://doi.org/10.1128/AAC.01291-13 PMID: 24041903

45. Hritonenko V, Evans DJ, Fleiszig SM (2012) Translocon-independent intracellular replication by *Pseudomonas aeruginosa* requires the ADP-ribosylation domain of ExoS. Microbes Infect 14: 1366–1373. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.08.007 PMID: 22981600

46. Landeta C, Boyd D, Beckwith J (2018) Disulfide bond formation in prokaryotes. Nat Microbiol 3: 270–280. https://doi.org/10.1038/s41564-017-0106-2 PMID: 29463925

47. Vareechon C, Zmina SE, Karmakar M, Pearlman E, Rietsch A (2017) *Pseudomonas aeruginosa* Effector ExoS Inhibits ROS Production in Human Neutrophils. Cell Host Microbe 21: 611–618 e615. https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.04.001 PMID: 28494242

48. Hauser AR, Engel JN (1999) *Pseudomonas aeruginosa* induces type-III-secretion-mediated apoptosis of macrophages and epithelial cells. Infect Immun 67: 5530–5537. PMID: 10496945

49. Dacheux D, Toussaint B, Richard M, Brochier G, Croize J, et al. (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. https://doi.org/10.1128/iai.68.5.2916-2924.2000 PMID: 10768989

50. Vance RE, Rietsch A, Mekalanos JJ (2005) Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in vivo. Infect Immun 73: 1706–1713. https://doi.org/10.1128/IAI.73.3.1706-1713.2005 PMID: 15731071

51. Sutterwala FS, Mijares LA, Li L, Ogura Y, Kazmierczak BI, et al. (2007) Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. J Exp Med 204: 3235–3245. https://doi.org/10.1084/jem.20071239 PMID: 18070936

52. Balakrishnan A, Karki R, Berwin B, Yamamoto M, Kanneganti TD (2018) Guanylate binding proteins facilitate caspase-11-dependent pyroptosis in response to type 3 secretion system-negative *Pseudomonas aeruginosa*. Cell Death Discov 5: 3.

53. Kaminski A, Gupta KH, Goldufsky JW, Lee HW, Gupta V, et al. (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 PMID: 30232373

54. Pederson KJ, Vallis AJ, Aktories K, Frank DW, Barbieri JT (1999) The amino-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* ExoS disrupts actin filaments via small-molecular-weight GTP-binding proteins. Mol Microbiol 32: 393–401. PMID: 10231494

55. Wood SJ, Goldufsky JW, Bello D, Masood S, Shafikhani SH (2015) *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 PMID: 26451042

56. Sawa T, Shimizu M, Moriyama K, Wiener-Kronish JP (2014) Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. Crit Care 18: 668. https://doi.org/10.1186/s13054-014-0668-9 PMID: 25672496

57. Munzenmayer L, Geiger T, Daiber E, Schulte B, Autenrieth SE, et al. (2016) Influence of Sae-regulated and Agr-regulated factors on the escape of *Staphylococcus aureus* from human macrophages. Cell Microbiol 18: 1172–1183. https://doi.org/10.1111/cmi.12577 PMID: 26895738

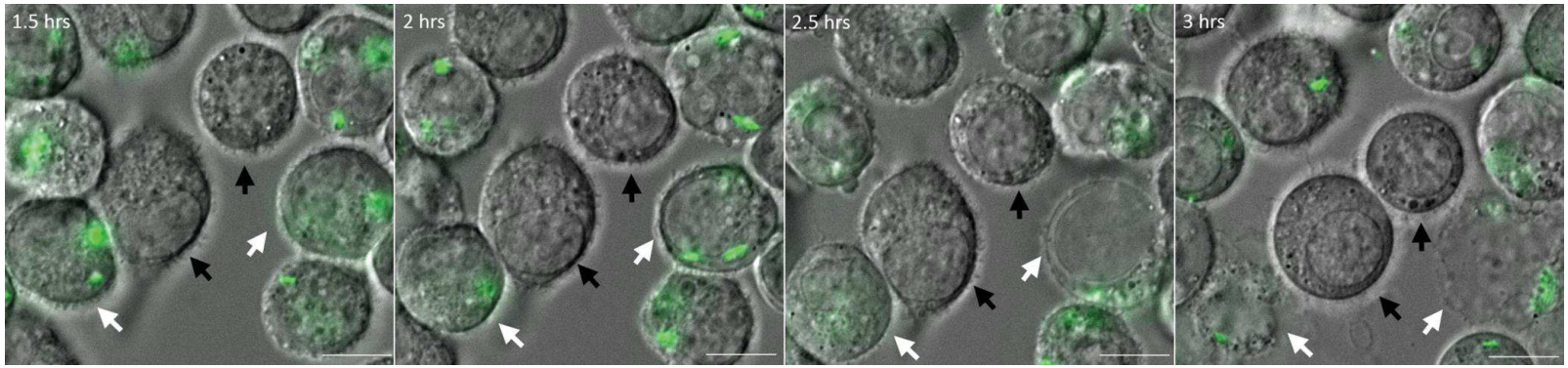
58. Rang C, Alix E, Felix C, Heitz A, Tasse L, et al. (2007) Dual role of the MgtC virulence factor in host and non-host environments. Mol Microbiol 63: 605–622. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05542.x PMID: 17176255

59. Nivens DE, Ohman DE, Williams J, Franklin MJ (2001) Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. J Bacteriol 183: 1047–1057. https://doi.org/10.1128/JB.183.3.1047-1057.2001 PMID: 11208804

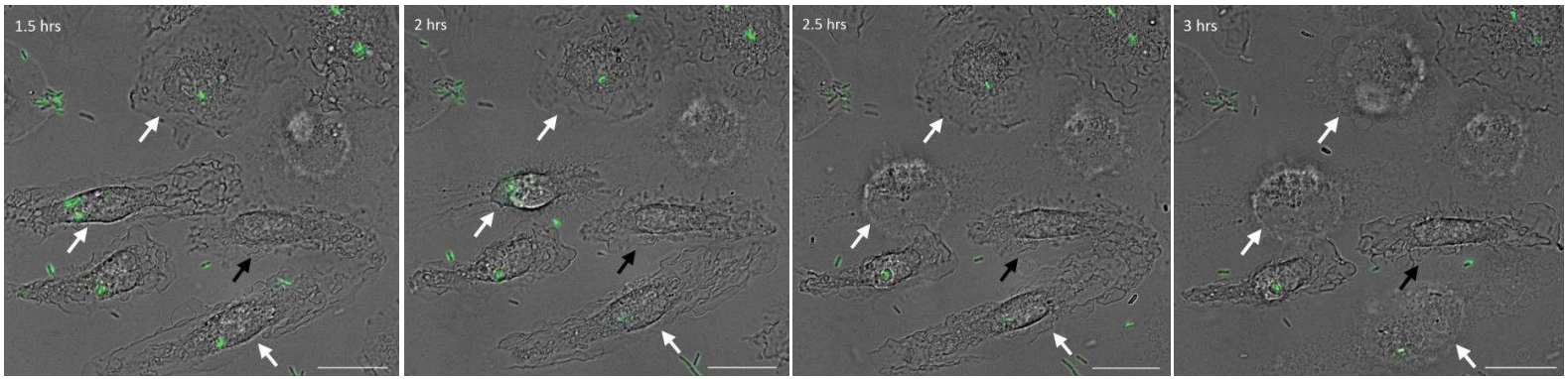
60. Bessoles S, Dudal S, Besra GS, Sanchez F, Lafont V (2009) Human CD4+ invariant NKT cells are involved in antibacterial immunity against *Brucella suis* through CD1d-dependent but CD4-independent mechanisms. Eur J Immunol 39: 1025–1035. https://doi.org/10.1002/eji.200838929 PMID: 19266487

61. Gannoun-Zaki L, Alibaud L, Carrere-Kremer S, Kremer L, Blanc-Potard AB (2013) Overexpression of the KdpF membrane peptide in *Mycobacterium bovis* BCG results in reduced intramacrophage growth and altered cording morphology. PLoS One 8: e60379. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060379 PMID: 23577107

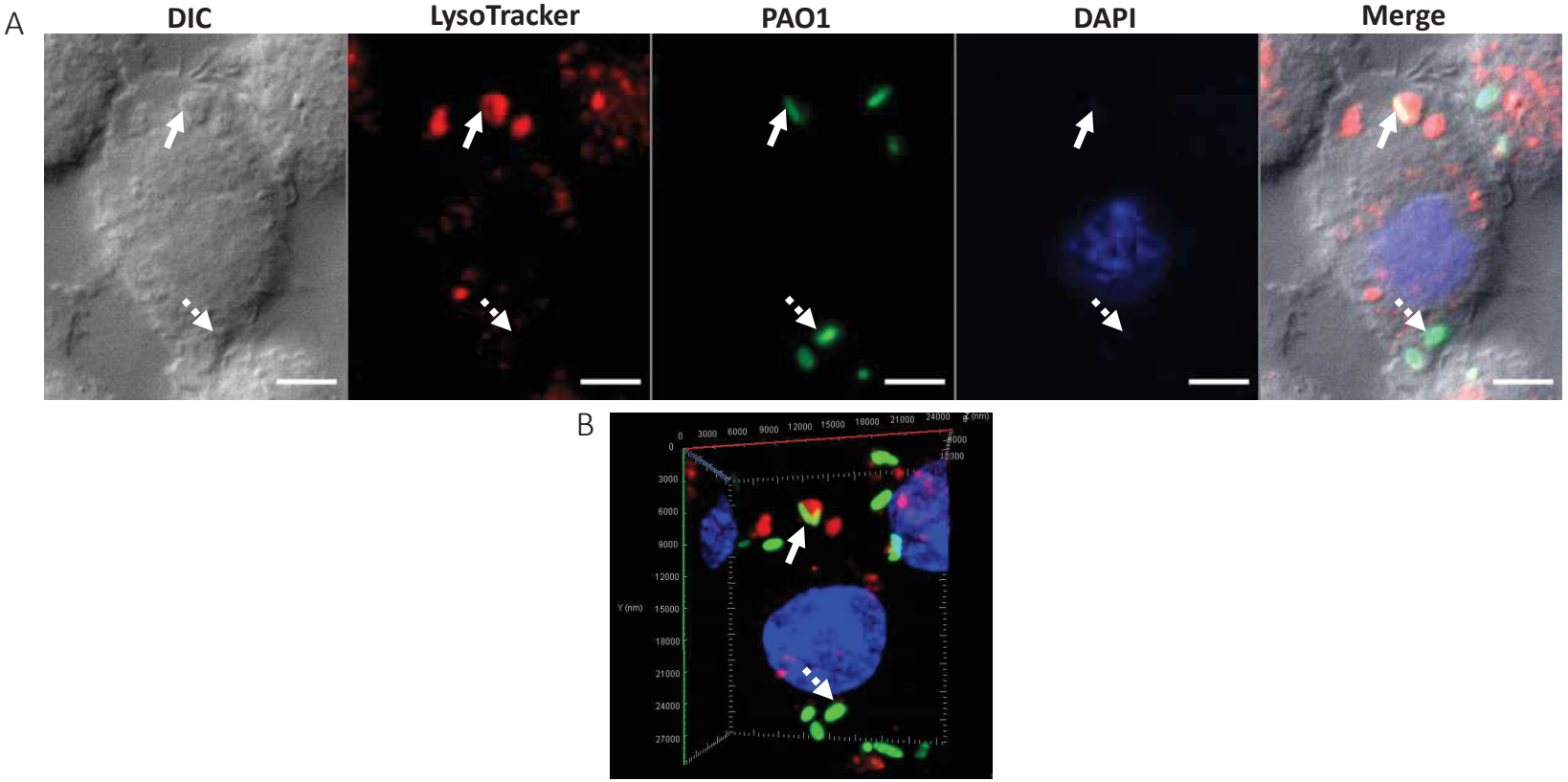
62. Martinez E, Allombert J, Cantet F, Lakhani A, Yandrapalli N, et al. (2016) *Coxiella burnetii* effector CvpB modulates phosphoinositide metabolism for optimal vacuole development. Proc Natl Acad Sci U S A 113: E3260–3269. https://doi.org/10.1073/pnas.1522811113 PMID: 27226300



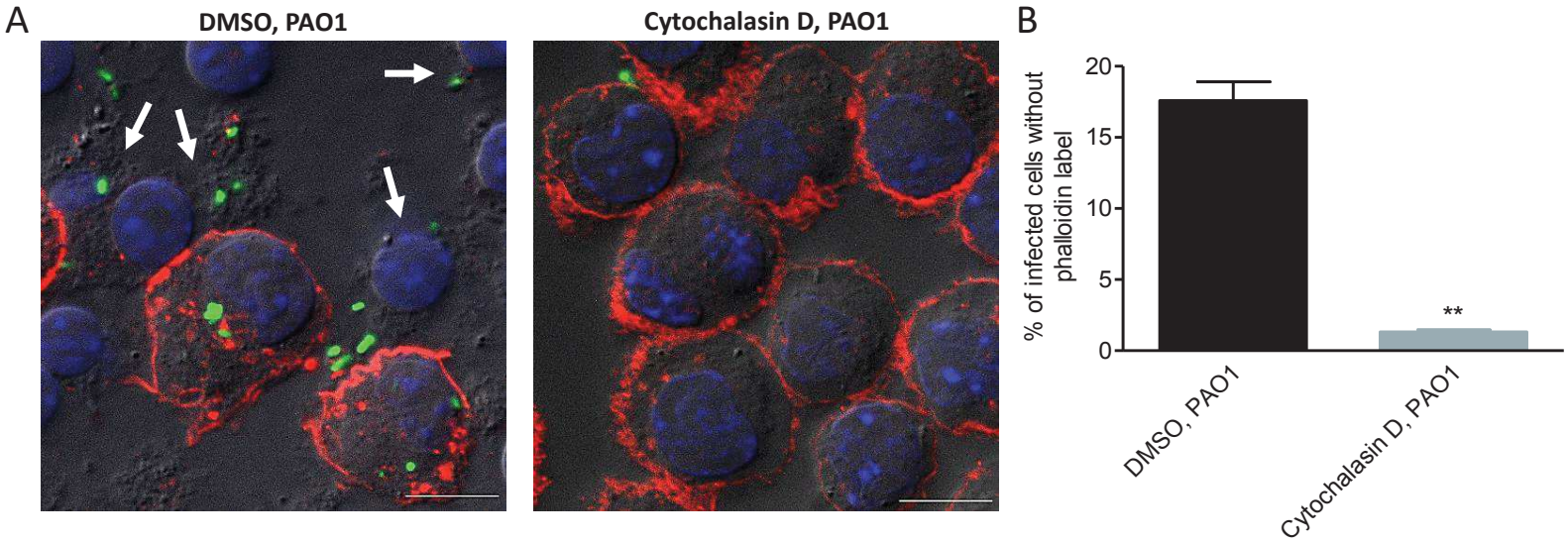
S1 Fig. Live imaging of macrophages infected with *P. aeruginosa*. J774 macrophages were infected with PAO1 wild-type strain expressing GFP. Time lapse imaging was started at 1.5 hrs post-phagocytosis. Cells were maintained in DMEM supplemented with gentamicin, at 37 °C and 5% CO_2 throughout imaging. White arrows point at infected cells that undergo lysis, whereas black arrows indicate uninfected cells that do not lyse. Images were taken between 1.5 hrs and 3 hrs post-phagocytosis as shown on the panels. Scale bar is equivalent to 10 μm.



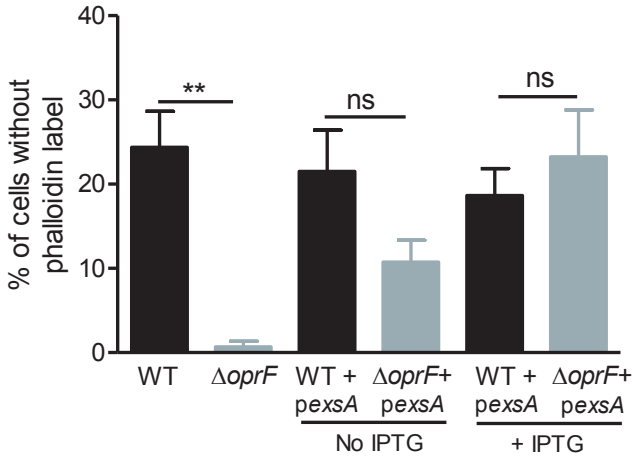
S2 Fig. **Live imaging of primary human macrophages infected with *P. aeruginosa*.** HMDMs were infected with PAO1 wild-type (WT) strain expressing GFP. Time lapse imaging was started at 1.5 hrs post-phagocytosis. Cells were maintained in RPMI supplemented with gentamicin at 37°C and 5% CO_2 throughout imaging. White arrows point at the cells that harbor intracellular bacteria and undergo lysis between 1.5 hrs and 3 hrs post-phagocytosis. Black arrow shows an uninfected and unlysed cell. Scale bar is equivalent to 20 μm.



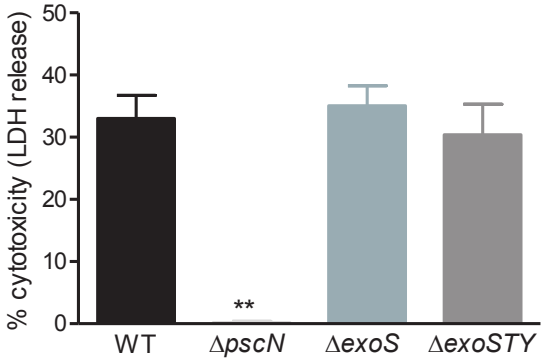
S3 Fig. **Colocalization of *P. aeruginosa* with a probe that labels acidic compartments.** J774 macrophages were infected with PAO1 expressing GFP. After 2.5 hrs of gentamicin treatment, infected J774 cells were incubated with Lysotracker for 10 min, a red fluorescent weak base that accumulates in acidic compartments. Cells were then fixed and imaged with fluorescence microscope. **(A)** The image shows individual panels for Differential Interference Contrast (DIC), lysosomal compartment (red), bacteria expressing GFP (green), the nucleus (blue) and merged image of all channels. The solid arrow shows colocalization of bacteria with lysotracker and dashed arrow shows non-colocalization. Scale bar is equivalent to 5 μm. **(B)** 3D-reconstructed image of the same area of **(A)**.



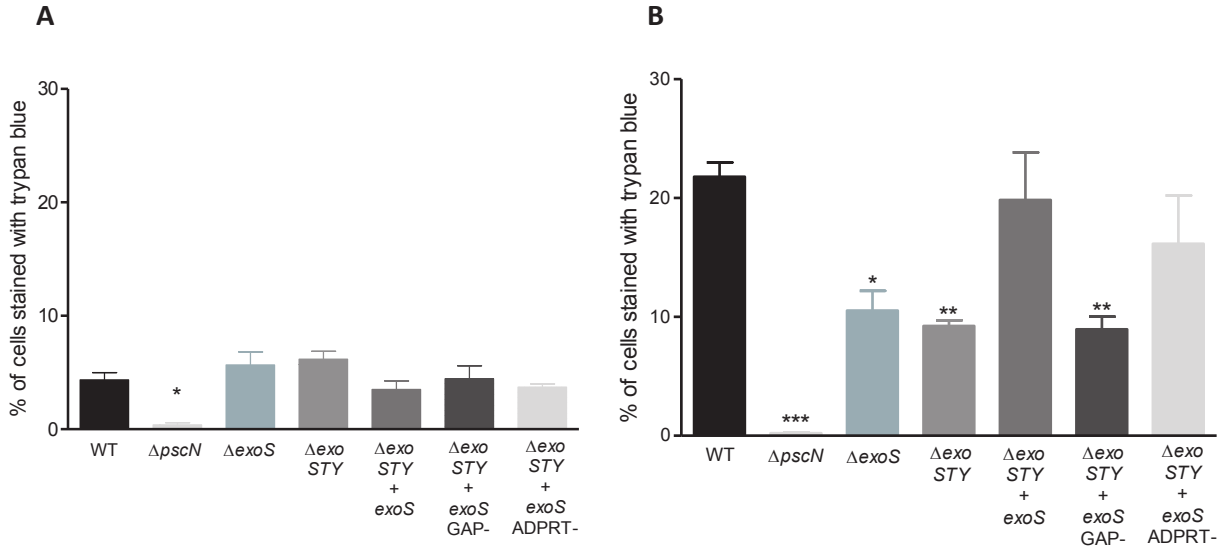
S4 Fig. Visualization (A) and quantification (B) of dying infected cells upon cytochalasin D treatment. GFP expressing PAO1 used for infecting J774 macrophages. DMEM containing 2 μM cytochalasin D was added to the macrophages 1 hour before infection and maintained during phagocytosis. After phagocytosis, cells were maintained in 1 μM cytochalasin D in DMEM supplemented with gentamicin till the end of the experiment. 0.2 % DMSO in DMEM was added to the cells as solvent control before and during phagocytosis. After phagocytosis, cells were maintained in 0.1 % DMSO in DMEM with gentamicin, fixed 2 hrs post-phagocytosis, stained with phalloidin and imaged with fluorescent microscope. DAPI was used to stain the nucleus. Cells that have intracellular bacteria, but lack the phalloidin cortical label, were considered as lysed by intracellular bacteria (shown by arrows). Scale bar is equivalent to 10 μm. Percentage of lysed cells with intracellular bacteria out of total number of cells was plotted. Error bars correspond to standard errors from two independent experiments. At least 200 cells were counted per strain. The asterisks indicate *P* values (Student's t-test, $^{**}P < 0.01$), showing statistical significance with respect to DMSO control.



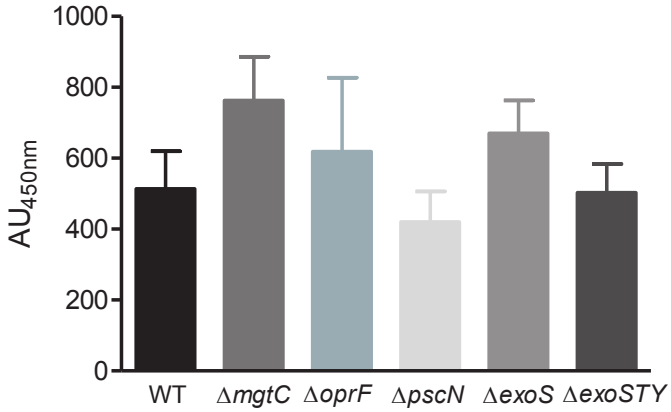
S5 Fig. Q**uantification of dying cells infected with *P. aeruginosa* strains overexpressing *exsA*.** PAO1 WT, Δ*oprF,* PAO1 WT + p*exsA* and Δ*oprF* + p*exsA* strains were used for infecting J774 macrophages. Expression of *exsA* was induced by adding 0.01 mM IPTG for the strains PAO1 WT + p*exsA* and Δ*oprF* + p*exsA*. Gentamicin was added after phagocytosis and cells were fixed at 2 hrs post-phagocytosis, stained with phalloidin and imaged with fluorescent microscope. DAPI was used to stain the nucleus. Cells that lack the phalloidin cortical label were considered as lysed by intracellular bacteria. After imaging, percentage of lysed cells out of total number of cells was plotted for each strain. Error bars correspond to standard errors from at least three independent experiments. At least 200 cells were counted per strain. The asterisks indicate *P* values (One way ANOVA, where all strains were compared to each other using Bonferroni's multiple comparison post-test, ***P* <0.01 and ns = *P* >0.05), showing statistical significance with respect to WT.



