



HAL
open science

Identification d'une nouvelle protéine eucaryote essentielle pour la localisation membranaire de la toxine ExoU de *Pseudomonas aeruginosa*

Vincent Deruelle

► To cite this version:

Vincent Deruelle. Identification d'une nouvelle protéine eucaryote essentielle pour la localisation membranaire de la toxine ExoU de