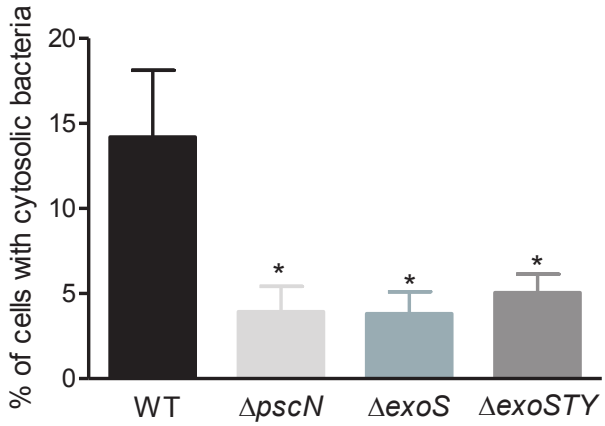
S6 Fig. Quantification of cell lysis driven by extracellular bacteria. Release of LDH was measured from J774 macrophages infected for 2 hrs with PAO1 WT, Δ*pscN*, Δ*exoS* and Δ*exoSTY* mutant strains to quantify the cytotoxicity. The percentage of LDH release was calculated relatively to that of total uninfected cells lysed with Triton X-100, which was set at 100% LDH release. Error bars correspond to standard errors (SE) from at least four independent experiments. The asterisks indicate *P* values (One way ANOVA, where all strains were compared to WT using Dunnet's multiple comparison post-test, ***P* <0.01), showing statistical significance with respect to WT.



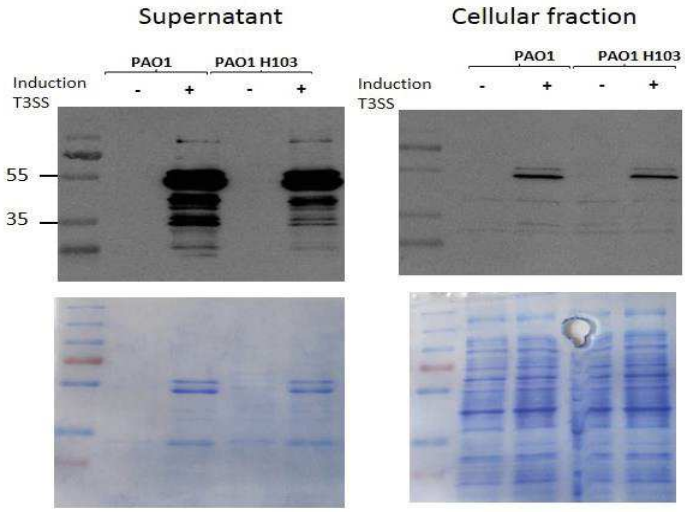
S7 Fig. Quantification of lysed cells by staining with Trypan Blue. J774 macrophages were infected with the strains as indicated. After phagocytosis, cells were maintained in DMEM supplemented with gentamicin. Cells were stained with trypan blue at (A) 30 min or (B) 2 hrs post-phagocytosis and imaged. Lysed cells were quantified by counting cells stained with trypan blue and the percentage of lysed cells out of total number of cells was plotted. Error bars correspond to standard errors from at least three independent experiments. At least 400 cells were counted per strain. The asterisks indicate *P* values (One way ANOVA, where all strains were compared to WT using Dunnet's multiple comparison test, **P* <0.05, ***P* <0.01 and ****P* <0.001), showing statistical significance with respect to WT.



S8 Fig. Assessment of β-lactamase activity of *P. aeruginosa* strains in liquid culture. PAO1 WT, Δ*mgtC*, Δ*oprF*, Δ*pscN*, Δ*exoS* and Δ*exoSTY* strains grown in presence of ampicillin, were incubated with CCF4-AM for 1 hour. The blue fluorescence generated as a result of loss of FRET of CCF4 was measured (excitation, 420 nm and emission, 450 nm) and plotted as arbitrary units (AU). Error bars correspond to standard errors from four independent experiments. All strains were compared to WT using One way ANOVA, Dunnet's multiple comparison post-test. No significant difference was found between the mutant strains and WT.



S9 Fig. Phagosome escape assay of T3SS mutants. J774 macrophages were infected with PAO1 WT, Δ*pscN*, Δ*exoS* and Δ*exoSTY* strains. After phagocytosis, cells were stained with CCF4-AM in presence of gentamicin. 2 hours post-phagocytosis, the cells were imaged with 10X objective using FITC and DAPI channels. Upon escape of bacteria from phagosome to the cytosol, the CCF4-AM FRET is lost, producing blue color. Images were analyzed and quantified by Cell Profiler software to calculate the percentage of blue cells out of total number of green cells. At least 200 cells were counted per strain. Error bars correspond to standard errors from four independent experiments. The asterisks indicate *P* values (One way ANOVA, where all strains were compared to WT using Dunnet's multiple comparison post-test , **P* <0.05), showing statistical significance with respect to WT.



S10 Fig. Comparison of secreted protein profiles and ExoS production under T3SS-inducing conditions in two PAO1 strains. Immunodetection of the ExoS effector in culture supernatant of PAO1 (S. Bleves) and PAO1 H103 (isogenic WT strain for *oprF* mutant) grown in exponential phase at 37°C under T3SS-inducing (− Ca^{2+}) or non-inducing (+ Ca^{2+}) conditions. The bacterial culture equivalent of 0.1 or 1 OD_{600} unit was loaded on an SDS gel containing 10% polyacrylamide. As control, cellular fraction (equivalent of 0.1 OD_{600} unit was loaded). Upper panels show Western blot using anti-ExoS antibodies (Soscia et al., 2007; doi: 10.1128/JB.01677-06) and lower panels show Coomassie stained gels.

S1 Table. List of primers used for RT-PCR.

RT primers	**Sequence**
***rpoD*-RT-fwd**	5'-GGGCGAAGAAGGAAATGGTC-3'
***rpoD*-RT-rev**	5'-CAGGTGGCGTAGGTGGAGAA-3'
***exoS*-RT-fwd**	5'-GCCTTGTCGAGTCCCTTCAA-3'
***exoS*-RT-rev**	5'-CTTCGTGGCGATCATGGACT-3'
***pcrV*-RT-fwd**	5'-TGGGTCTGCAGGACATCCTT-3'
***pcrV*-RT-rev**	5'-AACGACTGGAACAAGCCCTAC-3'
***fliC*-RT-fwd**	5'-CCTGCAGAAAGAAGTCGCTG-3'
***fliC*-RT-rev**	5'-GTTGCTGCCGACCTGGTAA-3'

2.2 Rôle d'OprF dans la résistance de *P. aeruginosa* à l'action bactéricide du macrophage au cours de l'infection aiguë

2.2.1 Résumé de l'article 3

Le macrophage est en 1ère ligne de la défense immunitaire innée, et de plus en plus d'évidences indiquent que *P. aeruginosa* peut avoir une phase intracellulaire transitoire qui pourrait être importante dans l'échappement/ dissémination de la bactérie.

La principale porine de la membrane externe de *P. aeruginosa*, OprF, est impliquée dans le stade intramacrophagique de *P. aeruginosa,* et l'étude du mutant *oprF* est un bon moyen pour comprendre l'importance de cette étape durant l'infection. Dans l'étude actuelle, nous avons d'abord montré que le défaut de survie intramacrophagique du mutant *oprF* de *P. aeruginosa* dans les macrophages en culture, est corrélé avec une association élevée des bactéries avec les compartiments cellulaires acides. La virulence du mutant *oprF* a auparavant été testée dans la plante et le ver, et nous évaluons ici son effet dans un modèle vertébré possédant des macrophages fonctionnels.

Nous avons pris avantage des outils accessibles dans l'embryon de poisson-zèbre pour étudier le comportement du mutant *oprF in vivo.* Le mutant *oprF* de *P. aeruginosa* est atténué dans le modèle d'infection aiguë d'embryon de poisson-zèbre, et cette atténuation est dépendante de la présence des macrophages. Le traitement des embryons avec la bafilomycine, un inhibiteur d'acidification, fait augmenter la sensibilité des embryons à l'infection par la souche sauvage et le mutant *oprF,* et supprime partiellement l'atténuation du mutant *oprF, s*uggérant qu'*in vivo* l'augmentation de la sensibilité à l'acidification au niveau du macrophage n'est pas seule responsable de l'atténuation du mutant *oprF.*

La phagocytose par le macrophage des deux souches, sauvage et mutant *oprF*, a été visualisée en temps réel, après injection de *P. aeruginosa.* Le mutant *oprF* semble être plus efficacement éliminé par les macrophages que la souche sauvage. Pris ensemble, ces résultats mettent en avant la contribution des macrophages dans l'élimination de *P. aeruginosa* durant l'infection aiguë et le rôle d'OprF dans la protection de *P. aeruginosa* contre la clairance par les macrophages.

2.2.2 Article 3 – *Pseudomonas aeruginosa* OprF plays a role in resistance to macrophage clearance during acute infection

Pseudomonas aeruginosa OprF plays a role in resistance to macrophage clearance during acute infection

Malika Moussouni[1], Laurence Berry[1], and Anne Blanc-Potard[1*]

[1]Laboratory of Pathogen-Host Interactions, Université de Montpellier, CNRS-UMR5235, Montpellier, France

*Corresponding author:

E-mail: anne.blanc-potard@umontpellier.fr

Abstract

While considered an extracellular pathogen, *Pseudomonas aeruginosa* has been reported to be engulfed by macrophages in cellular and animal models. *P. aeruginosa* fate has been investigated within cultured macrophages, revealing vacuolar escape and macrophage lysis driven by intracellular bacteria. The major outer membrane porin OprF has been shown to be involved in the intramacrophage stage of *P. aeruginosa* and the study of an *oprF* mutant provides a tool to better understand the relevance of this stage. In the present study, we first showed an intramacrophage survival defect of *P. aeruginosa oprF* mutant in cultured macrophages, which is correlated with elevated association of bacteria with acidic compartments. The virulence of *P. aeruginosa oprF* mutant was previously addressed in plants and worms and we now investigated its behavior in zebrafish (*Danio rerio*) embryo, a vertebrate model that harbors functional macrophages and offers powerful tools to address macrophage-pathogen interactions. *P. aeruginosa oprF* mutant is attenuated in zebrafish embryos in a macrophage-dependent manner. Visualization of bacteria and macrophages in real-time after local injection of *P. aeruginosa* indicated that the *oprF* mutant is more efficiently cleared by macrophages than wild-type bacteria. Moreover, treatment of embryos with bafilomycin, an inhibitor of acidification, increased the sensibility of embryos towards both wild-type and *oprF* mutant, and partially suppressed the attenuation of *oprF* mutant. Taken together, our results highlight the contribution of macrophages in the clearance of *P. aeruginosa* during acute infection and suggest that OprF protects *P. aeruginosa* against macrophage clearance, in part by resisting/avoiding acidified phagosomes.

Introduction

The environmental bacterium and opportunistic human pathogen *P. aeruginosa* is responsible for a variety of acute infections and is a major cause of mortality in chronically infected cystic fibrosis (CF) patients. Recent data have emphasized that the extracellular pathogen *P. aeruginosa* can enter host cells *in vivo*, resulting in a phase of intracellular residence, which can be of importance in addition to the typical extracellular infection. The intracellular stage of *P. aeruginosa* within cultured epithelial cells has been fairly studied (1-3) and has been convincingly established by the recent use of advanced imaging methods to track bacteria within epithelial cells (4). More recently, *P. aeruginosa* has been also localized within cultured macrophages during gentamicin protection assays (5-7), and the intramacrophage fate of the bacteria and bacterial factors involved in this step have been investigated (6). MgtC and OprF have been uncovered as bacterial factors involved in the intramacrophage survival of *P. aeruginosa* (6-8). Our work recently established that MgtC and OprF modulates at the transcriptional level expression of T3SS and ExoS, which appear as key players in the intramacrophage life of *P. aeruginosa*, allowing internalized bacteria to escape phagosomes and promote macrophages lysis (9). Consistent with this finding, OprF was shown to modulate the production of PcrV and the secretion of ExoT and ExoS toxins in an ExsA-dependent manner (10, 11).

OprF is a major outer membrane porin that is involved in maintenance of cell structure, outer membrane permeability, environmental sensing, adhesion, biofilm formation and virulence (12, 13). In addition to modulate the secretion of T3SS effectors, OprF can modulate the production of the quorum-sensing-dependent virulence factors pyocyanin, elastase, lectin PA-1L, and exotoxin A (10). Accordingly, in the *oprF* mutant, production of the quorum-sensing signal molecules was reduced or delayed (10, 12). The virulence of *oprF* mutant has

been shown to be drastically reduced in two eukaryote model organisms, the Belgian endive (*Cichorium intylus*) and the nematode *C. elegans*. The virulence defect of the *oprF* mutant strain cannot be attributed to a growth or viability defect (10). However, reduction in the cytotoxicity was observed for the *oprF* mutant on various cultivated mammalian cell lines, including epithelial cells and macrophages (7, 10).

In the present study, we explored the behavior of an *oprF* mutant in relation with intramacrophage survival during *P. aeruginosa* acute infection. We first investigated the behavior of *oprF* mutant strain in cultured macrophages and then moved to an animal model that has functional macrophages, the zebrafish embryo infection model. *P. aeruginosa* has been shown to be phagocytosed by macrophages upon acute infection in zebrafish embryos (14, 15) and this model appears as a vertebrate model of choice to study the role of *P. aeruginosa* macrophage survival factors *in vivo*. Our results highlight the contribution of macrophages in the clearance of *P. aeruginosa* during acute infection and further support the contribution of OprF in escape to macrophage killing.

Results

The intramacrophage survival defect of *P. aeruginosa oprF* mutant is correlated with elevated association of bacteria with acidic compartments

An *oprF* mutant in an otopathogenic *P. aeruginosa* strain was found to be more sensitive to macrophage killing than the wild-type strain upon infection of mouse bone marrow macrophages (7). In a previous study, we have used an *oprF* mutant in the PAO1 background (6, 11) to address the cytotoxicity driven by phagocytosed bacteria (9). Here, we used the same mutant to quantify intracellular bacteria after phagocytosis. J774 macrophages were infected

with wild-type PAO1 and *oprF* mutant strains expressing constitutively GFP grown exponentially in LB medium (Multiplicity of infection or MOI=10). After 25 minutes of phagocytosis, several washes were performed to remove adherent bacteria and gentamicin was added to kill extracellular bacteria. Microscopic observation of infected macrophages was done after 20 minutes or 2.5 hours of gentamicin treatment (Fig. 1A). The number of bacteria per macrophage was quantified and classified in three groups (Fig. 1B). At the latest time, macrophages infected with *oprF* mutant were found to harbor less bacteria than macrophages infected with wild-type strain. This result confirms that OprF plays a role in the survival of *P. aeruginosa* PAO1 inside macrophages.

We further examined intracellular *P. aeruginosa* wild-type and *oprF* mutant within macrophages in more detail using transmission electron microscopy (TEM). J774 macrophages infected with wild-type PAO1 strain or *oprF* mutant were subjected to fixation after phagocytosis. At early time post-infection, wild-type *P. aeruginosa* was present in membrane bound vacuoles inside macrophages, as reported (9) (Fig. 2A, upper panels). For the *oprF* mutant, most bacteria were found in vacuoles partially or totally filled with heterogeneous electron dense material, suggesting that the vacuole has fused with lysosomes (Fig. 2A, lower panels). In the course of TEM analysis of J774 macrophages infected by wild-type PAO1 strain, we noticed the presence of vesicles in the vacuolar space along the phagosomal membrane. These vesicles seemed issued from bacteria and were often lying along the phagosomal membrane (Fig. 2B, upper panels). Because OprF is a major component of outer membrane vesicles (OMVs) (16), we investigated whether such bacterial vesicles were also present in the *oprF* mutant. Vesicles were clearly produced from *oprF* mutant as well and found associated with the phagosomal membrane (Fig. 2B, lower panel).

To quantify the association between bacteria and acidic compartments such as phagolysosomes, we examined the association between fluorescent PAO1 wild-type and *oprF*

mutant bacteria and the LysoTracker probe during infection using fixed macrophages. Bacteria colocalizing with LysoTracker could be visualized (Fig. 3A) and quantified (Fig. 3B). A significantly higher percentage of bacteria colocalizing with LysoTracker red marker was observed in macrophages infected with *oprF* mutant (~75%) comparatively to wild-type strain (~45%). This increased localization of *oprF* mutant in acidified compartments corroborates the TEM observation of localization of Δ*oprF* bacteria in phagolysosomes.

Taken together, this results suggest that the intramacrophage survival defect of *oprF* mutant is associated with higher localization with acidified compartments.

OprF is important for *P. aeruginosa* virulence in the *Danio rerio* infection model in a macrophage-dependent manner

We evaluated the role of OprF in *P. aeruginosa* virulence in the zebrafish (*Danio rerio)* embryo model. This model, which has been used for various intracellular and extracellular bacterial pathogens, is a model of choice to investigate the contribution of cells from the innate immune system during infection (17, 18). Bacteria producing GFP constitutively were injected intravenously in the caudal vein of embryos at 50 hours post-fertilization (Fig. 4A). The survival curves of infected embryos indicate that OprF is a critical virulence determinant in this model as well since the *oprF* mutant is significantly attenuated as compared to the wild-type PAO1 strain (Figure 4B, left graph). In addition, fluorescence microscopy of infected embryos (20 hours post-infection) showed a lower bacterial burden with *oprF* mutant than wild-type strain (Fig. 4C), which can be quantified (Fig. 4D).

To evaluate the contribution of macrophages in the attenuated phenotype of *oprF* mutant, we took advantage on the fact that macrophages can be depleted from zebrafish

embryos with a validated method that uses liposome-encapsulated clodronate (LipoCld) (19, 20). Macrophage-depleted zebrafish embryos have been shown to be highly sensitive to *P. aeruginosa* infection (6, 14). We have carried out experiments with *tg(mfap4:mCherry-F)* embryos where macrophages are visualized as red cells (21), which allows to check macrophage depletion upon LipoCld injection (Fig. 4C). Interestingly, the survival curve of macrophage-depleted embryos shows a dramatic increase in the virulence of *oprF* mutant strain, which kills all embryos as the wild-type strain (Fig. 4B, right graph). Thus, macrophage depletion suppresses mostly the difference between wild-type and mutant strain. In agreement with this findings, bacterial burden was high and not significantly different for both wild-type and mutant strains in the context of macrophage depletion (Fig. 4C and Fig. 4D).

Taken together, these results indicate that macrophages play a crucial role in the attenuation of *oprF* mutant and that OprF may play a role to prevent bactericidal action of macrophages during acute infection.

Visualisation of phagocytosis of wild-type and *oprF* mutant upon infection and contribution of phagosomal acidification on the outcome of infection

Confocal microscopy after local injection into closed cavities, such as hindbrain ventricle (HBV), allows to visualize recruited macrophages and bacteria phagocytosed by macrophages close to the site of injection. Upon HBV infection (Fig. 5A), a large number of bacteria remain extracellular 2 hours after infection but both wild-type and *oprF* mutant bacteria can be visualized within macrophages (Fig. 5B). The *oprF* mutant appeared to be associated with higher bacterial phagocytosis in some cases (Fig. 5B), but a variability is observed between individuals (Fig. S1). To better analyze macrophage recruitment and phagocytosis of bacteria in real-time, a time lapse experiment was performed during 3 hrs on five embryos for each

strain. To facilitate image acquisition, bacteria were injected in the muscle (Fig. 5C). The recruitment of macrophages to phagocyted Δ*oprF* bacteria can be clearly observed, both for clustered bacteria and isolated bacteria (Fig. S2). The clearance of *oprF* mutant by macrophages appeared to be more efficient than the one of wild-type strain (Fig. 5D), which could be related to a higher rate of phagocytized bacteria for *oprF* mutant comparatively to wild-type strain.

Because *oprF* mutant attenuation in zebrafish is dependent on the presence of macrophages and because the *oprF* mutant colocalizes more frequently than wild-type strain with acidic compartments in infected macrophages, we hypothesized that decreasing phagosomal acidification in zebrafish embryos may alleviate the attenuation of *oprF* mutant. The acidification of the phagosome is dependent on the activity of the host vacuolar ATPase, which can be specifically inhibited by the inhibitor bafilomycin A1 (22). Bafilomycin was added to the larvae by balneation as reported earlier (23) to test macrophage-intrinsic phagosomal maturation as a microbicidal effector mechanism in zebrafish larvae. The survival of wild-type strain and *oprF* mutant was significantly reduced in the presence of bafilomycin, supporting the idea that phagosomal acidification is important for host defense (Fig. 6 A-B). We reasoned that if defective lysosomal tolerance contributes to *oprF* mutant attenuation, then bafilomycin should enhance *oprF* mutant growth more than wild-type. This is partially the case, since the virulence of *oprF* mutant is greatly increased in the presence of bafilomycin (Fig 6B). Imaging and quantification of bacterial burden was done in one experiment (Fig. 6C). In this experiment, the number of fluorescent pixels for the *oprF* mutant was clearly increased in the presence of bafilomycin, supporting the finding that acidification contributes to limit the growth of *oprF* mutant in non-treated embryos.

Cumulatively, these results suggest that OprF acts by protecting *P. aeruginosa* against macrophages clearance during acute infection, in part by resisting/avoiding acidified phagosomes.

Discussion

Recent studies support the ability of *P. aeruginosa* to reside, at least transiently, in macrophages and bacterial factors that play a role in the intramacrophage stage, such as OprF, are starting to be identified. However, their role towards macrophage bactericidal action remains mostly elusive. In the present study, we have taken advantage of the zebrafish embryo model and *orpF* mutant to better understand how *P. aeruginosa* resist to macrophage clearance during acute infection.

Using cultured macrophages, we first showed that *oprF* mutant exhibited higher association with acidified compartments, identified as phagolysosomes with TEM, than the wild-type strain. This result was correlated with a lower number of intracellular bacteria 3 hours after infection with the mutant strain. It was previously shown that upon phagocytosis, *P. aeruginosa* PAO1 strain resides in membrane bound vacuoles, whereas a cytosolic location can be observed at later time of infection (7, 9). Moreover, ruptured phagosomal membrane has been visualized previously by TEM in macrophages infected with PAO1 wild-type strain (9). A quantitative phagosomal rupture assay has revealed that *oprF* mutant is less efficient to escape from phagosome than wild-type strain (9). This phenotype of *oprF* mutant was attributed to the negative regulation of T3SS expression inside macrophages, since T3SS and more specifically ExoS were found to play a role *P. aeruginosa* phagosomal escape. Hence, the stronger association of *oprF* mutant with acidified compartments may reflect its lower ability to escape from the phagosome into the cytosol, in relation with the decreased expression of T3SS genes. In addition, in the present study, TEM allowed us to visualize vesicles that are likely of bacterial origin (OMVs) associated with the phagosomal membrane. The intracellular function, if any, of these vesicles is unknown. Vesicles were also clearly produced from *oprF*

mutant as well, which is consistent with the fact that while OprF is abundant in OMVs (16), an *oprF* mutant was shown to produce more OMVs than wild-type in liquid culture (24). Thus, we concluded that such vesicles should not be linked to the phenotype of *oprF* mutant intracellularly, even though we cannot exclude qualitative differences between OMVs from wild-type strain and *oprF* mutant.

We evaluated for the first time the role of OprF in *P. aeruginosa* virulence in a vertebrate model harbouring functional macrophages, the zebrafish embryo model. This model, which has been used for various intracellular and extracellular bacterial pathogens, is a model of choice to investigate the contribution of innate immune cells during infection (17). Moreover, in this model, *P. aeruginosa* bacteria have been visualised within macrophages upon infection (6, 14, 15, 25, 26), suggesting a key role of the intramacrophage step in this infection model. We showed an attenuation of the *oprF* mutant in zebrafish embryos, which is dependent on the presence of macrophages, thus supporting the importance of OprF in resistance to macrophage. Injection of bacteria into closed cavities, such as hindbrain ventricle, provides an outstanding opportunity to visualize macrophage recruitment and bacterial phagocytosis in real-time (27). Our results clearly support the importance of macrophages in *P. aeruginosa* clearance, with a large proportion of bacteria being engulfed by macrophages. The *oprF* mutant appeared to be cleared more efficiently than wild-type strain. This could be related in part to a higher phagocytosis of the mutant strain. An effect of OprF on internalization within innate immune cells has been previously reported, in relation with the ability of OprF to bind the complement component C3b, which tags bacteria for phagocytosis by host macrophages and neutrophils (28). However, in this case, a reduced internalization of *oprF*-deficient bacteria by neutrophils after opsonization was observed compared with wild-type *P. aeruginosa*. Hence, our observation is unlikely linked to the complement system, possibly due to the fact that bacteria are not opsonized. *P. aeruginosa oprF* mutant has also been shown to reduce expression of

T3SS genes and secretion of ExoT and ExoS toxins (6, 11), which have been proposed to have anti-phagocytic function (29). Hence, the increased phagocytosis of *oprF* mutant in zebrafish embryos may be directly linked to the decreased T3SS expression level. Accordingly, a T3SS mutant has also be found to be attenuated in zebrafish embryos and macrophage depletion restored the virulence of the attenuated T3SS strain (14). However, the phagocytosis of this mutant strain was not addressed in the zebrafish model.

In summary, our results suggest that OprF protects *P. aeruginosa* against macrophage clearance, in part by resisting/avoiding acidified phagosomes. This effect could be correlated with the intracellular effect of OprF on expression of T3SS effectors, which have been implicated both in phagocytosis and phagosomal escape. Our results also highlight the contribution of macrophages in the clearance of *P. aeruginosa* during acute infection in the zebrafish embryo model. The role of alveolar macrophages in internalization and early clearance of *P. aeruginosa* in mouse lung remains controversial (30) (31). Testing the behavior of mutants defective for intramacrophage survival, as *oprF* mutant, in mice model may help to clarify the role of alveolar macrophages in bacterial clearance during acute infection.

Material and Methods

Bacterial strains and growth conditions

Bacterial strains and plasmids are described in Table 1. *P. aeruginosa* was grown at 37°C in Luria broth (LB). Plasmid pMF230 expressing GFP constitutively (32) (obtained from Addgene) was introduced in *P. aeruginosa* by conjugation, using an *E. coli* strain containing

pRK2013. Recombinant bacteria were selected on LB agar plates containing carbenicillin (300 µg/ml) and triclosan (15 µg/ml).

Infection of macrophages and visualization and quantification of intracellular bacteria by fluorescent microscopy

J774A.1 cells were maintained at 37°C in 5% CO_2 in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco). The infection of J774 macrophages seeded on glass coverslips by *P. aeruginosa* was carried out as described previously (6). After 2.5 hours of gentamicin treatment, the cells were washed twice with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min. To visualize acidified compartments, macrophages were incubated with 50 nM Lysotracker red DND-99 (Molecular Probes) in DMEM (supplemented with 10% FBS) for 10-15 min before fixation to stain lysosomes exclusively. After fixation, cells were washed twice with PBS and mounted on glass slides in Vectashield with DAPI (Vector Laboratories, Inc). The slides were examined using an upright fluorescence microscope (Axioimager Z2, Zeiss) equipped with an Apotome 1 for optical sectioning. A 63X Apochromat Objective (NA 1.4) was used, transmitted light was acquired using differential interference contrast (DIC), Fluorescein isothiocyanate (FITC) filter was used to visualize GFP expressing bacteria and Lysotracker red fluorescence was acquired using a texas red filter set. Images were processed using ZEN blue software (Zeiss).

Transmission Electron microscopy

Macrophages were seeded on glass coverslips and infected as described above. Infected cells were fixed for 4 hrs at room temperature with 2.5% gluteraldehyde in cacodylate buffer 0.1 M

pH 7.4 with 5mM $CaCl_2$, washed with cacodylate buffer, post-fixed for 1 hr in 1% osmium tetroxide and 1.5 % potassium ferricyanid in cacodylate buffer, washed with distilled water, followed by overnight incubation in 2% uranyl acetate, prepared in water. Dehydration was performed through acetonitrile series and samples were impregnated in epon 118: acetonitrile 50:50, followed by two times for 1 hr in 100% epon. After overnight polymerization at 60°C, coverslips were detached by thermal shock with liquid nitrogen. Polymerization was then prolonged for 48 hrs at 60°C. Ultrathin sections of 70 nm were cut with a Leica UC7 ultramicrotome (Leica microsystems), counterstained with lead citrate and observed in a Jeol 1200 EXII transmission electron microscope. All chemicals were from Electron Microscopy Sciences (USA) and solvents were from Sigma. Images were processed using Fiji software.

Infection of *Danio rerio* embryos

Experiments were performed using the AB zebrafish or the *tg(mfap4:mCherry-F)* zebrafish line harboring red-fluorescent macrophages (21) and maintained under standard conditions (6). Bacterial strains, which were freshly streaked out from glycerol stocks, were grown in LB medium to mid-log phase (DO=0.7), recovered by centrifugation and washed twice in Phosphate-Buffered Saline (PBS). Suspensions were homogenized through a 26-gauge needle and resuspended in PBS at about 10^9 bacteria/ml added with 10% phenol red to aid visualization of the injection process. Infection were carried by the direct microinjection of 2 nl of bacterial suspensions into the caudal vein of 50 hpf embryos, previously dechorionated and anesthetized with 0.02% tricaine. For survival kinetics after infection, the number of dead embryos was determined visually based on the absence of heartbeat. For phagocytosis vizualisation, 1500-2000 CFU were injected locally into the hindbrain vesicle or the muscle of 50 hpf *tg(mfap4:mCherry-F)* larvae.

Depletion of macrophages was carried out upon microinjection of LipoCld or lipoPBS as control into the caudal vein of 24-30 hpf embryos zebrafish (20) and visualized by fluorescence microscopy. To inhibit acidification by host vacuolar ATPase, larvae were treated with Bafilomycin A1 (Interchim) at 50nM in 0.5% DMSO via soaking 30 minutes before infection (23).

Microscopic analysis of zebrafish embryos and quantification of bacterial load by Fluorescent Pixel Counts

For live imaging, anesthetized infected embryos were mounted in 35 mm dishes and immobilized with 1% low-melting point agarose. Direct visualization is performed using an Olympus MVX10 epifluorescent microscope equipped with a digital color camera (Olympus XC50). Fluorescence and bright-field images are acquired and processed with CellSens (Olympus) and assembled using GIMP 2.6 freeware to adjust levels and brightness and to remove out-of-focus background fluorescence.

For phagocytosis observation, immobilized embryos were immersed with fish water containing tricaine for direct visualization using 40× Leica Apo water 0.8 NA objectives. For quantification of bacterial load by Fluorescent Pixel Counts (FPC), fluorescent bacteria were injected in the larvae and imaged using MVX10 Olympus microscope. Fluorescence was quantified by computation using Fiji (ImageJ software) as following: 1/ Background was measured in images of PBS injected larvae and then was subtracted in the fluorescence images, 2/ “make binary” function was run, and 3/ “measure area” function was used to determine the number of fluorescent pixels of the image, with avoiding the auto-fluorescence of the yolk.

Ethics statement

All animal experiments described in the present study were conducted at the University Montpellier 2 according to European Union guidelines for handling of laboratory animals (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm) and were approved by the Direction Sanitaire et Vétérinaire de l'Hérault and Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale under reference CEEA-LR-13007. The breeding of adult fish adhered to the international guidelines specified by the EU Animal Protection Directive 2010/63/EU and adult zebrafish were not sacrificed for this study. All experiments were performed before the embryos free-feeding stage and did not fall under animal experimentation law according to the EU Animal Protection Directive 2010/63/EU. For survival curves, cardiac rhythm was used as a clinical criterium to fix the endpoint at which embryos are euthanized using the anaesthetic Tricaine up to a lethal dose (500 mg/ml). Embryos that survive infection were anaesthetized with Tricaine up to a lethal dose before bleach treatment.

Statistical analysis

Statistical analyses of comparisons between survival curves were performed using the log rank test with Prism 4.0 (Graphpad, Inc). Statistical significance was assumed at P values <0.05. Statistical analyses for *ex vivo* experiments with J774 cells was performed using *t*-test and comparisons between survival curves were performed using the log rank test with Prism 5.01 (GraphPad, Inc.). Quantification experiments were analyzed. In the figures * means P values ≤ 0.05, ** ≤ 0.01, *** ≤ 0.001 and **** ≤ 0.0001.

Acknowledgments

We thank Sylvie Chevalier (Rouen) for providing strains, Tamara Sipka and Mai Nguyen Chi for help with LipoCld experiment. We thank the Montpellier RIO Imaging microscopy platform for photonic Microscopy and the Electron Microscopy facility of the University of Montpellier (MEA) for sample preparation and transmission electron microscopy. This work is supported by Vaincre La Mucoviscidose (RIF20170502042) and Association Gregory Lemarchal. MM is supported by Vaincre La Mucoviscidose (RIF20170502042).

References

1. Mittal R, Grati M, Gerring R, Blackwelder P, Yan D, Li JD, et al. In vitro interaction of Pseudomonas aeruginosa with human middle ear epithelial cells. PloS one. 2014;9(3):e91885. Epub 2014/03/19.

2. Kazmierczak BI, Jou TS, Mostov K, Engel JN. Rho GTPase activity modulates Pseudomonas aeruginosa internalization by epithelial cells. Cellular microbiology. 2001;3(2):85-98. Epub 2001/02/24.

3. Angus AA, Lee AA, Augustin DK, Lee EJ, Evans DJ, Fleiszig SM. Pseudomonas aeruginosa induces membrane blebs in epithelial cells, which are utilized as a niche for intracellular replication and motility. Infection and immunity. 2008;76(5):1992-2001. Epub 2008/03/05.

4. Kroken AR, Chen CK, Evans DJ, Yahr TL, Fleiszig SMJ. The Impact of ExoS on Pseudomonas aeruginosa Internalization by Epithelial Cells Is Independent of fleQ and Correlates with Bistability of Type Three Secretion System Gene Expression. mBio. 2018;9(3). Epub 2018/05/03.

5. Buyck JM, Tulkens PM, Van Bambeke F. Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activity of antibiotics towards Pseudomonas aeruginosa PAO1 in a model of THP-1 human monocytes. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2013;57(5):2310-8. Epub 2013/03/13.

6. Belon C, Soscia C, Bernut A, Laubier A, Bleves S, Blanc-Potard AB. A Macrophage Subversion Factor Is Shared by Intracellular and Extracellular Pathogens. PLoS pathogens. 2015;11(6):e1004969. Epub 2015/06/17.

7. Mittal R, Lisi CV, Kumari H, Grati M, Blackwelder P, Yan D, et al. Otopathogenic Pseudomonas aeruginosa Enters and Survives Inside Macrophages. Frontiers in microbiology. 2016;7:1828. Epub 2016/12/06.

8. Bernut A, Belon C, Soscia C, Bleves S, Blanc-Potard AB. Intracellular phase for an extracellular bacterial pathogen: MgtC shows the way. Microb Cell. 2015;2(9):353-5. Epub 2015/08/13.

9. Garai P, Berry L, Moussouni M, Bleves S, Blanc-Potard AB. Killing from the inside: Intracellular role of T3SS in the fate of Pseudomonas aeruginosa within macrophages revealed by mgtC and oprF mutants. PLoS pathogens. 2019;15(6):e1007812. Epub 2019/06/21.

10. Fito-Boncompte L, Chapalain A, Bouffartigues E, Chaker H, Lesouhaitier O, Gicquel G, et al. Full virulence of Pseudomonas aeruginosa requires OprF. Infection and immunity. 2011;79(3):1176-86. Epub 2010/12/30.

11. Bouffartigues E, Moscoso JA, Duchesne R, Rosay T, Fito-Boncompte L, Gicquel G, et al. The absence of the Pseudomonas aeruginosa OprF protein leads to increased biofilm formation through variation in c-di-GMP level. Frontiers in microbiology. 2015;6:630. Epub 2015/07/15.

12. Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, Maillot O, Lesouhaitier O, Feuilloley MGJ, et al. Structure, function and regulation of Pseudomonas aeruginosa porins. FEMS microbiology reviews. 2017;41(5):698-722. Epub 2017/10/06.

13. Cassin EK, Tseng BS. Pushing beyond the envelope: the potential roles of OprF in Pseudomonas aeruginosa biofilm formation and pathogenicity. Journal of bacteriology. 2019. Epub 2019/04/24.

14. Brannon MK, Davis JM, Mathias JR, Hall CJ, Emerson JC, Crosier PS, et al. Pseudomonas aeruginosa Type III secretion system interacts with phagocytes to modulate systemic infection of zebrafish embryos. Cellular microbiology. 2009;11(5):755-68. Epub 2009/02/12.

15. Kumar SS, Tandberg JI, Penesyan A, Elbourne LDH, Suarez-Bosche N, Don E, et al. Dual Transcriptomics of Host-Pathogen Interaction of Cystic Fibrosis Isolate Pseudomonas aeruginosa PASS1 With Zebrafish. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2018;8:406. Epub 2018/12/14.

16. Couto N, Schooling SR, Dutcher JR, Barber J. Proteome Profiles of Outer Membrane Vesicles and Extracellular Matrix of Pseudomonas aeruginosa Biofilms. Journal of proteome research. 2015;14(10):4207-22. Epub 2015/08/26.

17. Torraca V, Masud S, Spaink HP, Meijer AH. Macrophage-pathogen interactions in infectious diseases: new therapeutic insights from the zebrafish host model. Disease models & mechanisms. 2014;7(7):785-97. Epub 2014/06/29.

18. Yoshida N, Frickel EM, Mostowy S. Macrophage-Microbe Interactions: Lessons from the Zebrafish Model. Frontiers in immunology. 2017;8:1703. Epub 2017/12/19.

19. van Rooijen N, Sanders A, van den Berg TK. Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of clodronate and propamidine. Journal of immunological methods. 1996;193(1):93-9. Epub 1996/06/14.

20. Bernut A, Herrmann JL, Kissa K, Dubremetz JF, Gaillard JL, Lutfalla G, et al. Mycobacterium abscessus cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2014;111(10):E943-52. Epub 2014/02/26.

21. Phan QT, Sipka T, Gonzalez C, Levraud JP, Lutfalla G, Nguyen-Chi M. Neutrophils use superoxide to control bacterial infection at a distance. PLoS pathogens. 2018;14(7):e1007157. Epub 2018/07/18.

22. Bowman EJ, Siebers A, Altendorf K. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1988;85(21):7972-6. Epub 1988/11/01.

23. Levitte S, Adams KN, Berg RD, Cosma CL, Urdahl KB, Ramakrishnan L. Mycobacterial Acid Tolerance Enables Phagolysosomal Survival and Establishment of Tuberculous Infection In Vivo. Cell host & microbe. 2016;20(2):250-8. Epub 2016/08/12.

24. Wessel AK, Liew J, Kwon T, Marcotte EM, Whiteley M. Role of Pseudomonas aeruginosa peptidoglycan-associated outer membrane proteins in vesicle formation. Journal of bacteriology. 2013;195(2):213-9. Epub 2012/11/06.

25. Clatworthy AE, Lee JS, Leibman M, Kostun Z, Davidson AJ, Hung DT. Pseudomonas aeruginosa infection of zebrafish involves both host and pathogen determinants. Infection and immunity. 2009;77(4):1293-303. Epub 2009/01/27.

26. Cafora M, Deflorian G, Forti F, Ferrari L, Binelli G, Briani F, et al. Phage therapy against Pseudomonas aeruginosa infections in a cystic fibrosis zebrafish model. Scientific reports. 2019;9(1):1527. Epub 2019/02/08.

27. Colucci-Guyon E, Tinevez JY, Renshaw SA, Herbomel P. Strategies of professional phagocytes in vivo: unlike macrophages, neutrophils engulf only surface-associated microbes. Journal of cell science. 2011;124(Pt 18):3053-9. Epub 2011/08/27.

28. Mishra M, Ressler A, Schlesinger LS, Wozniak DJ. Identification of OprF as a complement component C3 binding acceptor molecule on the surface of Pseudomonas aeruginosa. Infection and immunity. 2015;83(8):3006-14. Epub 2015/05/13.

29. Barbieri JT, Sun J. Pseudomonas aeruginosa ExoS and ExoT. Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology. 2004;152:79-92. Epub 2004/09/18.

30. Kooguchi K, Hashimoto S, Kobayashi A, Kitamura Y, Kudoh I, Wiener-Kronish J, et al. Role of alveolar macrophages in initiation and regulation of inflammation in Pseudomonas aeruginosa pneumonia. Infection and immunity. 1998;66(7):3164-9. Epub 1998/06/25.

31. Cheung DO, Halsey K, Speert DP. Role of pulmonary alveolar macrophages in defense of the lung against Pseudomonas aeruginosa. Infection and immunity. 2000;68(8):4585-92. Epub 2000/07/19.

32. Nivens DE, Ohman DE, Williams J, Franklin MJ. Role of alginate and its O acetylation in formation of Pseudomonas aeruginosa microcolonies and biofilms. Journal of bacteriology. 2001;183(3):1047-57. Epub 2001/02/24.

Figure legends

Figure 1. Visualisation and quantification of intracellular *P. aeruginosa* within macrophages. GFP expressing PAO1 WT and Δ*oprF* strains were used for infecting J774 macrophages. Cells were fixed after phagocytosis and 20 min (T_0) or 2,5 hours (T_{3h}) treatment with gentamycin and imaged with fluorescent microscope. DAPI was used to stain the nucleus. (A) Visualization of intracellular bacteria. The merged image shows Differential Interference Contrast (DIC), nucleus staining (blue) and bacteria expressing GFP (green). The scale bars depict 10 μm. (B) Count of the number of bacteria in infected macrophages from images obtained. The numbers of bacteria per cell (b/c) were classified in three groups and percentage of each class is shown. Count is done from 100 cells per condition and results are expressed as means from three independent experiments.

Figure 2. **Transmission electron micrographs (TEM) of *P. aeruginosa* within macrophages.** (A) Visualisation of bacteria at early infection time. J774 macrophages were infected with *P. aeruginosa* wild-type strain or *oprF* mutant for 30 min (wild-type) or 50 min (mutant, upper panels) and subjected to TEM. Black rectangles show intracellular bacteria that are shown at higher magnification. At this early time after phagocytosis, most of bacteria were found inside membrane bound vacuoles for the wild-type strain (upper panels, white arrows) whereas *oprF* mutant is mostly found in phagolysosomes (lower panels, white arrow). (B) Visualization of bacterial vesicles in infected phagosomes**.** TEM analysis denoted the presence of vesicles issued from bacteria (white arrows) that appeared often stuck to the vacuole membrane (black arrows). Vesicles were detected in PAO1 WT (upper panels) and Δ*oprF* strain (lower panel).

Figure 3. **Colocalization of *P. aeruginosa* with a probe that labels acidic compartments.** J774 macrophages were infected with PAO1 and Δ*oprF* strains expressing GFP. After 2.5 hrs of gentamicin treatment, infected J774 cells were incubated with Lysotracker for 10 min, a red fluorescent weak base that accumulates in acidic compartments. Cells were then fixed and imaged with fluorescence microscope. (A) The image shows individual panels for Differential Interference Contrast (DIC), lysosomal compartment (red), bacteria expressing GFP (green), the nucleus (blue) and merged image of all channels. White arrows show colocalization of bacteria with lysotracker while yellow arrows show non-colocalization. Scale bar is equivalent to 5 μm. (B) Values indicate the percentage of bacteria that colocalized with Lysotracker red (white arrows). Data are the mean (±SEM) of 3 independent experiments, with a minimum of 100 bacteria counted per experiment for each sample. *, $p \leq 0.05$ (Unpaired *t*-test)

Figure 4. The *P. aeruginosa* Δ*oprF* mutant is attenuated in zebrafish embryos in a macrophage-dependent manner. (A) Diagram of 50 hours post-fertilization (hpf) zebrafish embryo showing the caudal vein injection site (red arrow). (B) Survival curves of embryos infected with PAO1 wild-type stain or PAO1 Δ*oprF* mutant. Non infected embryos (NI) were used as control. Embryos were either treated with LipoPBS (left panel) or with LipoCld (right panel) to deplete macrophages. Approximately 3500 CFU *P. aeruginosa* were microinjected into the caudal vein (n = 50-70 for infected embryos and n=30 for NI embryos, pool of three independent experiments. Results are expressed as the percentage of surviving embryos at different times post-infection. Embryos are significantly more susceptible to infection with PAO1 wild-type than Δ*oprF* mutant in the presence of macrophages ($P<0.001$) but not in macrophage-depleted embryos. (C) Representative fluorescence images of 20 hpi embryos

infected by either wild-type or Δ*oprF P. aeruginosa* in the context of LipoPBS or LipoCld treatment. The efficiency of macrophages depletion is shown in the upper panels with the visualization of red macrophages. (D) Quantification of bacterial loads (fluorescence pixel counts) from two independent experiments. Each symbol represents individual embryo and horizontal lines indicate the median values. Statistical significance was determined by log-rank test (A) or one-tailed Mann-Whitney's *t*-test (C).

Figure 5. Real-time visualization of phagocytosis of wild-type and Δ*oprF P. aeruginosa* strains. (A) Illustration of zebrafish larva with the hindbrain ventricle injection site outlined in red. (B) The hindbrain ventricle is accessible to recruited myeloid cells and the phagocytosis of *P. aeruginosa* strains can be visualized using tg*(mfap4:mCherry)* embryos that harbor red macrophages. Hindbrain ventricle injection of wild-type or Δ*oprF* GFP-expressing *P. aeruginosa* was imaged at 2 hpi and white arrows depict phagocytized bacteria. Confocal microscopy was performed with maximum intensity projection of 64 sections every 1 µm, scale bar 30 µm. (C) Illustration of zebrafish larva with the muscle injection site outlined in red. (D) Confocal time-lapse images of *tg(mfap4:mCherry-F)* larva (red macrophages) infected with wild-type or Δ*oprF P. aeruginosa* (green) by injection in the muscle. The left panel is at 1.5 hpi and the right panel a 4.5 hpi. White arrows depict GFP-expressing *P. aeruginosa* phagocytosed by macrophages. Maximum intensity projection of 96 sections every 1 µm, scale bar 50 µm.

Figure 6. Effect of bafilomycin on the virulence of wild-type and Δ*oprF* mutant in zebrafish embryos. (A). Survival curves of embryos treated with 50 nM bafilomycin (Bafil) (B) or treated with DMSO as control (A). Embryos were infected with either wild-type or

Δ*oprF P. aeruginosa* (2000-2500 CFU) in the hindbrain ventricle at 2 dpf or not infected (NI) (n = 60-70 for infected embryos and n=45 for NI embryos, pool of three independent experiments). Statistical significance was determined by log-rank test. (C) Imaging and quantification of bacterial loads (fluorescence pixel counts) from one experiment at 20 hpi (n = 11-14). Each symbol represents individual embryo and horizontal lines indicate the median values. Statistical significance was determined by one-tailed Mann-Whitney's t test.

Supplemental figures

Figure S1. Phagocytosis of *P. aeruginosa* strains visualized using *tg(mfap4:mCherry-F)* embryos that harbor red macrophages. The figure shows additional individuals to Fig. 5B (two embryos injected with wild-type and two embryos injected with *oprF* mutant). Hindbrain ventricle injection of wild-type or Δ*oprF* GFP-expressing *P. aeruginosa* was imaged at 2 hpi and white arrows depict phagocytized bacteria. Maximum intensity projection of 70 to 110 sections every 1 µm, scale bar 30 µm.

Figure S2. Real-time visualization of phagocytosis of *P. aeruginosa* Δ*oprF* strain. Confocal time-lapse images of *tg(mfap4:mCherry-F)* larva (red macrophages) infected with Δ*oprF P. aeruginosa* (green) by injection in the muscle. The same area was imaged every hour from 1.5 hpi. White arrows depict extracellular GFP-expressing *P. aeruginosa* that will be taken up by macrophages, which are recruited at the bacterial location. Maximum intensity projection of 96 sections every 1 µm, scale bar 50 µm.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in the study

Name	**Description**	**Reference**
H103 PAO1	Wild-type	Laboratory collection
PAO1 Δ*mgtC*	Δ*mgtC*	(6)
H636	Δ*oprF*	(11)
pRK2013	Tra^+, Mob^+, ColE1, Km^r	Laboratory collection
pMF230	GFP*mut2,* Amp^r	(32)

Figure 1

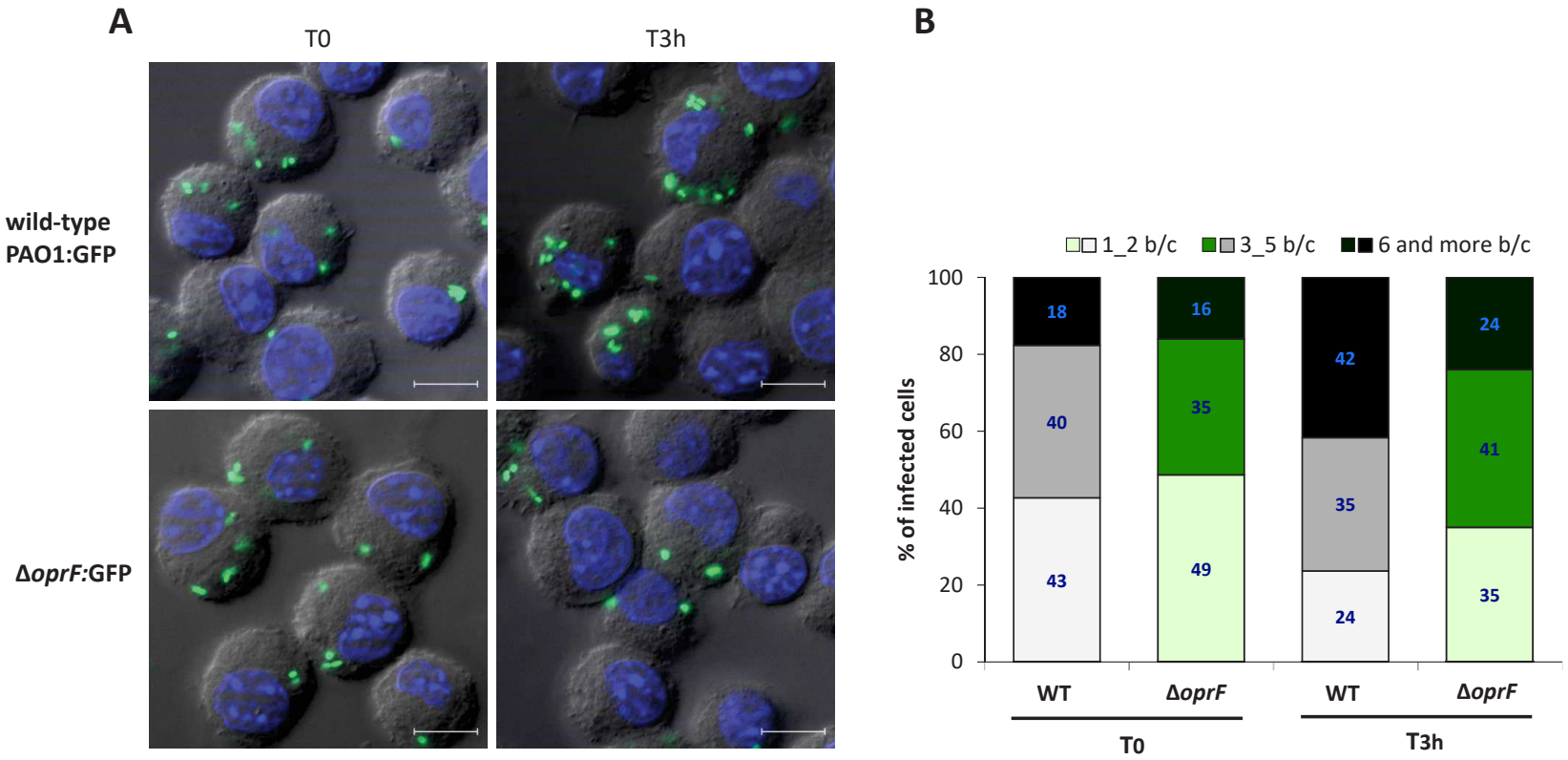

A
T0
T3h
wild-type
PAO1:GFP
ΔoprF:GFP
B
1_2 b/c
3_5 b/c
6 and more b/c
% of infected cells
100
80
60
40
20
0
18
40
43
16
35
49
42
35
24
24
41
35
WT
ΔoprF
WT
ΔoprF
T0
T3h

Figure 2

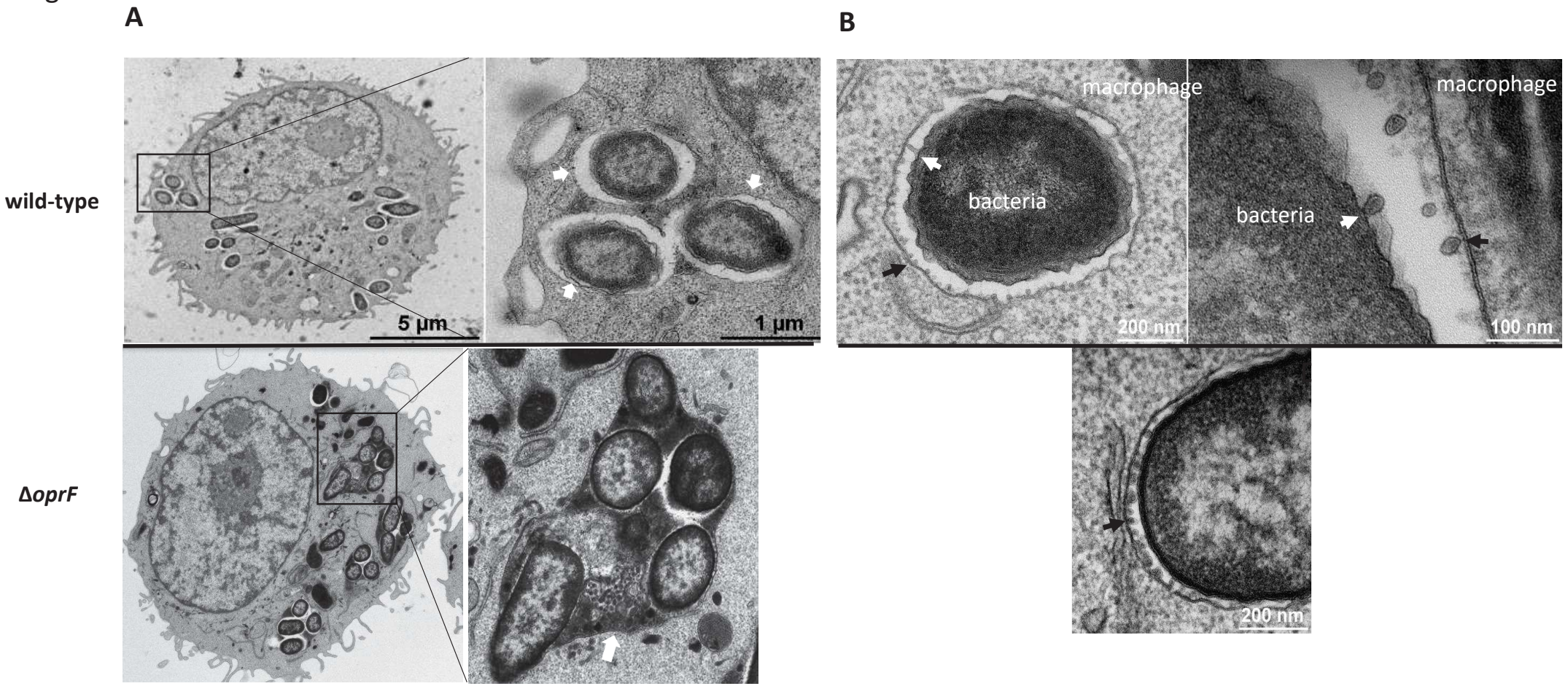

A
B
wild-type
ΔoprF
5 µm
1 µm
macrophage
bacteria
200 nm
macrophage
bacteria
100 nm
200 nm

Figure 3

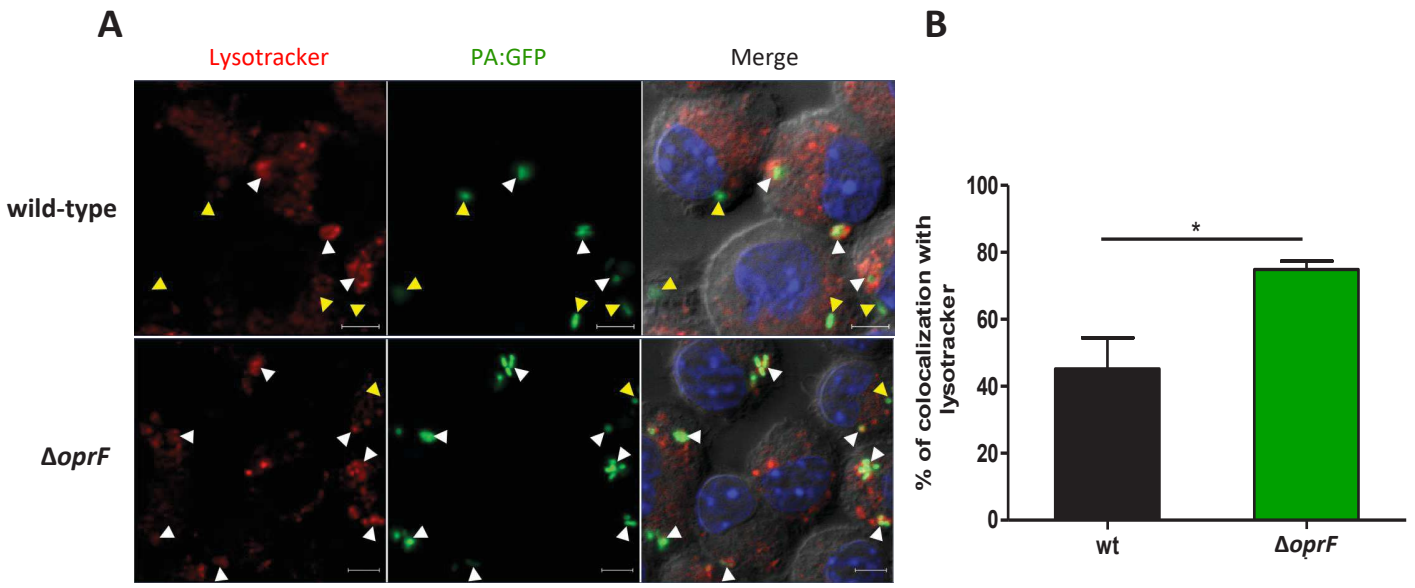

A
Lysotracker
PA:GFP
Merge
wild-type
ΔoprF
B
% of colocalization with lysotracker
100
80
60
40
20
0
*
wt
ΔoprF

Figure 4

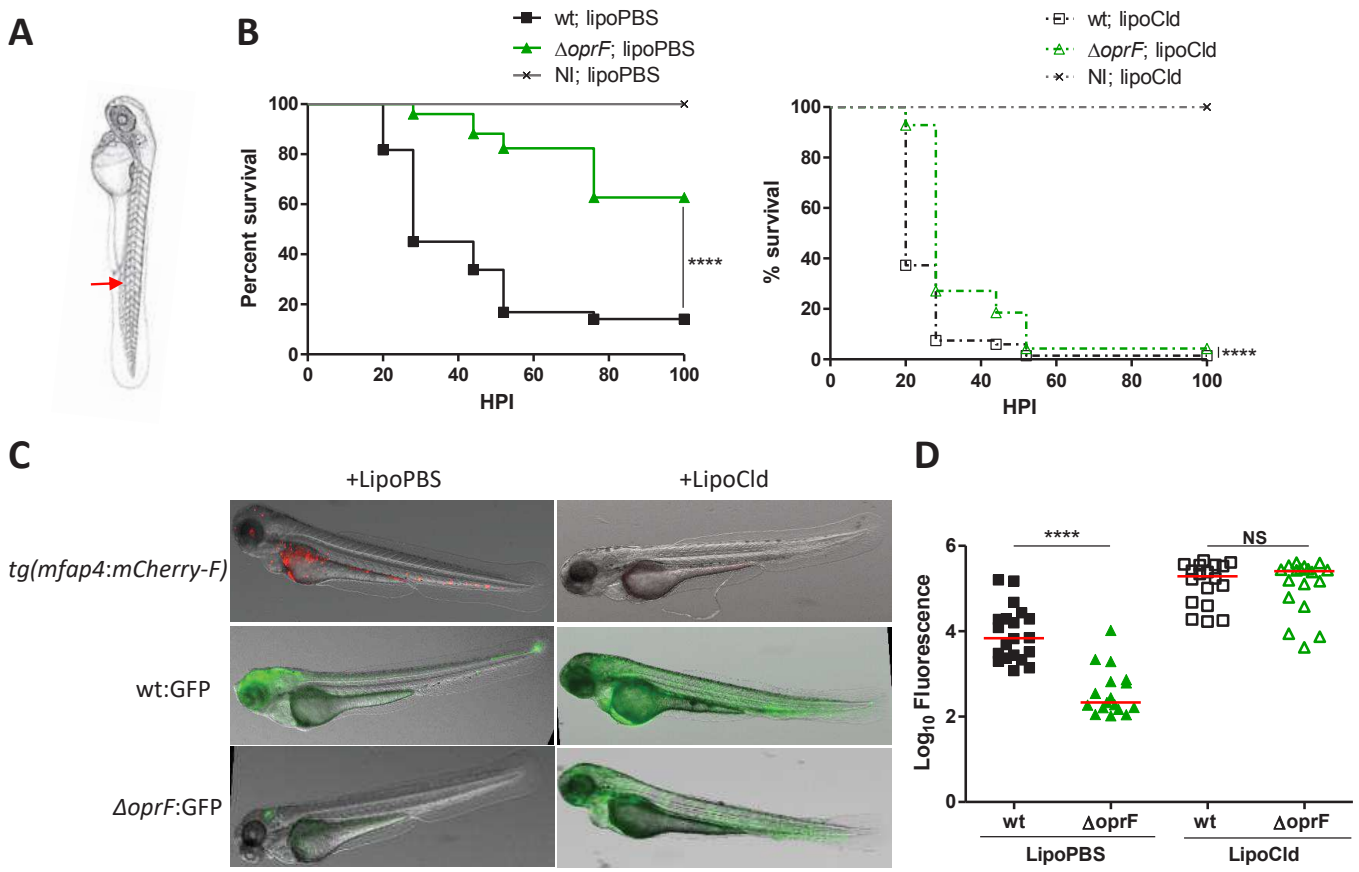

A
B
wt; lipoPBS
ΔoprF; lipoPBS
NI; lipoPBS
Percent survival
HPI
****
wt; lipoCld
ΔoprF; lipoCld
NI; lipoCld
% survival
HPI
****
C
+LipoPBS
+LipoCld
tg(mfap4:mCherry-F)
wt:GFP
ΔoprF:GFP
D
Log10 Fluorescence
****
NS
wt
ΔoprF
wt
ΔoprF
LipoPBS
LipoCld

Figure 5

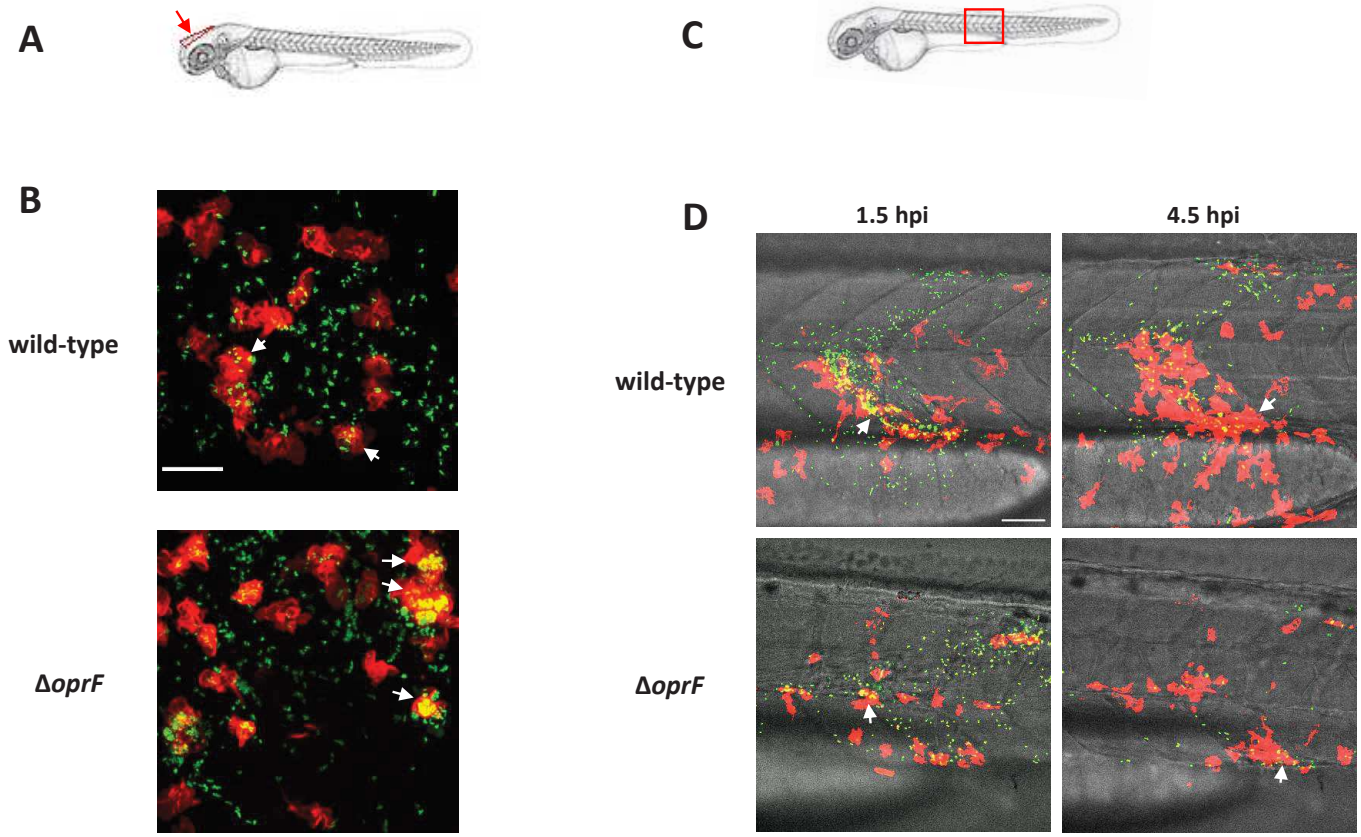


Figure 6

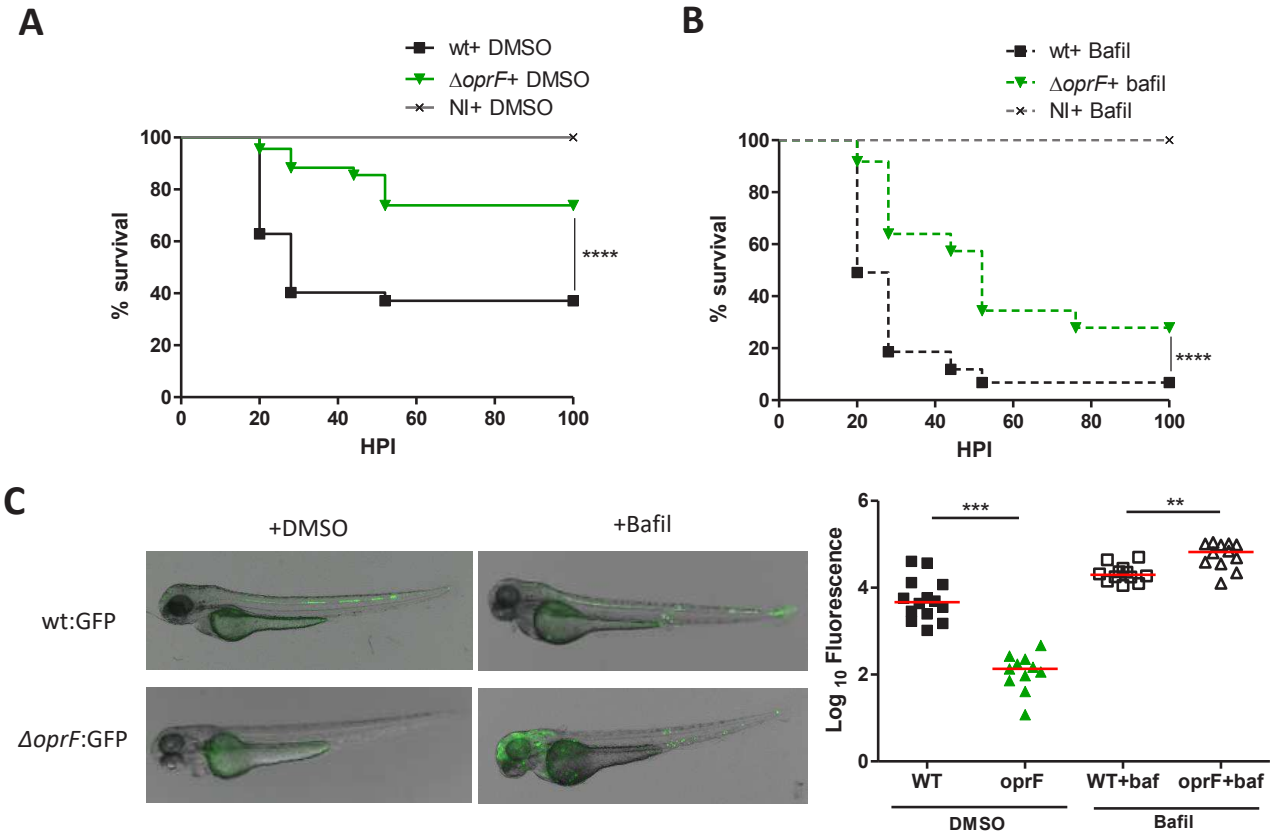

A
wt+ DMSO
ΔoprF+ DMSO
NI+ DMSO
% survival
HPI
****
B
wt+ Bafil
ΔoprF+ bafil
NI+ Bafil
% survival
HPI
****
C
+DMSO
+Bafil
wt:GFP
ΔoprF:GFP
Log 10 Fluorescence
***
**
WT
oprF
WT+baf
oprF+baf
DMSO
Bafil

Figure S1

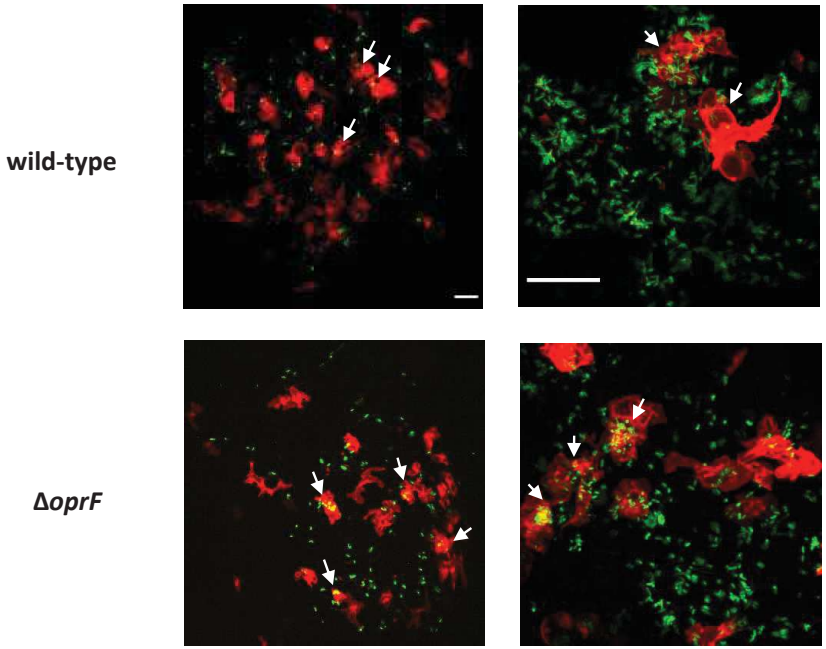
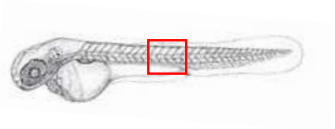
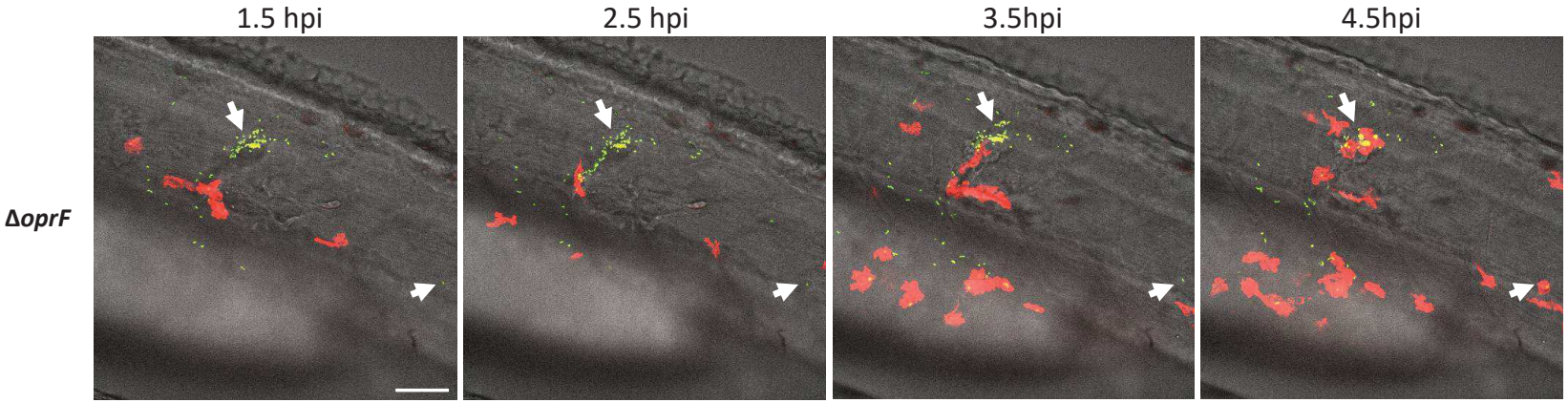


Figure S2





2.2.3 Résultats complémentaires

Le poisson-zèbre possède un système immunitaire (Renshaw and Trede, 2012) et un Cftr très proches de ceux de l'humain (Liu *et al.,* 2017). Jusqu'à présent, les tentatives précédentes pour définir un rôle direct du CFTR dans l'action bactéricide du macrophage vis-à-vis de *P. aeruginosa*, ont donné des résultats contradictoires et n'ont pas permis de dissocier clairement les effets directs du dysfonctionnement du CFTR au niveau du macrophage, des conséquences globales de l'infection à *P. aeruginosa*. Mon objectif était de tester le rôle du CFTR dans les macrophages murins wt et CF. Cependant, nous n'avons pas pu obtenir les cellules CF, je me suis alors uniquement focalisée sur le modèle embryon de poisson-zèbre.

L'utilisation du modèle embryon de poisson-zèbre déficient pour le Cftr (morphants) a vu le jour il y'a une dizaine d'années (Phennicie *et al.,* 2010). Seules deux équipes utilisant des morphants Cftr, ont tenté d'élucider le rôle du canal Cftr dans la réponse immunitaire innée du poisson-zèbre, au cours de l'infection aiguë à *P. aeruginosa* (Cafora *et al.,* 2019; Phennicie *et al.,* 2010), et leur résultats n'ont pas permis de montrer clairement une susceptibilité plus importante des morphants à l'infection par la bactérie. Ayant conscience des limites d'utilisation des morpholinos (e.g. effet transitoire), nous avons voulu développer un modèle d'infection d'embryon de poisson-zèbre génétiquement déficient pour le Cftr pour étudier le rôle du Cftr dans la fonction bactéricide des macrophages.

Dans mon étude j'ai décidé de tirer avantage du modèle poisson-zèbre génétiquement déficient pour le Cftr, développé par l'équipe de Navis et ses collègues (Navis *et al.,* 2013). Ce dernier n'a jamais été utilisé pour étudier le rôle du Cftr au niveau du macrophage dans l'élimination de *P. aeruginosa*.

2.2.3.1 Génotypage de la lignée de poisson-zèbre *cftr*^{pd1049}

La lignée de poisson-zèbre (*cftr*^{pd1049}) que nous avons reçu se composait d'adultes de différents génotypes mélangés: *cftr* +/+, *cftr* +/- et *cftr*-/- . La mutation crée par le groupe au niveau du gène *cftr* consiste en une insertion de nucléotides au niveau d'un site de restriction *EcoRV* (figure 40. A), aboutissant à la formation d'une protéine tronquée (figure 40. B) (Navis *et al.,* 2013).

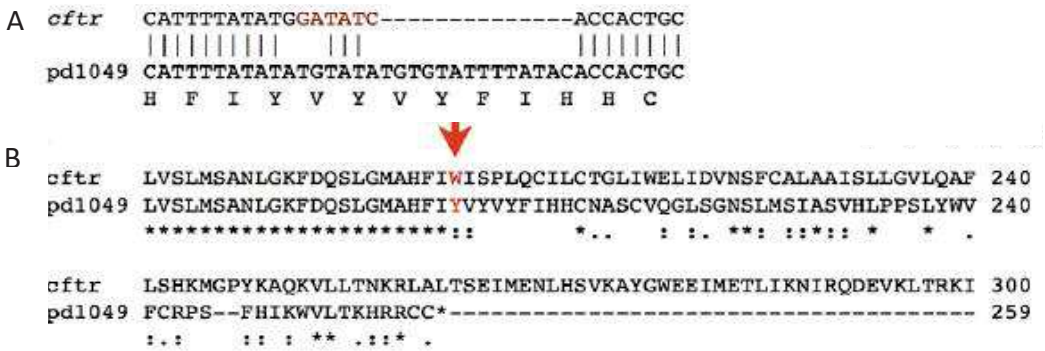


Figure 40. Alignement de séquences des allèles *cftr* sauvage et *cftr*^{pd1049}. (A) L'allèle *cftr*^{pd1049} a une insertion de nucléotides au niveau du site de restriction *EcoRV* (séquence en rouge). La mutation *cftr*^{pd1049} cause un décalage du cadre de lecture et aboutit à un codon stop prématuré. (B) Alignement des séquences en acides aminés codées par *cftr*^{pd1049} et *cftr* sauvage. D'après (Navis *et al.,* 2013).

Afin de trier les poissons selon leurs génotypes, une digestion enzymatique et un séquençage ont été réalisés. Pour cela, des extrémités de nageoires caudales ont été prélevées, puis dissous dans 100µL de NaOH 50 µM chauffé à 95°C pendant 10 mn. Afin de faciliter la dissolution des échantillons, des vortex ont été faits systématiquement, puis la solution refroidie était neutralisée par l'ajout d' 1/10ème du volume en Tris pH 7,5. Suite à cela, une PCR (polymerase chain reaction) du gène *cftr* a été effectuée en utilisant les amorces suivantes : *cftr*-exon6-F, TTGGGCCTAAATTTCAAATGAT et *cftr*-exon6-R, TTTGGATGCACAGTAGGCTAA. Cette étape qui semblait simple s'est vite révélée fastidieuse et l'amplification s'est montrée peu efficace (figure 41. A). Plusieurs mises au point ont été nécessaires pour améliorer l'efficacité de la PCR (polymérases et paramètres de la PCR). Mais, il s'est avéré que le l'utilisation du vortex endommageait l'ADN génomique. Cette étape n'a plus été réalisée, ce qui a permis après PCR et digestion enzymatique, de distinguer comme attendu les 3 génotypes (figure 41. B).

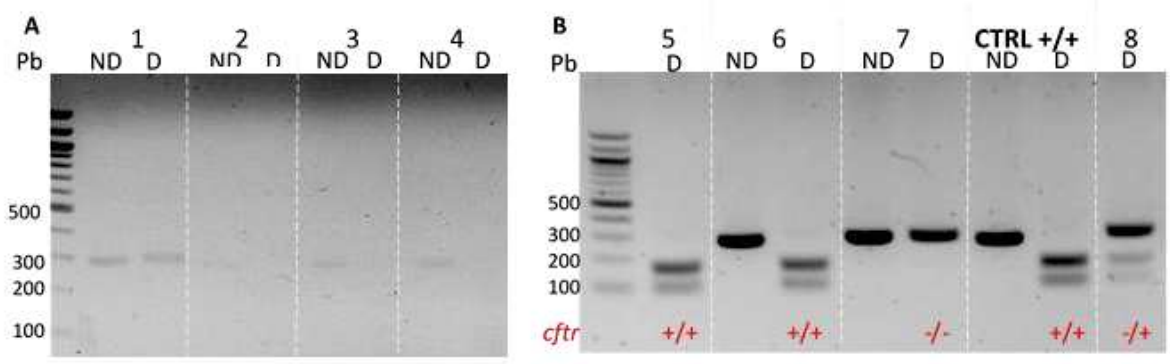


Figure 41. Électrophorèse sur gel d'agarose des fragments PCR (gène *cftr*) de 300 pb digérés par l'enzyme EcoRV : (A) suite au vortex des échantillons, (B) sans vortex des échantillons. Le brin d'ADN correspondant au gène sauvage contient le site de restriction *Eco*RV et est donc digéré par l'enzyme en 2 fragments de 200 et 100pb. Le brin portant la mutation n'a plus de site *Eco*RV et n'est pas digéré. Les chiffres indiquent la numérotation aléatoire des poissons génotypés, D : digéré, ND : non digéré, CRTL+/+ est le contrôle sauvage de génotype connu. L'interprétation des résultats est montrée en rouge.

Afin de s'assurer de la fiabilité des digestions enzymatiques, un séquençage a été effectué sur certains échantillons amplifiés. La comparaison des séquences nucléotidiques a permis de distinguer les séquences *cftr*+/+ des *cftr*-/- (figure 42), alors que l'identification des hétérozygotes *cftr*+/- a été faite sur la base de l'hétérogénéité de l'électrophorégramme (figure 42, panel du milieu).

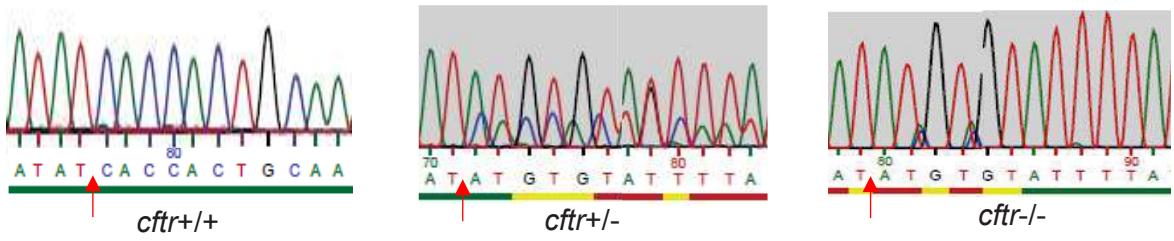


Figure 42. Électrophorégrammes correspondants aux profils des 3 génotypes *cftr*+/+, *cftr*+/- et *cftr*-/- de poisson-zèbre. Les flèches rouges montrent l'emplacement de mutations insertionnelles dans le gène *cftr.* Le panel du milieu et celui de droite montrent des séquences nucléotidiques similaires correspondant à celle du *cftr*-/-, pourtant l'électrophorégramme du milieu montre une hétérogénéité de séquence correspondant à un génotype *cftr*+/-.

Suite à cela, nous avons pu séparer les adultes *cftr*-/- et effectuer des croisements entre ces adultes.

2.2.3.2 Évaluer la susceptibilité des embryons cftr-/- à l'infection par *P. aeruginosa*

Des infections avec la souche wt ou le mutant *oprF* de *P. aeruginosa* ont été effectuées sur des embryons de poisson-zèbre sauvages ou mutants *cftr.* Le mutant *oprF* a été utilisé comme mutant connu pour être altéré dans la survie intramacrophagique et ayant un phénotype plus marqué que le mutant *mgtC.*

Dans un premier temps, les embryons issus de croisement d'adultes homozygotes *cftr*-/- ont été utilisés. Pour le contrôle *cftr* +/+, des erreurs de gestion nous ont fait perdre la lignée *cftr*+/+. J'ai alors utilisé la lignée sauvage AB (ayant le même fond génétique que les *cftr*+/+) comme contrôle. Les embryons AB et *cftr*-/- agés de 50 hpf ont été injectés au niveau de la veine caudale, avec la souche wt ou le mutant *oprF* de *P. aeruginosa* (1500 à 2500 CFU). Le suivi de la mortalité des embryons infectés a montré une sensibilité et une mortalité plus importantes des individus *cftr*-/- à l'infection par *P. aeruginosa* (wt et mutant *oprF*) comparés au contrôle sauvage AB (figure 43. A). La comparaison entre la charge bactérienne des 2 groupes d'embryons, par mesure de la fluorescence émise par les bactéries, montre une charge bactérienne significativement plus importante pour les mutants *cftr* (figure 43. B,C). Ce dernier résultat est cohérent avec les données de la littérature (Cafora *et al.,* 2019; Phennicie *et al.,* 2010). De manière intéressante, il n'y a pas de différence statistique entre la charge bactérienne des embryons *cftr*-/-, infectés par le wt ou le mutant *oprF* (figure 43. C), suggérant que la

clairance du mutant *oprF* dans l'embryon de poisson-zèbre est liée à la fonction du CFTR dans le macrophage.

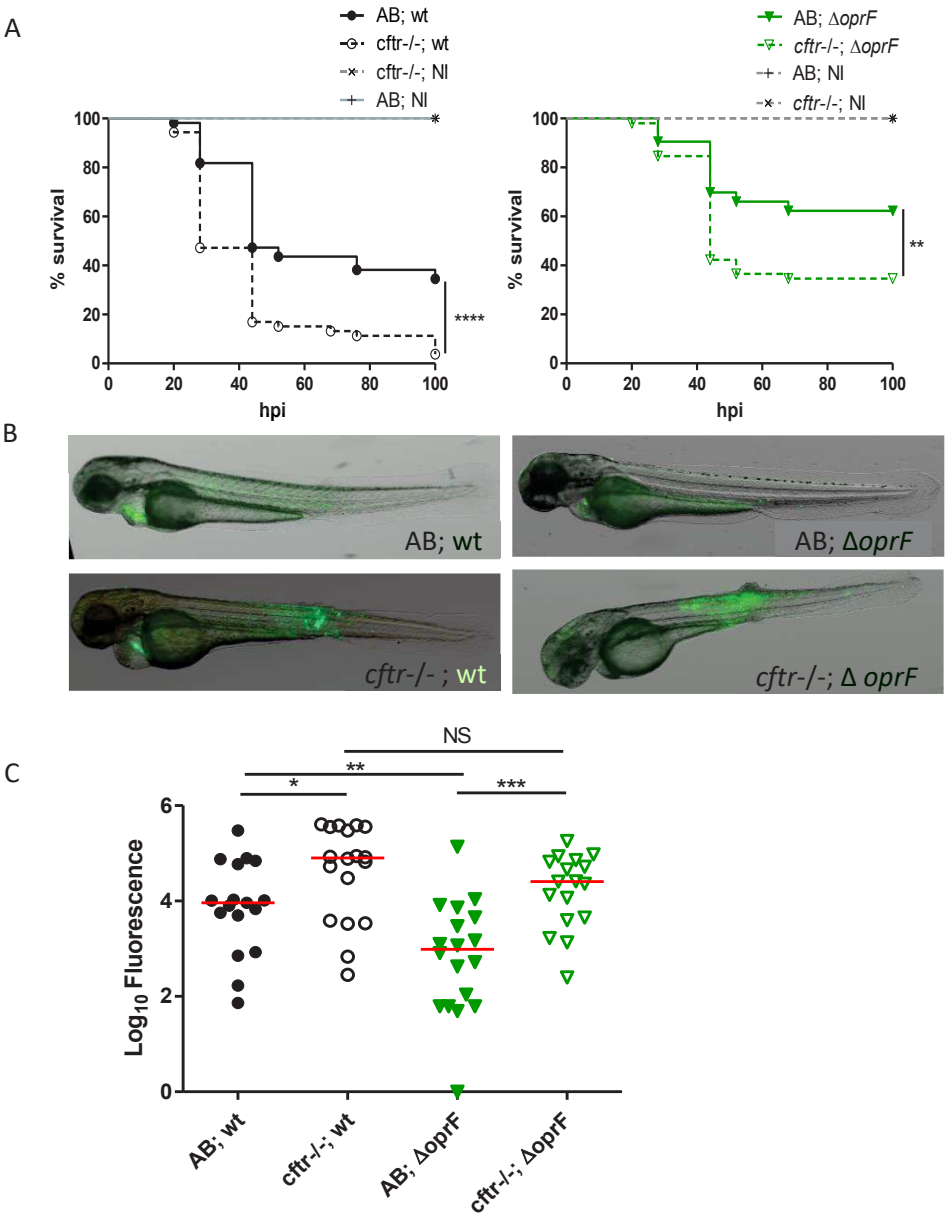


Figure 43. Les embryons *cftr*-/- sont fortement sensibles aux infections à *P. aeruginosa*. Les embryons sauvages (*cftr*+/+) et les mutants *cftr* (*cftr*-/-) sont injectés par voie intraveineuse avec la souche wt ou le mutant Δ*oprF* de *P. aeruginosa* (1500-2500 CFU). (A) Survie des embryons infectés ou non infectés (NI) (minimum de 52 embryons infectés et 20 embryons NI, moyenne de 2 expériences indépendantes). (B) Images de fluorescence représentatives d'embryons 20 hpi (heures post infection). (C) Charges bactériennes (FPC) de deux expériences indépendantes, chaque symbole représente un embryon individuel et les lignes horizontales indiquent les valeurs médianes. La signification statistique a été déterminée par : le test de log-rank (A), test *t* unilatéral de Mann-Whitney (C). **P*< 0.05, ***P*< 0.01, ****P*< 0.001, *****P*< 0.0001.

Les études sur les mutants *cftr* avaient révélé la faible fertilité des adultes mâles, ainsi qu'une forte mortalité des embryons au cours des premiers stades de développement (Liao *et al.,* 2018; Navis *et al.,* 2013). Ceci n'étant pas si problématique dans mon cas, nos discussions avec le groupe de M. Bagnat nous avaient finalement révélé, que des mutations compensatoires pouvaient masquer le phénotype *cftr*-/-. J'ai alors entrepris de refaire les expériences, en sélectionnant avant chaque expérience les embryons *cftr*-/-, sur un critère morphologique qui est l'absence de la KV (observable aux stades 8-10 somites, voir le chapitre 5.4).

Afin de tester la validité des expériences précédentes dans les bonnes conditions, les embryons *cftr*+/+ et les *cftr*-/- (sélectionnés KV-), ont été injectés avec la souche wt de *P. aeruginosa*, au niveau de deux sites différents, la veine caudale pour une infection systémique (figure 44. A), et le ventricule cérébral postérieur pour une infection localisée, propice à l'action des macrophages (Colucci-Guyon *et al.,* 2011) (figure 44. B, C).

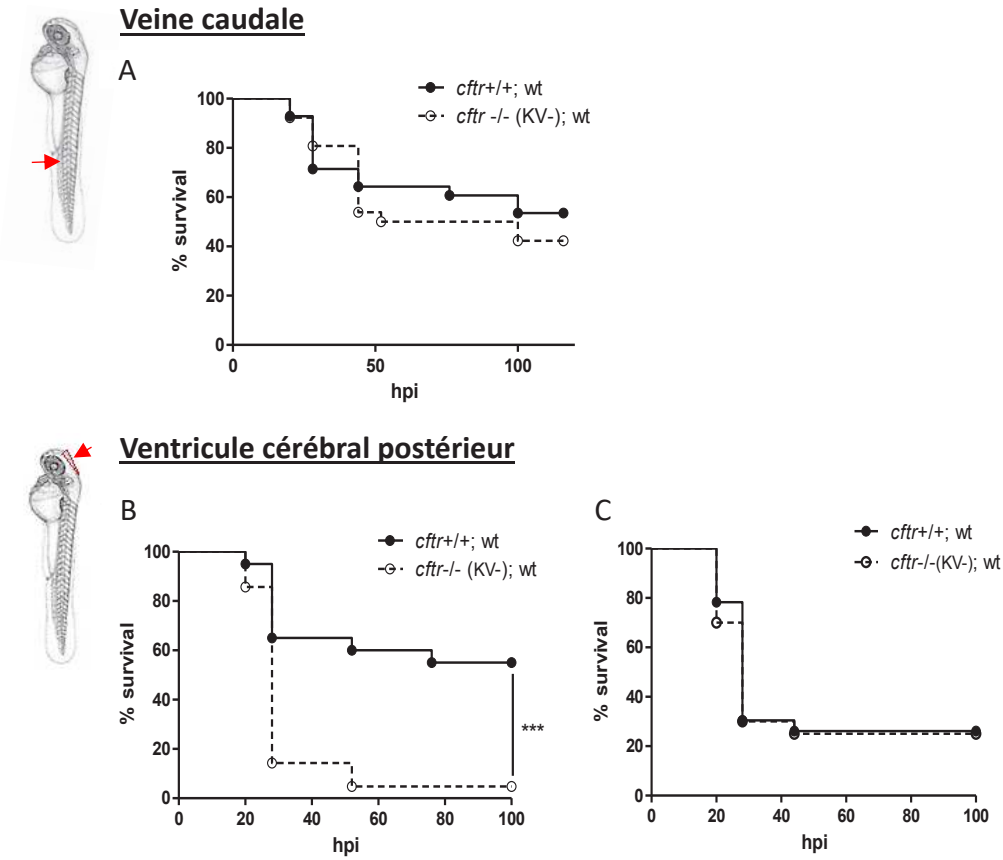


Figure 44. Infection des embryons *cftr*+/+ et embryons *cftr*-/-(KV-) par *P. aeruginosa*. Les embryons (*cftr*+/+ et *cftr*-/-) sont injectés par voie intraveineuse (A), ou au niveau du ventricule cérébral postérieur (B, C), avec environ 2000 CFU. N=20-24 embryons infectés. Figures représentatives d'au moins 2 expériences indépendantes, *** P<0.001, test statistique de log-rank.

L'injection des bactéries au niveau de la veine caudale, n'a pas permis de montrer de différence significative entre la mortalité des embryons *cftr*+/+ et *cftr*-/-(KV-) (figure 44. A). Par contre, l'infection au niveau du ventricule cérébral montre des résultats plus divergents, avec l'observation quelques fois, d'une mortalité significativement plus importante des embryons *cftr*-/-(KV-) par rapport au contrôle (figure 44. B), et l'absence de différence dans d'autres expériences (figure 44. C). L'observation d'une différence entre la susceptibilité des embryons *cftr*+/+ et *cftr*-/-(KV-) à l'infection par *P. aeruginosa*, semble dépendre du site d'injection, et montre une variabilité qui pourrait dépendre de l'état de l'embryon.

En conclusion, nous avons mis en place un nouveau modèle d'étude du rôle du Cftr dans l'infection à *P. aeruginosa*, l'embryon *cftr*-/-, qui semble plus robuste que l'utilisation de morphants, mais est également plus contraignant, du fait de la sélection des embryons à un temps précis selon l'absence de la KV. Ce modèle pourrait contribuer à déterminer le rôle du Cftr au niveau des macrophages durant l'infection à *P. aeruginosa*.

IV. Conclusion, discussion et perspectives

L'étude des facteurs bactériens impliqués dans la survie intramacrophagique de *P. aeruginosa* nous a amené à nous intéresser aux facteurs de virulence MgtC et OprF, en utilisant aussi bien des modèles d'infection cellulaire que animal. Au cours de ma thèse, j'ai développé une stratégie antivirulence chez *P. aeruginosa* basée sur le peptide synthétique MgtR ciblant MgtC.

Une deuxième partie de mon travail a porté sur le rôle du macrophage dans la clairance de l'infection à *P. aeruginosa*. Au cours de cette étude, je me suis intéressée à l'étude du mutant *oprF* au cours de l'infection des macrophages et des embryons de poisson zèbre. J'ai également développé un modèle d'infection CF pour étudier la contribution du Cftr dans la survie intramacrophagique de *P. aeruginosa*.

Concernant l'article en co-2nd auteur (article 2), la discussion portera principalement sur les expériences auxquelles j'ai participé.

1 Développement d'une stratégie antivirulence ciblant MgtC

1.1 MgtC et biofilm

MgtC est un facteur impliqué dans la survie intramacrophagique de plusieurs pathogènes intracellulaires et de *P. aeruginosa*. Le rôle de MgtC a été bien décrit chez *Salmonella*, où MgtC est impliqué dans l'inhibition de la synthèse de cellulose, qui est le composant principal du biofilm chez cette bactérie. Par ailleurs, la diminution de synthèse de cellulose est corrélée avec l'augmentation de virulence chez *S*. Typhimurium dans le macrophage (Pontes *et al.,* 2015). Le biofilm de *P. aeruginosa* est essentiellement constitué d'EPS et nous avons montré au cours de cette étude, une augmentation de production de Psl chez le mutant *mgtC,* lorsque la bactérie est dans le macrophage. L'augmentation de Psl joue un rôle dans la croissance de *P. aeruginosa* dans le milieu carencé en Mg^{2+} et la formation de biofilm, mais contrairement à *S*. Typhimurium, cette augmentation ne semble pas être impliquée dans l'atténuation de la virulence du mutant *mgtC* dans le macrophage. Cependant, comme il pourrait y avoir des compensations entre les gènes EPS impliqués dans le biofilm, il faudrait également tester la virulence dans le macrophage d'un triple mutant *mgtC psl pel,* qui ne produit pas de biofilm (Ghafoor *et al.,* 2011) pour valider nos résultats.

1.2 Étude de l'effet du peptide Synthétique MgtR

1.2.1 Effet de MgtR sur la survie intramacrophagique de *P. aeruginosa*

Les derniers résultats du laboratoire avaient montré une diminution de la virulence de *P. aeruginosa* (PAO1), dans les macrophages en culture et dans l'embryon de poisson-zèbre, suite à l'expression ectopique de MgtR (Belon *et al.,* 2015). Durant ma thèse, j'ai testé pour la première fois l'effet d'un peptide synthétique MgtR sur la virulence de *P. aeruginosa*. J'ai montré que le traitement direct de la souche sauvage PAO1 avec le peptide MgtR, réduit significativement la survie bactérienne dans les macrophages. De plus, cet effet semble être lié à la dégradation de MgtC, sur la base des résultats de WB, et du fait qu'on n'observe pas d'effet de MgtR sur la survie intramacrophagique du mutant *mgtC.* Ces résultats encourageants nous ont donc permis de valider l'effet biologique du peptide synthétique MgtR.

Étant donné que notre objectif est de développer une molécule thérapeutique, qui aurait un effet après infection, nous avons évalué l'effet du peptide MgtR ajouté sur les macrophages infectés par PAO1. Nos résultats montrent une diminution significative de la survie de PAO1 dans les macrophages traités. Ceci est en accord avec l'internalisation du peptide par les cellules, qui a pu être observée au laboratoire par microscopie (utilisation d'un peptide MgtR-FITC) (figure 45).

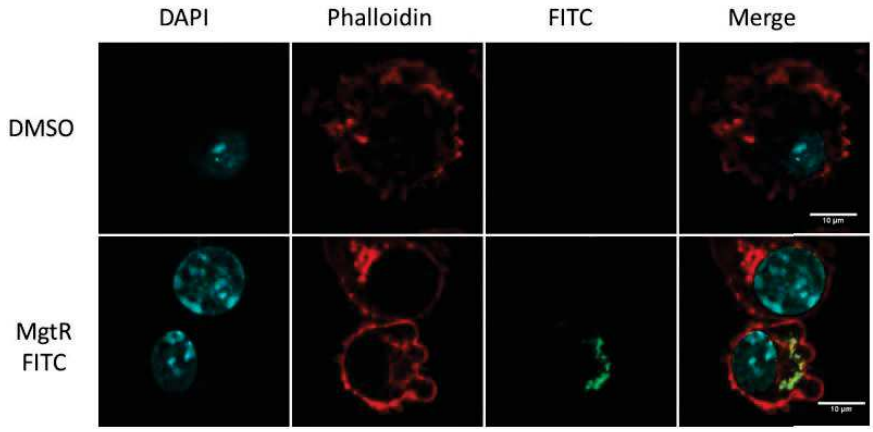


Figure 45. Visualisation du peptide MgtR-FITC à l'intérieur des macrophages J774. Les macrophages ont été observés au microscope confocal à fluorescence. La phalloïdine a été utilisée pour marquer l'actine de la membrane du macrophage. D'après (Thèse de doctorat, Rosas Olvera. 2018).

Néanmoins, l'effet du peptide MgtR sur les macrophages infectés par PAO1, bien que significatif, reste faible. On pourrait expliquer cela par le fait que: (I) La quantité de peptide au contact des bactéries internalisées soit faible (II) Du fait de la faible solubilité du peptide, des agrégats peuvent limiter son

internalisation par les cellules. (III) Enfin, une détérioration/dégradation du peptide peut avoir lieu dans les cellules, limitant ainsi son efficacité.

1.2.2 Effet de MgtR sur la virulence de *P. aeruginosa* dans l'embryon de poisson-zèbre

Les essais d'injection du peptide MgtR dans les embryons de poisson-zèbre infectés par PAO1, se sont révélés difficiles, du fait de l'hydrophobicité du composé. Celui-ci une fois chargé dans la micro-aiguille d'injection s'agglutine et bouche cette dernière, limitant son utilisation dans l'embryon et ne permettant pas de montrer un effet antivirulence du peptide dans ce modèle.

Pour tenter de résoudre ce problème, on pourrait utiliser des systèmes pour délivrer le peptide, comme les liposomes. Ces derniers ciblant naturellement les macrophages, pourraient offrir une bonne alternative (Kelly *et al.,* 2010). On pourrait également encapsuler le peptide dans des nanoparticules (Fenaroli *et al.,* 2014). Enfin, il serait important de vérifier dans ce modèle animal transparent, si l'absence d'effet de MgtR ne serait pas plutôt liée à une demi-vie courte du peptide. D'autant plus qu'un peptide MgtR-FITC est disponible, permettant ainsi de suivre en temps réel la molécule fluorescente dans l'embryon.

Par ailleurs, nous avons pour la première fois réussi à purifier une protéine de la famille MgtC. L'étude structurale du complexe MgtC-MgtR pourrait permettre d'optimiser la molécule MgtR, et apporter des solutions quant au manque de solubilité du composé. Avec ces optimisations, si un effet de MgtR est observé contre *P. aeruginosa* PAO1 dans ce modèle vertébré, la perspective est de le tester avec des souches cliniques.

1.2.3 Mécanisme d'action de MgtR

Le traitement de PAO1 par le peptide synthétique MgtR réduit la virulence de la bactérie, sans pour autant avoir d'effet sur la viabilité de celle-ci. Ce qui fait de MgtR un peptide antivirulence différent des peptides antimicrobiens classiques.

L'effet antivirulence du peptide synthétique MgtR semble être lié à la dégradation de MgtC. Cependant, on ne peut pas exclure un effet sur la dégradation d'autres protéines, comme l'a montré une étude similaire menée chez *S*. Typhimurium (dégradation de MgtC et MgtB) (Rosas Olvera *et al.,* 2019). Des expériences supplémentaires seront nécessaires, pour évaluer un éventuel effet de MgtR sur d'autres protéines membranaires de *P. aeruginosa*. Il nous faudrait également déterminer la localisation précise de MgtR dans la bactérie, en prenant avantage du peptide fluorescent et de la

technique de microscopie corrélative (combiner la microscopie optique avec la résolution de la microscopie électronique).

L'utilisation d'un peptide « scrambled » dépourvu de l'hélice α (contenant les acides aminés de MgtR dans un ordre différent) ne montre pas d'effet sur PAO1, suggérant l'importance de l'hélice α dans l'activité de MgtR. Nous en savons très peu sur le mécanisme conduisant à la dégradation de MgtC de *P. aeruginosa* suite à l'ajout du peptide synthétique. Ce mécanisme semble être différent de celui du peptide endogène. En effet, le motif Ala-coil (A10, S17, A24) du MgtR synthétique n'est pas nécessaire à la dégradation de MgtC, et des résultats similaires aux ceux avec le peptide sauvage sont obtenus avec le variant MgtR-S17I sur la survie intracellulaire de *P. aeruginosa* (résultats non montrés).

1.2.4 Interférence de MgtR avec la dimérisation de MgtC de *P. aeruginosa* ?

La technique de double hybride bactérien avait montré la dimérisation de la protéine MgtC de *M. tuberculosis* (Belon *et al.,* 2016) et indique qu'il en est de même pour MgtC de *P. aeruginosa* (résultat non montré). Lors des essais de purification de MgtC de *P. aeruginosa*, les chromatogrammes ainsi que la SM native, suggéraient la présence de dimères. Ces dimères MgtC semblent être liés par ponts disulfures (résultats complémentaires, figure 38). Nous avons alors testé l'implication de deux cystéines conservées, C99 et C155, localisées respectivement dans la partie N- et C-terminale de MgtC. Seul le résidu C99 semble etre important dans la formation de dimères MgtC. Ce résultat est conforté par des expériences de double hybride bactérien (G. Mongin/ A. Blanc-Potard). Il sera intéressent de tester le comportement dans le macrophage d'une souche PAO1 exprimant la protéine MgtC C99S, afin de déterminer si la dimérisation de MgtC via son domaine N-terminal (TM4), serait importante pour sa fonction dans le macrophage.

Rappelons que le domaine TM4 de MgtC est le domaine d'interaction avec MgtR. De plus, ce domaine est également important dans l'interaction de MgtC avec l'ATP synthase (rôle dans le macrophage, voir

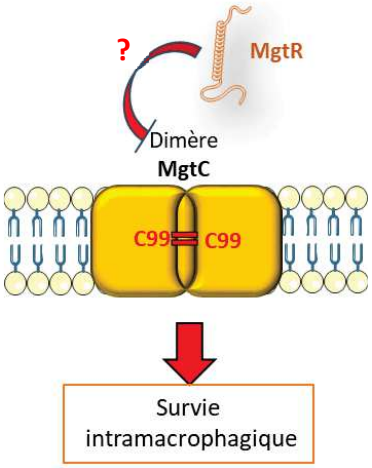


Figure 46. Interférence de MgtR avec la dimérisation de MgtC

chapitre 3.1.5 de l'introduction). On pourrait supposer que le dimère MgtC jouerait un rôle dans la virulence de *P. aeruginosa* dans le macrophage, et que MgtR en interférant avec la dimérisation de MgtC, réduirait la survie intramacrophagique de ce pathogène (figure 46). Ceci pourrait être testé dans un 1er temps dans le cadre du double hybride bactérien, comme cela a été fait pour MgtC de *M. tuberculosis* (Belon *et al.,* 2016).

En conclusion, les résultats prometteurs obtenus avec MgtR sur la survie intramacrophagique de *P. aeruginosa* (article 1), nous encouragent à étendre l'étude sur les souches cliniques de *P. aeruginosa,* ainsi que sur d'autres pathogènes exprimant *mgtC,* comme cela a été fait pour *S*. Typhimurium (Rosas Olvera *et al.,* 2019). Des améliorations de la molécule devraient permettre de valider son efficacité sur un modèle animal (figure 47). Enfin, des études plus poussées devraient être menées afin d'élucider le mécanisme d'action du peptide synthétique MgtR chez *P. aeruginosa*, notamment sur la dimérisation de MgtC, ainsi que le rôle du dimère dans la fonction intramacrophagique de MgtC chez *P. aeruginosa* (rôle dans l'interaction avec l'ATP synthase). L'étude structurale du complexe MgtC/MgtR permettra également de définir les changements structuraux induits par le peptide.

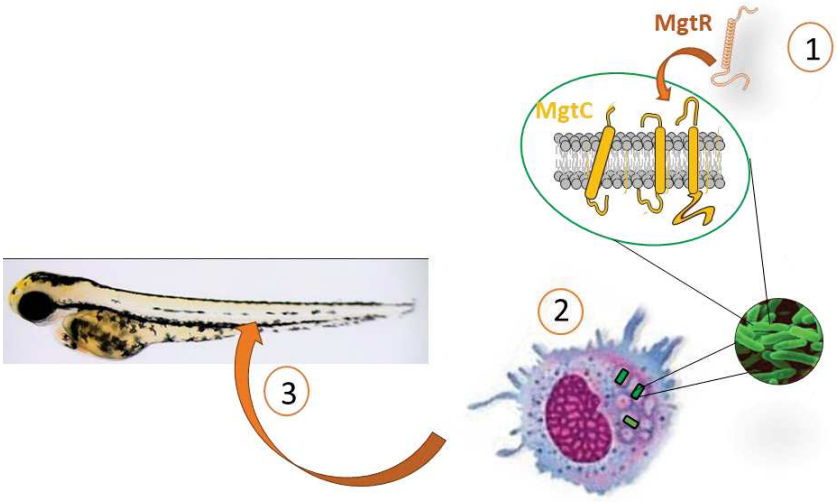


Figure 47. Schéma de la stratégie antivirulence basée sur le peptide MgtR, chez *P. aeruginosa :* Du test *in vitro* et *in cellulo* (1,2) au modèle animal (3)

L'interférence avec la virulence bactérienne liée à MgtC, par le peptide antagoniste MgtR, est une approche prometteuse qu'on pourrait coupler à l'antibiothérapie.

2 Étude du rôle d'OprF dans la survie intramacrophagique de *P. aeruginosa*

2.1 Devenir intracellulaire de *P. aeruginosa*

La survie intramacrophagique de *P. aeruginosa* est dépendante de MgtC et OprF. Ces deux facteurs sont impliqués dans l'expression du SST3 lors de l'infection des macrophages, ce qui joue un rôle important dans l'échappement intracellulaire de *P. aeruginosa* à l'action bactéricide du macrophage (article 2). Durant ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressée à l'étude du mutant *oprF*, qui montre un phénotype plus marqué que le mutant *mgtC.* J'ai montré, lors de l'infection des macrophages en culture, que le mutant *oprF* était plus souvent associé aux vacuoles acides que la souche sauvage. Ce qui nous amène à formuler deux hypothèses : soit que *P aeruginosa* une fois internalisé dans le phagosome, inhiberait la fusion avec les lysosomes acides, via OprF, soit que la bactérie internalisée, induirait une lyse de la membrane vacuolaire et échapperait ainsi à l'acidification des phagolysosomes. Nos résultats seraient en faveur de cette dernière hypothèse, puisqu'OprF favorise l'expression du SST3, lui-même important pour l'échappement du phagosome (article 2).

De plus, la microscopie électronique montre la présence de vésicules entre la membrane de *P aeruginosa* et la membrane du phagosome. Ces vésicules semblent provenir de la bactérie (VMs), et sont observées aussi bien avec la souche sauvage qu'avec le mutant *oprF.* Bien qu'OprF soit particulièrement abondant dans les VMs (Couto *et al.,* 2015), le mutant *oprF* est décrit comme produisant plus de VMs dans le milieu de culture liquide (Wessel *et al.,* 2013). Ces vésicules pourraient contenir des molécules bactériennes impliquées dans la lyse membranaire, et leur contenu pourrait différer entre la souche sauvage et le mutant *oprF.* Déterminer l'origine et la composition de ces VMs pourrait apporter des réponses supplémentaires quant au rôle d'OprF dans l'échappement de *P. aeruginosa* aux vacuoles acides des macrophages.

2.2 Rôle d'OprF dans la virulence de *P. aeruginosa* dans l'embryon de poisson-zèbre

Nous avons évalué pour la première fois le rôle d'OprF dans un modèle vertébré, possédant un système immunitaire inné entièrement fonctionnel, avec des macrophages proches de ceux de l'humain (Torraca and Mostowy, 2018). Le mutant *oprF* est atténué et la déplétion des macrophages restaure la virulence du mutant dans l'embryon de poisson-zèbre, ce qui suggère qu'OprF joue un rôle important dans la protection des bactéries vis-à-vis du macrophage. Cet effet pourrait être dû en grande partie à la sous-expression du SST3 dans le mutant *oprF* (article 2), étant donné que des études précédentes avaient montré l'implication du SST3 dans la protection de *P. aeruginosa* vis-à-vis du macrophage dans

l'embryon de poisson-zèbre (Brannon *et al.,* 2009; Clatworthy *et al.,* 2009). De plus, j'ai également observé une association plus importante du mutant du SST3 avec les vacuoles acides, comparé à la souche sauvage (résultat non montré). Il serait intéressant de vérifier, si l'effet *in cellulo* et *in vivo* d'oprF vis-à-vis du macrophage est dépendant de son effet sur l'expression du SST3, et ce en induisant l'expression d'*exsA* (codant pour le facteur transcriptionnel du SST3) dans un mutant *oprF*, comme cela a été fait dans l'article 2.

L'inhibition de l'acidification des phagosomes par un inhibiteur d'ATPase vacuolaire, a augmenté la susceptibilité des embryons de poisson à l'infection par les 2 souches de *P. aeruginosa*, sauvage et mutant *oprF.* L'écart entre la virulence des deux souches semble être réduit, suggérant un effet partiel d'OprF en lien avec l'acidification *in vivo*. On pourrait visualiser l'association de *P. aeruginosa* avec les vacuoles acides au niveau des macrophages, ce qui serait important pour confirmer les observations *in cellulo.* De plus, mes résultats indiquent l'implication d'autres facteurs du macrophage comme la phagocytose.

2.3 Rôle d'OprF dans la phagocytose de *P. aeruginosa*

Il a été montré dans un modèle cellulaire, que le mutant *oprF* était moins phagocyté par les neutrophiles, du fait de sa faible opsonisation par le système du complément (Le C3b du complément se liant à OprF) (Mishra *et al.,* 2015). Dans mes expériences dans l'embryon de poisson-zèbre, j'ai plutôt observé une tendance du mutant *oprF* à être plus phagocyté et plus efficacement éliminé par le macrophage. Fait intéressant, on retrouve dans le poisson-zèbre les orthologues des composants du complément mammifère (Zhang and Cui, 2014), mais jusqu'à présent aucune étude n'a été mené dans ce modèle pour déterminer leur rôle durant l'infection. Ces observations nous encouragent à tester dans le modèle poisson-zèbre, le rôle du complément dans la réponse immunitaire vis-à-vis du mutant *oprF* de *P. aeruginosa*.

Par ailleurs, l'augmentation de la phagocytose pourrait, une fois de plus, être liée à la diminution de l'expression des gènes du SST3 et de la sécrétion d'ExoS et d'ExoT, qui auraient une activité anti-phagocytaire (Garrity-Ryan *et al.,* 2000).

2.4 Étude de l'implication du Cftr dans la susceptibilité des embryons à l'infection par *P. aeruginosa*

Mes premiers résultats avec les embryons issus d'adultes génotypés *cftr*-/-, montrent une susceptibilité plus importante des mutants suite à l'infection par *P. aeruginosa* (mortalité élevée, charge bactérienne importante). Les adultes mâles ayant probablement acquis de mutations compensatoires (fertilité observée), j'ai également procédé à la fastidieuse sélection phénotypique (KV). Cependant, les résultats d'infection par voie systémique des mutants (issus d'adultes *cftr*+/-) sélectionnés (KV-), ne montrent pas de mortalité augmentée de ces derniers par rapport à la lignée sauvage, ce qui est en accord avec les résultats obtenus avec les morphants *cftr* (Phennicie *et al.,* 2010).

Le choix du site d'injection est important dans le processus infectieux, et l'injection au niveau de compartiments clos, comme le ventricule cérébral postérieur, est intéressant pour l'observation du recrutement des phagocytes. J'ai pu d'ailleurs observer dans ce cas, une importante mortalité des embryons *cftr*-/-(KV-) suite à l'infection localisée. Ceci suggère que ce phénotype pourrait être lié à l'activité des macrophages, qui serait plus importante dans ce type de ventricule (Colucci-Guyon *et al.,* 2011). Néanmoins, on ne peut pas exclure que ce phénotype soit également lié aux neutrophiles recrutés, et des expériences supplémentaires devraient être faites afin d'étudier la contribution des neutrophiles en lien avec le Cftr.

Il faut noter que le manque de reproductibilité de ces expériences ne m'a pas permis de clairement conclure à un effet du Cftr sur la susceptibilité des embryons à l'infection. La sélection des embryons sur critère morphologique pourrait induire un biais, les individus ayant une KV de petite taille pourraient être confondus avec les embryons KV-. De ce fait, il est probable qu'il y ait des individus *cftr*+/- (ou même *cftr*+/+) avec les embryons sélectionnés KV- (nommés *cftr*-/- (KV-)).

Les expériences d'infection locale devront être répétées en testant en parallèle le mutant *oprF* et la souche sauvage, afin d'aborder l'implication du Cftr dans l'acidification du macrophage (figure 48).

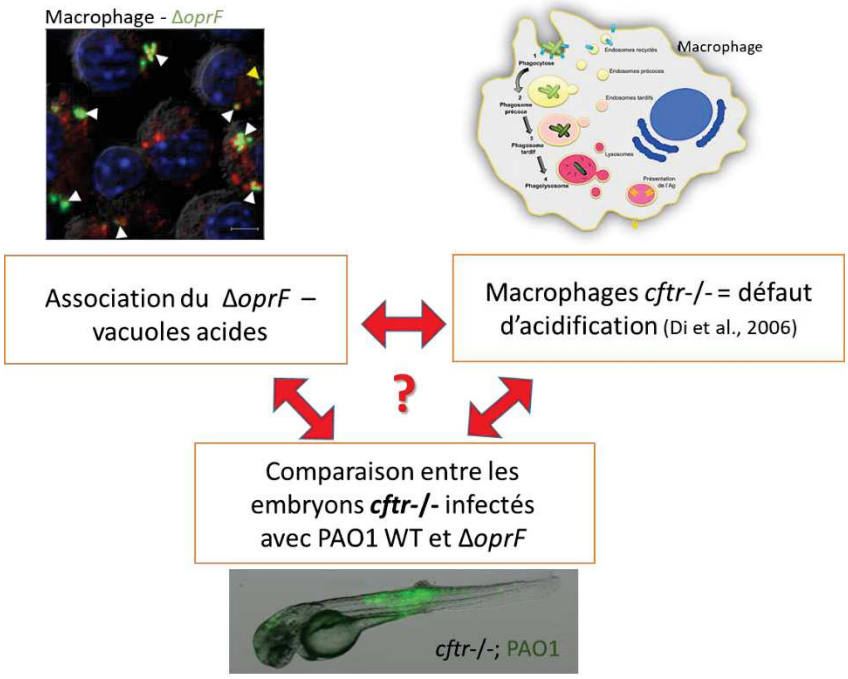


Figure 48. Apport de l'étude du mutant oprF dans la compréhension du rôle de CFTR vis-à-vis de l'acidification du macrophage.

En conclusion, le développement de ce nouveau modèle d'infection d'embryon de poisson-zèbre *cftr-/- - P. aeruginosa,* combiné aux outils disponibles chez le *Danio rerio*, permettra de mieux caractériser le rôle de Cftr dans l'immunité innée, et en particulier en ce qui concerne l'activité bactéricide des macrophages.

V. Bibliographie

A

Alexis, N.E., Muhlebach, M.S., Peden, D.B., and Noah, T.L. (2006). Attenuation of host defense function of lung phagocytes in young cystic fibrosis patients. J. Cyst. Fibros. *5*, 17–25.

Alix, E., and Blanc-Potard, A.-B. (2007). MgtC: a key player in intramacrophage survival. Trends Microbiol. *15*, 252–256.

Alix, E., and Blanc-Potard, A.-B. (2008). Peptide-assisted degradation of the *Salmonella* MgtC virulence factor. EMBO J. *27*, 546–557.

Alix, E., Godreuil, S., and Blanc-Potard, A.-B. (2006). Identification of a Haarlem Genotype-Specific Single Nucleotide Polymorphism in the *mgtC* Virulence Gene of *Mycobacterium tuberculosis.* J. Clin. Microbiol. *44*, 2093–2098.

Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D., and Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. Annu. Rev. Immunol. *30*, 459–489.

Appelberg, R. (2006). Macrophage nutriprive antimicrobial mechanisms. J. Leukoc. Biol. *79*, 1117–1128.

Azghani, A.O., Idell, S., Bains, M., and Hancock, R.E.W. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. Microb. Pathog. *33*, 109–114.

B

Baek, J., Choi, E., and Lee, E.-J. (2018). A rule governing the FtsH-mediated proteolysis of the MgtC virulence protein from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J. Microbiol. Seoul Korea *56*, 565–570.

Bagnat, M., Navis, A., Herbstreith, S., Brand-Arzamendi, K., Curado, S., Gabriel, S., Mostov, K., Huisken, J., and Stainier, D.Y.R. (2010). Cse1l is a negative regulator of CFTR-dependent fluid secretion. Curr. Biol. CB *20*, 1840–1845.

Balasubramanian, D., Schneper, L., Kumari, H., and Mathee, K. (2013). A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. Nucleic Acids Res. *41*, 1–20.

Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., and Guery, B. (2018). How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. Drugs Context *7*, 212527.

Belon, C. (2015). Rôle du facteur de virulence MgtC chez les mycobactéries et *Pseudomonas aeruginosa* et son inhibition par un peptide naturel. Université de Montpellier: thèse de doctorat, Biologie Santé, sous la direction de Blanc-Potard, A.

Belon, C., and Blanc-Potard, A.-B. (2016). Intramacrophage Survival for Extracellular Bacterial Pathogens: MgtC As a Key Adaptive Factor. Front. Cell. Infect. Microbiol. *6,* 52.

Belon, C., Rosas Olvera, M., Vives, E., Kremer, L., Gannoun-Zaki, L., and Blanc-Potard, A.-B. (2016). Use of the *Salmonella* MgtR peptide as an antagonist of the *Mycobacterium* MgtC virulence factor. Future Microbiol. *11*, 215–225.

Belon, C., Soscia, C., Bernut, A., Laubier, A., Bleves, S., and Blanc-Potard, A.-B. (2015). A Macrophage Subversion Factor Is Shared by Intracellular and Extracellular Pathogens. PLOS Pathog. *11*, e1004969.

Bergeron, A.C., Seman, B.G., Hammond, J.H., Archambault, L.S., Hogan, D.A., and Wheeler, R.T. (2017). Candida albicans and *Pseudomonas aeruginosa* Interact To Enhance Virulence of Mucosal Infection in Transparent Zebrafish. Infect. Immun. *85,* e00475-17.

Berman, J.N., Kanki, J.P., and Look, A.T. (2005). Zebrafish as a model for myelopoiesis during embryogenesis. Exp. Hematol. *33*, 997–1006.

Bernut, A., Moigne, V.L., Lesne, T., Lutfalla, G., Herrmann, J.-L., and Kremer, L. (2014). In Vivo Assessment of Drug Efficacy against *Mycobacterium abscessus* Using the Embryonic Zebrafish Test System. Antimicrob. Agents Chemother. *58*, 4054–4063.

Bernut, A., Lutfalla, G., and Kremer, L. (2015). Regard à travers le danio pour mieux comprendre les interactions hôte/pathogène. médecine/sciences *31*, 638–646.

Bernut, A., Dupont, C., Ogryzko, N.V., Neyret, A., Herrmann, J.-L., Floto, R.A., Renshaw, S.A., and Kremer, L. (2019). CFTR Protects against *Mycobacterium abscessus* Infection by Fine-Tuning Host Oxidative Defenses. Cell Rep. *26*, 1828-1840.e4.

Blanc-Potard, A.B., and Groisman, E.A. (1997). The *Salmonella* selC locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. EMBO J. *16*, 5376–5385.

Blanc-Potard, A.-B., and Lafay, B. (2003). MgtC as a Horizontally-Acquired Virulence Factor of Intracellular Bacterial Pathogens: Evidence from Molecular Phylogeny and Comparative Genomics. J. Mol. Evol. *57*, 479–486.

Blanc-Potard, A.-B., Solomon, F., Kayser, J., and Groisman, E.A. (1999). The SPI-3 Pathogenicity Island of *Salmonella enterica*. J. Bacteriol. *181*, 998–1004.

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

Bodey, G.P., Bolivar, R., Fainstein, V., and Jadeja, L. (1983). Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Infect. Dis. *5*, 279–313.

Boschiroli, M.L., Foulongne, V., and O'Callaghan, D. (2001). Brucellosis: a worldwide zoonosis. Curr. Opin. Microbiol. *4*, 58–64.

Bouffartigues, E., Moscoso, J.A., Duchesne, R., Rosay, T., Fito-Boncompte, L., Gicquel, G., Maillot, O., Bénard, M., Bazire, A., Brenner-Weiss, G., et al. (2015). The absence of the *Pseudomonas aeruginosa* OprF protein leads to increased biofilm formation through variation in c-di-GMP level. Front. Microbiol. *6,* 1-13.

Boutin, J.A., Li, Z., Vuillard, L., and Vénien-Bryan, C. (2016). La cryo-microscopie, une alternative à la cristallographie aux rayons X ? médecine/sciences *32*, 758–767.

Brannon, M.K., Davis, J.M., Mathias, J.R., Hall, C.J., Emerson, J.C., Crosier, P.S., Huttenlocher, A., Ramakrishnan, L., and Moskowitz, S.M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* Type III secretion system interacts with phagocytes to modulate systemic infection of zebrafish embryos. Cell. Microbiol. *11*, 755–768.

Brown, E. (2005). Complement Receptors, Adhesion, and Phagocytosis. Molecular Mechanisms of Phagocytosis. Medical Intelligence Unit. Springer, Boston, MA, 49–57.

Bruscia, E.M., and Bonfield, T.L. (2016). Cystic Fibrosis Lung Immunity: The Role of the Macrophage. J. Innate Immun. *8*, 550–563.

Buchmeier, N., Blanc-Potard, A., Ehrt, S., Piddington, D., Riley, L., and Groisman, E.A. (2000). A parallel intraphagosomal survival strategy shared by mycobacterium tuberculosis and *Salmonella* enterica. Mol. Microbiol. *35*, 1375–1382.

C

Cafiero, J.H., Lamberti, Y.A., Surmann, K., Vecerek, B., and Rodriguez, M.E. (2018). A *Bordetella pertussis* MgtC homolog plays a role in the intracellular survival. PloS One *13*, e0203204.

Cafora, M., Deflorian, G., Forti, F., Ferrari, L., Binelli, G., Briani, F., Ghisotti, D., and Pistocchi, A. (2019). Phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections in a cystic fibrosis zebrafish model. Sci. Rep. *9*, 1–10.

Cano, V., March, C., Insua, J.L., Aguiló, N., Llobet, E., Moranta, D., Regueiro, V., Brennan, G.P., Millán-Lou, M.I., Martín, C., et al. (2015). *Klebsiella pneumoniae* survives within macrophages by avoiding delivery to lysosomes. Cell. Microbiol. *17*, 1537–1560.

Cassin, E.K., and Tseng, B.S. (2019). Pushing beyond the envelope: the potential roles of OprF in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and pathogenicity. J. Bacteriol. *201*, e00050-19.

Cellier, M.F., Courville, P., and Campion, C. (2007). Nramp1 phagocyte intracellular metal withdrawal defense. Microbes Infect. *9*, 1662–1670.

Chand, N.S., Lee, J.S.-W., Clatworthy, A.E., Golas, A.J., Smith, R.S., and Hung, D.T. (2011). The Sensor Kinase KinB Regulates Virulence in Acute *Pseudomonas aeruginosa* Infection ▿. J. Bacteriol. *193*, 2989–2999.

Chatzinikolaou, I., Abi-Said, D., Bodey, G.P., Rolston, K.V., Tarrand, J.J., and Samonis, G. (2000). Recent experience with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with cancer: Retrospective analysis of 245 episodes. Arch. Intern. Med. *160*, 501–509.

Choi, S., Choi, E., Cho, Y.-J., Nam, D., Lee, J., and Lee, E.-J. (2019). The *Salmonella* virulence protein MgtC promotes phosphate uptake inside macrophages. Nat. Commun. *10*, 1–14.

Cifani, N., Pompili, B., Anile, M., Patella, M., Diso, D., Venuta, F., Cimino, G., Quattrucci, S., Di Domenico, E.G., Ascenzioni, F., et al. (2013). Reactive-oxygen-species-mediated *P. aeruginosa* killing is functional in human cystic fibrosis macrophages. PloS One *8*, e71717.

Clatworthy, A.E., Pierson, E., and Hung, D.T. (2007). Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. Nat. Chem. Biol. *3*, 541–548.

Clatworthy, A.E., Lee, J.S.-W., Leibman, M., Kostun, Z., Davidson, A.J., and Hung, D.T. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* infection of zebrafish involves both host and pathogen determinants. Infect. Immun. *77*, 1293–1303.

Coggan, K.A., and 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.

Colucci-Guyon, E., Tinevez, J.-Y., Renshaw, S.A., and Herbomel, P. (2011). Strategies of professional phagocytes in vivo: unlike macrophages, neutrophils engulf only surface-associated microbes. J. Cell Sci. *124*, 3053–3059.

Couto, N., Schooling, S.R., Dutcher, J.R., and Barber, J. (2015). Proteome Profiles of Outer Membrane Vesicles and Extracellular Matrix of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. J. Proteome Res. *14*, 4207–4222.

D

Dalbey, R.E., Wang, P., and van Dijl, J.M. (2012). Membrane Proteases in the Bacterial Protein Secretion and Quality Control Pathway. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR *76*, 311–330.

Davis, J.M., Clay, H., Lewis, J.L., Ghori, N., Herbomel, P., and Ramakrishnan, L. (2002). Real-time visualization of *mycobacterium*-macrophage interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos. Immunity *17*, 693–702.

Del Porto, P., Cifani, N., Guarnieri, S., Di Domenico, E.G., Mariggiò, M.A., Spadaro, F., Guglietta, S., Anile, M., Venuta, F., Quattrucci, S., et al. (2011). Dysfunctional CFTR Alters the Bactericidal Activity of Human Macrophages against *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS ONE *6,* e19970.

Deriy, L.V., Gomez, E.A., Zhang, G., Beacham, D.W., Hopson, J.A., Gallan, A.J., Shevchenko, P.D., Bindokas, V.P., and Nelson, D.J. (2009). Disease-causing Mutations in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Determine the Functional Responses of Alveolar Macrophages. J. Biol. Chem. *284*, 35926–35938.

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

Díaz-Pascual, F., Ortíz-Severín, J., Varas, M.A., Allende, M.L., and Chávez, F.P. (2017). In vivo Host-Pathogen Interaction as Revealed by Global Proteomic Profiling of Zebrafish Larvae. Front. Cell. Infect. Microbiol. *7,* 334.

Duggan, G.M., and Mostowy, S. (2018). Use of zebrafish to study *Shigella infection*. Dis. Model. Mech. *11*(2).

E

Ellett, F., Pase, L., Hayman, J.W., Andrianopoulos, A., and Lieschke, G.J. (2011). *mpeg1* promoter transgenes direct macrophage-lineage expression in zebrafish. Blood *117*, e49-56.

F

Fenaroli, F., Westmoreland, D., Benjaminsen, J., Kolstad, T., Skjeldal, F., Meijer, A., van der Vaart, M., Ulanova, L., Roos, N., Nyström, B., et al. (2014). Nanoparticles as Drug Delivery System against tuberculosis in Zebrafish Embryos: Direct Visualization and Treatment. ACS Nano *8*, 7014–7026.

Fito-Boncompte, L., Chapalain, A., Bouffartigues, E., Chaker, H., Lesouhaitier, O., Gicquel, G., Bazire, A., Madi, A., Connil, N., Véron, W., et al. (2011). Full Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Requires OprF. Infect. Immun. *79*, 1176–1186.

Flannagan, R.S., Jaumouillé, V., and Grinstein, S. (2012). The cell biology of phagocytosis. Annu. Rev. Pathol. *7*, 61–98.

Fleitas Martínez, O., Cardoso, M.H., Ribeiro, S.M., and Franco, O.L. (2019). Recent Advances in Anti-virulence Therapeutic Strategies With a Focus on Dismantling Bacterial Membrane Microdomains, Toxin Neutralization, Quorum-Sensing Interference and Biofilm Inhibition. Front. Cell. Infect. Microbiol. *9,* 74.

Folkesson, A., Jelsbak, L., Yang, L., Johansen, H.K., Ciofu, O., Høiby, N., and Molin, S. (2012). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. Nat. Rev. Microbiol. *10*, 841–851.

Foweraker, J. (2009). Recent advances in the microbiology of respiratory tract infection in cystic fibrosis. Br. Med. Bull. *89*, 93–110.

G

Garcia-Medina, R., Dunne, W.M., Singh, P.K., and Brody, S.L. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* Acquires Biofilm-Like Properties within Airway Epithelial Cells. Infect. Immun. *73*, 8298–8305.

Garrity-Ryan, L., Kazmierczak, B., Kowal, R., Comolli, J., Hauser, A., and Engel, J.N. (2000). The arginine finger domain of ExoT contributes to actin cytoskeleton disruption and inhibition of internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells and macrophages. Infect. Immun. *68*, 7100–7113.

Ghafoor, A., Hay, I.D., and Rehm, B.H.A. (2011). Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. Appl. Environ. Microbiol. *77*, 5238–5246.

Grabenstein, J.P., Fukuto, H.S., Palmer, L.E., and Bliska, J.B. (2006). Characterization of Phagosome Trafficking and Identification of PhoP-Regulated Genes Important for Survival of *Yersinia pestis* in Macrophages. Infect. Immun. *74*, 3727–3741.

Gray, C., Loynes, C.A., Whyte, M.K.B., Crossman, D.C., Renshaw, S.A., and Chico, T.J.A. (2011). Simultaneous intravital imaging of macrophage and neutrophil behaviour during inflammation using a novel transgenic zebrafish. Thromb. Haemost. *105*, 811–819.

Günzel, D., Kucharski, L.M., Kehres, D.G., Romero, M.F., and Maguire, M.E. (2006). The MgtC Virulence Factor of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Activates Na+,K+-ATPase. J. Bacteriol. *188*, 5586–5594.

H

Haggie, P.M., and Verkman, A.S. (2007). Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-independent Phagosomal Acidification in Macrophages. J. Biol. Chem. *282*, 31422–31428.

Hall, C.W., and Mah, T.-F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. FEMS Microbiol. Rev. *41*, 276–301.

Hartl, D., Gaggar, A., Bruscia, E., Hector, A., Marcos, V., Jung, A., Greene, C., McElvaney, G., Mall, M., and Döring, G. (2012). Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. J. Cyst. Fibros. *11*, 363–382.

Hassan, R., El-Naggar, W., Abd El-Aziz, A.M., Shaaban, M., Kenawy, H.I., and Ali, Y.M. (2018). Immunization with outer membrane proteins (OprF and OprI) and flagellin B protects mice from pulmonary infection with mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. J. Microbiol. Immunol. Infect. Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi *51*, 312–320.

Haute Autorité de Santé (2019). Antibiothérapie des infections à entérobactéries et à *Pseudomonas aeruginosa* chez l'adulte : place des carbapénèmes et de leurs alternatives. Saint-Denis La Plaine: HAS.

Hunt, T.A., Kooi, C., Sokol, P.A., and Valvano, M.A. (2004). Identification of *Burkholderia cenocepacia* genes required for bacterial survival in vivo. Infect. Immun. *72*, 4010–4022.

van der Heijden, J., Reynolds, L.A., Deng, W., Mills, A., Scholz, R., Imami, K., Foster, L.J., Duong, F., and Finlay, B.B. (2016). *Salmonella* Rapidly Regulates Membrane Permeability To Survive Oxidative Stress. MBio *7,* e01238-16.

J

Jaouen, T., Dé, E., Chevalier, S., and Orange, N. (2004). Pore size dependence on growth temperature is a common characteristic of the major outer membrane protein OprF in psychrotrophic and mesophilic *Pseudomonas* species. Appl. Environ. Microbiol. *70*, 6665–6669.

Jean-Francois, F.L., Dai, J., Yu, L., Myrick, A., Rubin, E., Fajer, P.G., Song, L., Zhou, H.-X., and Cross, T.A. (2014). Binding of MgtR, a *Salmonella* Transmembrane Regulatory Peptide, to MgtC, a *Mycobacterium tuberculosis* Virulence Factor: A Structural Study. J. Mol. Biol. *426*, 436–446.

Jevtov, I., Samuelsson, T., Yao, G., Amsterdam, A., and Ribbeck, K. (2014). Zebrafish as a model to study live mucus physiology. Sci. Rep. *4*, 1-6.

K

Kanther, M., and Rawls, J.F. (2010). Host-microbe interactions in the developing zebrafish. Curr. Opin. Immunol. *22*, 10–19.

Kelly, C., Jefferies, C., and Cryan, S.-A. (2010). Targeted Liposomal Drug Delivery to Monocytes and Macrophages. Journal of Drug Delivery *2011*, 727241.

Krishnan, S., and Prasadarao, N.V. (2012). Outer membrane protein A and OprF – Versatile roles in Gram-negative bacterial infections. FEBS J. *279*, 919–931.

Kumar, S.S., Tandberg, J.I., Penesyan, A., Elbourne, L.D.H., Suarez-Bosche, N., Don, E., Skadberg, E., Fenaroli, F., Cole, N., Winther-Larsen, H.C., et al. (2018). Dual Transcriptomics of Host-Pathogen Interaction of Cystic Fibrosis Isolate *Pseudomonas aeruginosa* PASS1 With Zebrafish. Front. Cell. Infect. Microbiol. *8*, 406.

L

LaSarre, B., and Federle, M.J. (2013). Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR *77*, 73–111.

Lavigne, J.-P., O'callaghan, D., and Blanc-Potard, A.-B. (2005). Requirement of MgtC for *Brucella suis* intramacrophage growth: a potential mechanism shared by *Salmonella enterica* and *Mycobacterium tuberculosis* for adaptation to a low-Mg2+ environment. Infect. Immun. *73*, 3160–3163.

Lavoie, E.G., Wangdi, T., and Kazmierczak, B.I. (2011). Innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* infection. Microbes Infect. Inst. Pasteur *13*, 1133–1145.

Le Moigne, V., Belon, C., Goulard, C., Accard, G., Bernut, A., Pitard, B., Gaillard, J.-L., Kremer, L., Herrmann, J.-L., and Blanc-Potard, A.-B. (2016). MgtC as a Host-Induced Factor and Vaccine Candidate against *Mycobacterium abscessus* Infection. Infect. Immun. *84*, 2895–2903.

Lee, E.-J., and Groisman, E.A. (2010). An antisense RNA that governs the expression kinetics of a multifunctional virulence gene. Mol. Microbiol. *76*, 1020–1033.

Lee, E.-J., and Groisman, E.A. (2012). Tandem attenuators control expression of the *Salmonella mgtCBR* virulence operon. Mol. Microbiol. *86*, 212–224.

Lee, J.-W., and Lee, E.-J. (2015). Regulation and function of the *Salmonella* MgtC virulence protein. J. Microbiol. *53*, 667–672.

Lee, E.-J., Pontes, M.H., and Groisman, E.A. (2013). A bacterial virulence protein promotes pathogenicity by inhibiting the bacterium's own F1Fo ATP synthase. Cell *154*, 146–156.

Levraud, J.-P., and Boudinot, P. (2009). Arche de Noé immunologique - Le système immunitaire des poissons téléostéens. médecine/sciences *25*, 405–411.

Levraud, J.-P., Disson, O., Kissa, K., Bonne, I., Cossart, P., Herbomel, P., and Lecuit, M. (2009). Real-time observation of listeria monocytogenes-phagocyte interactions in living zebrafish larvae. Infect. Immun. *77*, 3651–3660.

Liao, H., Chen, Y., Li, Y., Xue, S., Liu, M., Lin, Z., Liu, Y., Chan, H.C., Zhang, X., and Sun, H. (2018). CFTR is required for the migration of primordial germ cells during zebrafish early embryogenesis. Reprod. Camb. Engl. *156*, 261–268.

Liu, F., Zhang, Z., Csanády, L., Gadsby, D.C., and Chen, J. (2017). Molecular Structure of the Human CFTR Ion Channel. Cell *169*, 85-95. e8.

López, M., Barbosa, B., Gato, G., Bou, G., and Tomás, M. (2014). Patents on antivirulence therapies. World J. Pharmacol. *3*, 97–109.

Lukacs, G.L., and Verkman, A.S. (2012). CFTR: folding, misfolding and correcting the ΔF508 conformational defect. Trends Mol. Med. *18*, 81–91.

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

M

Maloney, K.E., and Valvano, M.A. (2006). The *mgtC* gene of *Burkholderia cenocepacia* is required for growth under magnesium limitation conditions and intracellular survival in macrophages. Infect. Immun. *74*, 5477–5486.

Martin-Orozco, N., Touret, N., Zaharik, M.L., Park, E., Kopelman, R., Miller, S., Finlay, B.B., Gros, P., and Grinstein, S. (2006). Visualization of vacuolar acidification-induced transcription of genes of pathogens inside macrophages. Mol. Biol. Cell *17*, 498–510.

McCarthy, R.R., Mazon-Moya, M.J., Moscoso, J.A., Hao, Y., Lam, J.S., Bordi, C., Mostowy, S., and Filloux, A. (2017). Cyclic-di-GMP regulates lipopolysaccharide modification and contributes to *Pseudomonas aeruginosa* immune evasion. Nat. Microbiol. *2*, 17027.

McShan, A.C., and De Guzman, R.N. (2015). The Bacterial Type III Secretion System as a Target for Developing New Antibiotics. Chem. Biol. Drug Des. *85*, 30–42.

Mesaros, N., Nordmann, P., Plésiat, P., Roussel-Delvallez, M., Eldere, J.V., Glupczynski, Y., Laethem, Y.V., Jacobs, F., Lebecque, P., Malfroot, A., et al. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* : résistance et options thérapeutiques à l'aube du deuxième millénaire. Antibiotiques : journal des agents anti-infectieux *9*, 189.

Mishra, M., Byrd, M.S., Sergeant, S., Azad, A.K., Parsek, M.R., McPhail, L., Schlesinger, L.S., and Wozniak, D.J. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Psl polysaccharide reduces neutrophil phagocytosis and the oxidative response by limiting complement-mediated opsonization. Cell. Microbiol. *14*, 95–106.

Mishra, M., Ressler, A., Schlesinger, L.S., and Wozniak, D.J. (2015). Identification of OprF as a Complement Component C3 Binding Acceptor Molecule on the Surface of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. *83*, 3006–3014.

Mittal, R., Lisi, C.V., Kumari, H., Grati, M., Blackwelder, P., Yan, D., Jain, C., Mathee, K., Weckwerth, P.H., and Liu, X.Z. (2016a). Otopathogenic *Pseudomonas aeruginosa* Enters and Survives Inside Macrophages. Front. Microbiol. *7,* 1828.

Mittal, R., Grati, M., Yan, D., and Liu, X. (2016b). *Pseudomonas aeruginosa* Activates PKC-Alpha to Invade Middle Ear Epithelial Cells. Front. Microbiol. *7,* 255.

Morales, R.A., and Allende, M.L. (2019). Peripheral Macrophages Promote Tissue Regeneration in Zebrafish by Fine-Tuning the Inflammatory Response. Front. Immunol. *10*, 253.

N

Navis, A., and Bagnat, M. (2015). Loss of *cftr* function leads to pancreatic destruction in larval zebrafish. Dev. Biol. *399*, 237–248.

Navis, A., Marjoram, L., and Bagnat, M. (2013). Cftr controls lumen expansion and function of Kupffer's vesicle in zebrafish. Dev. Camb. Engl. *140*, 1703–1712.

Nestorovich, E.M., Sugawara, E., Nikaido, H., and Bezrukov, S.M. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF: properties of the channel. J. Biol. Chem. *281*, 16230–16237.

Nunes, P., Demaurex, N., and Dinauer, M.C. (2013). Regulation of the NADPH Oxidase and Associated Ion Fluxes During Phagocytosis. Traffic *14*, 1118–1131.

O

Rosas Olvera, M., Garai, P., Mongin, G., Vivès, E., Gannoun-Zaki, L., and Blanc-Potard, A.-B. (2019). Synthetic hydrophobic peptides derived from MgtR weaken *Salmonella* pathogenicity and work with a different mode of action than endogenously produced peptides. Sci. Rep. *9,* 15253.

P

Park, M., Nam, D., Kweon, D.-H., and Shin, D. (2018). ATP reduction by MgtC and Mg^{2+} homeostasis by MgtA and MgtB enables *Salmonella* to accumulate RpoS upon low cytoplasmic Mg^{2+} stress. Mol. Microbiol. *110*, 283–295.

Peri, F., and Nüsslein-Volhard, C. (2008). Live imaging of neuronal degradation by microglia reveals a role for v0-ATPase a1 in phagosomal fusion in vivo. Cell *133*, 916–927.

Phennicie, R.T., Sullivan, M.J., Singer, J.T., Yoder, J.A., and Kim, C.H. (2010). Specific Resistance to *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Zebrafish Is Mediated by the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. Infect. Immun. *78*, 4542–4550.

Pontes, M.H., Lee, E.-J., Choi, J., and Groisman, E.A. (2015). *Salmonella* promotes virulence by repressing cellulose production. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*, 5183–5188.

Pontes, M.H., Yeom, J., and Groisman, E.A. (2016). Reducing ribosome biosynthesis promotes translation during low Mg^{2+} stress. Mol. Cell *64*, 480–492.

Prajsnar, T.K., Cunliffe, V.T., Foster, S.J., and Renshaw, S.A. (2008). A novel vertebrate model of *Staphylococcus aureus* infection reveals phagocyte-dependent resistance of zebrafish to non-host specialized pathogens. Cell. Microbiol. *10*, 2312–2325.

Prost, L.R., and Miller, S.I. (2008). The *Salmonella*e PhoQ sensor: mechanisms of detection of phagosome signals. Cell. Microbiol. *10*, 576–582.

Pujol, C., and Bliska, J.B. (2003). The Ability To Replicate in Macrophages Is Conserved between *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. Infect. Immun. *71*, 5892–5899.

R

Rang, C., Alix, E., Felix, C., Heitz, A., Tasse, L., and Blanc-Potard, A.-B. (2007). Dual role of the MgtC virulence factor in host and non-host environments. Mol. Microbiol. *63*, 605–622.

Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., and El Jaziri, M. (2015). The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. Biomed Res. Int. *2015,* 759348.

Rawls, J.F., Mahowald, M.A., Goodman, A.L., Trent, C.M., and Gordon, J.I. (2007). In vivo imaging and genetic analysis link bacterial motility and symbiosis in the zebrafish gut. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 7622–7627.

Rello, J., Krenn, C.-G., Locker, G., Pilger, E., Madl, C., Balica, L., Dugernier, T., Laterre, P.-F., Spapen, H., Depuydt, P., et al. (2017). A randomized placebo-controlled phase II study of a *Pseudomonas vaccine* in ventilated ICU patients. Crit. Care Lond. Engl. *21*, 22.

Renshaw, S.A., and Trede, N.S. (2012). A model 450 million years in the making: zebrafish and vertebrate immunity. Dis. Model. Mech. *5*, 38–47.

Retamal, P., Castillo-Ruiz, M., and Mora, G.C. (2009). Characterization of MgtC, a virulence factor of *Salmonella enterica* serovar Typhi. PloS One *4*, e5551.

Rocker, A.J., Weiss, A.R.E., Lam, J.S., Van Raay, T.J., and Khursigara, C.M. (2015). Visualizing and quantifying *Pseudomonas aeruginosa* infection in the hindbrain ventricle of zebrafish using confocal laser scanning microscopy. J. Microbiol. Methods *117*, 85–94.

Rommens, J.M., Iannuzzi, M.C., Kerem, B., Drumm, M.L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J.L., Kennedy, D., and Hidaka, N. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. Science *245*, 1059–1065.

van Rooijen, N., and Hendrikx, E. (2010). Liposomes for specific depletion of macrophages from organs and tissues. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *605*, 189–203.

Rosas Olvera, M. (2018). KdpF et MgtR : deux peptides membranaires régulateurs de la virulence chez les mycobactéries et salmonelles. Université de Montpellier: thèse de doctorat, Biologie Santé, sous la direction de Zaki-Gannoun, L.

S

Sana, T.G., Hachani, A., Bucior, I., Soscia, C., Garvis, S., Termine, E., Engel, J., Filloux, A., and 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.

Sanderson, L.E., Chien, A.-T., Astin, J.W., Crosier, K.E., Crosier, P.S., and Hall, C.J. (2015). An inducible transgene reports activation of macrophages in live zebrafish larvae. Dev. Comp. Immunol. *53*, 63–69.

Santé publique France (2019). Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, mai-juin 2017. Saint-Maurice : SpF. 270 p. Disponible à partir de l'URL : www.santepubliquefrance.fr

van der Sar, A.M., Musters, R.J.P., van Eeden, F.J.M., Appelmelk, B.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., and Bitter, W. (2003). Zebrafish embryos as a model host for the real time analysis of *Salmonella* Typhimurium infections. Cell. Microbiol. *5*, 601–611.

Schertzer, J.W., and Whiteley, M. (2012). A bilayer-couple model of bacterial outer membrane vesicle biogenesis. MBio *3*, e00297-11.

Schimpff, S.C. (1993). Gram-negative bacteremia. Support. Care Cancer Off. J. Multinatl. Assoc. Support. Care Cancer *1*, 5–18.

Schwechheimer, C., and Kuehn, M.J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. Nat. Rev. Microbiol. *13*, 605–619.

Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A.C., Levy, S.B., and Jackson, R.W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. FEMS Microbiol. Rev. *35*, 652–680.

Simonin-Le Jeune, K., Le Jeune, A., Jouneau, S., Belleguic, C., Roux, P.-F., Jaguin, M., Dimanche-Boitre, M.-T., Lecureur, V., Leclercq, C., Desrues, B., et al. (2013). Impaired functions of macrophage from cystic fibrosis patients: CD11b, TLR-5 decrease and sCD14, inflammatory cytokines increase. PloS One *8*, e75667.

Snavely, M.D., Miller, C.G., and Maguire, M.E. (1991). The mgtB Mg^{2+} transport locus of *Salmonella* Typhimurium encodes a P-type ATPase. J. Biol. Chem. *266*, 815–823.

Société Française de Microbiologie. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*. SFM. Disponible à partir de l'URL : www.sfm-microbiologie.org › 2019/07 › BACTERIE_Pseudomonas

Soncini, F.C., García Véscovi, E., Solomon, F., and Groisman, E.A. (1996). Molecular basis of the magnesium deprivation response in *Salmonella* Typhimurium: identification of PhoP-regulated genes. J. Bacteriol. *178*, 5092–5099.

Sriramulu, D.D., Lünsdorf, H., Lam, J.S., and Römling, U. (2005). Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. J. Med. Microbiol. *54*, 667–676.

Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., and Singer, F. (1981). Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). Nature *291*, 293–296.

Sugawara, E., Nestorovich, E.M., Bezrukov, S.M., and Nikaido, H. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* Porin OprF Exists in Two Different Conformations. J. Biol. Chem. *281*, 16220–16229.

Sun, H., Wang, Y., Zhang, J., Chen, Y., Liu, Y., Lin, Z., Liu, M., Sheng, K., Liao, H., Tsang, K.S., et al. (2018). CFTR mutation enhances Dishevelled degradation and results in impairment of Wnt-dependent hematopoiesis. Cell Death Dis. *9*(3), 275.

T

Torraca, V., and Mostowy, S. (2018). Zebrafish Infection: From Pathogenesis to Cell Biology. Trends Cell Biol. *28*, 143–156.

Tran, S.-L., and Ramarao, N. (2013). *Bacillus cereus* immune escape: a journey within macrophages. FEMS Microbiol. Lett. *347*, 1–6.

Tseng, B.S., Reichhardt, C., Merrihew, G.E., Araujo-Hernandez, S.A., Harrison, J.J., MacCoss, M.J., and Parsek, M.R. (2018). A Biofilm Matrix-Associated Protease Inhibitor Protects *Pseudomonas aeruginosa* from Proteolytic Attack. MBio *9,* e00543-18.

Tucker, B., and Lardelli, M. (2007). A rapid apoptosis assay measuring relative acridine orange fluorescence in zebrafish embryos. Zebrafish *4*, 113–116.

Turner, K.H., Everett, J., Trivedi, U., Rumbaugh, K.P., and Whiteley, M. (2014). Requirements for *Pseudomonas aeruginosa* Acute Burn and Chronic Surgical Wound Infection. PLoS Genet. *10,* e1004518.

V

Vergunst, A.C., Meijer, A.H., Renshaw, S.A., and O'Callaghan, D. (2010). *Burkholderia cenocepacia* creates an intramacrophage replication niche in zebrafish embryos, followed by bacterial dissemination and establishment of systemic infection. Infect. Immun. *78*, 1495–1508.

Vieira, O.V., Botelho, R.J., and Grinstein, S. (2002). Phagosome maturation: aging gracefully. Biochem. J. *366*, 689–704.

W

Walters, R.F.S., and DeGrado, W.F. (2006). Helix-packing motifs in membrane proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. *103*, 13658–13663.

Walton, E.M., Cronan, M.R., Beerman, R.W., and Tobin, D.M. (2015). The Macrophage-Specific Promoter *mfap4* Allows Live, Long-Term Analysis of Macrophage Behavior during Mycobacterial Infection in Zebrafish. PLOS ONE *10*, e0138949.

Wassing, G.M., Bergman, P., Lindbom, L., and van der Does, A.M. (2015). Complexity of antimicrobial peptide regulation during pathogen–host interactions. Int. J. Antimicrob. Agents *45*, 447–454.

Welsh, M.J., and Smith, A.E. (1993). Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. Cell *73*, 1251–1254.

Wessel, A.K., Liew, J., Kwon, T., Marcotte, E.M., and Whiteley, M. (2013). Role of *Pseudomonas aeruginosa* Peptidoglycan-Associated Outer Membrane Proteins in Vesicle Formation. J. Bacteriol. *195*, 213–219.

Williams, P., and Cámara, M. (2009). Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. Curr. Opin. Microbiol. *12*, 182–191.

Williams, B.J., Dehnbostel, J., and Blackwell, T.S. (2010). *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. Respirol. Carlton Vic *15*, 1037–1056.

Wilson, G.B., and Fudenberg, H.H. (1982). Does a primary host defense abnormality involving monocytes-macrophages underlie the pathogenesis of lung disease in cystic fibrosis? Med. Hypotheses *8*, 527–542.

World Health Organization. (2017). Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. Geneva. WHO Press p. 1-7.

Y

Yang, Y., Labesse, G., Carrère-Kremer, S., Esteves, K., Kremer, L., Cohen-Gonsaud, M., and Blanc-Potard, A.-B. (2012). The C-Terminal Domain of the Virulence Factor MgtC Is a Divergent ACT Domain. J. Bacteriol. *194*, 6255–6263.

Yeom, J., Pontes, M.H., Choi, J., and Groisman, E.A. (2018). A protein that controls the onset of a *Salmonella* virulence program. EMBO J. *37*, e96977.

Yoon, S.S., Hennigan, R.F., Hilliard, G.M., Ochsner, U.A., Parvatiyar, K., Kamani, M.C., Allen, H.L., DeKievit, T.R., Gardner, P.R., Schwab, U., et al. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. Dev. Cell *3*, 593–603.

Z

Zavala, K., Vazirnia, A., and Liu, P.T. (2018). Chapter 105 - Vitamin D and Innate Immunity. In Vitamin D (Fourth Edition), D. Feldman, ed. (Academic Press), 951–967.

Zhang, S., and Cui, P. (2014). Complement system in zebrafish. Dev. Comp. Immunol. *46*, 3–10.

Zhang, Z., and Chen, J. (2016). Atomic Structure of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. Cell *167*, 1586-1597.e9.

Zhang, Y., Li, X., Grassmé, H., Döring, G., and Gulbins, E. (2010). Alterations in Ceramide Concentration and pH Determine the Release of Reactive Oxygen Species by Cftr-Deficient Macrophages on Infection. J. Immunol. *184*, 5104–5111.

Résumé

Pseudomonas aeruginosa, fait partie des bactéries pathogènes classées par l'OMS «hautement prioritaires», résistantes aux antibiotiques et pour lesquelles il est urgent d'identifier de nouveaux moyens de lutte. *P. aeruginosa*, responsable d'infections aiguës ou chroniques, est impliqué dans des infections nosocomiales et est également le principal pathogène responsable de la morbidité et la mortalité des patients atteints de mucoviscidose, maladie génétique à transmission récessive, liée à des mutations du gène *cftr*. Le macrophage est en première ligne de la défense immunitaire innée. Le rôle dans l'infection de la capacité de *P. aeruginosa* à résister à l'action bactéricide des macrophages est un aspect mal connu, que ce soit dans le contexte de la mucoviscidose ou pas. Des facteurs de virulence comme MgtC et OprF, ont récemment été identifiés comme important dans la survie intramacrophagique de *P. aeruginosa.* Notre projet a pour objectif principal de mieux comprendre le rôle de ces facteurs dans l'établissement de l'infection à *P. aeruginosa,* de tester la contribution du canal CFTR à ce niveau, et de développer une stratégie thérapeutique innovante. L'intérêt étant de mieux contrôler l'infection, nous proposons de développer une nouvelle stratégie, en complément de l'antibiothérapie, qui vise à limiter la capacité de *P. aeruginosa* à survivre dans le macrophage. Cette approche se base sur la cible MgtC et un inhibiteur naturel MgtR. Nous avons testé ici pour la première fois, l'effet d'un peptide synthétique MgtR sur *P. aeruginosa*. MgtR réduit la survie bactérienne dans les macrophages, via son effet sur la protéine MgtC, validant ainsi, l'effet biologique du peptide synthétique. Cette approche antivirulence est couplée à une approche structurale, afin de caractériser l'interaction MgtC/MgtR d'un point de vue moléculaire et d'étudier l'effet de MgtR sur la dimérisation de MgtC. Ceci pourrait permettre *in fine* d'optimiser le peptide MgtR afin de pouvoir le tester dans un modèle animal (des études préliminaires dans l'embryon de poisson-zèbre s'étant avérées infructueuses). J'ai de plus contribué à une étude visant à caractériser les facteurs bactériens de *P. aeruginosa* impliqués dans le stade intramacrophagique. Ces travaux ont montré l'implication de MgtC et OprF dans l'expression du SST3, lui-même responsable d'un phénomène de lyse des macrophages par les bactéries intracellulaires. L'utilisation du mutant *oprF* comme « indicateur » du rôle intramacrophagique *in vivo,* nous a permis de montrer l'importance de l'action bactéricide du macrophage (e.g. l'acidification du phagosome) dans le contrôle de l'infection à *P. aeruginosa*, dans des macrophages en culture et dans l'embryon de poisson-zèbre. Ce modèle vertébré est pertinent non seulement pour l'étude de l'infection à *P. aeruginosa*, mais également pour l'implication du CFTR. Les embryons *cftr*-/- semblent être particulièrement susceptibles à l'infection par *P. aeruginosa*, et ce modèle pourrait permettre de déterminer la contribution spécifique du CFTR à l'action bactéricide du macrophage. En conclusion, une meilleure compréhension de la phase intramacrophagique de *P. aeruginosa* et des facteurs bactériens impliqués, pourraient permettre de mieux contrôler l'infection à *P. aeruginosa*.

Mots-clés: *Pseudomona aeruginosa* – Macrophages – Peptide antivirulence – MgtC – OprF – *Danio rerio*

Abstract

The increased number of antibiotic-resistant bacteria is a real challenge for medical research. WHO has published a list of very high priority pathogens, which includes Pseudomonas aeruginosa, a bacterium responsible for acute and chronic infections. P. aeruginosa is involved in nosocomial infections and is also the main pathogen responsible of the morbidity and mortality of patients with cystic fibrosis, a genetic disorder caused by mutations in the cftr gene. The macrophage is in the first line of the innate immune defense. The role during infection of the ability of P. aeruginosa to resist to the bactericidal action of macrophages is poorly understood, both in the context of cystic fibrosis or in normal conditions. Virulence factors such as MgtC and OprF have been recently identified as important in the intramacrophage survival of P. aeruginosa. The main objective of our project is to better understand the role of these factors in the establishment of P. aeruginosa infection, to test the contribution of the CFTR channel at this stage, and to develop innovative therapeutic strategy. Since it is important to better control the infection, we propose here to develop a new strategy, in addition to antibiotic therapy, which aims to limit the ability of P. aeruginosa to survive within macrophages. This approach is based on the MgtC target and a natural MgtR inhibitor. We have tested for the first time the effect of MgtR synthetic peptide on P. aeruginosa. MgtR reduces bacterial survival in macrophages, through its action on the MgtC protein, thus validating the biological effect of the synthetic peptide. This antivirulence strategy is combined with a structural approach, to characterize the MgtC/MgtR interaction from a molecular point of view and to study the effect of MgtR on MgtC dimerization. This could ultimately lead to optimize the MgtR peptide in order to test it in an animal model (preliminary studies in the embryo of zebrafish were inconclusive). In addition, I contributed in a study to characterize the bacterial factors involved in the intramacrophage stage of P. aeruginosa. This work revealed the involvement of MgtC and OprF in the expression of the T3SS, itself responsible for a lysis of macrophages by intracellular bacteria. The use of oprF mutant as an "indicator" of the intramacrophage role in vivo, allowed us to show the importance of bactericidal action of macrophage (e.g. phagosomal acidification) in the control of P. aeruginosa infection, both in cultured macrophages and in zebrafish embryo. This vertebrate model is relevant for the study of P. aeruginosa infection, but also for the involvement of CFTR. cftr-/- embryos appear to be highly susceptible to P. aeruginosa infection, and this model could determine the specific contribution of CFTR to the bactericidal action of macrophage. In conclusion, a better understanding of the intramacrophage stage of P. aeruginosa and the bacterial factors involved, may provide a better control of P. aeruginosa infection.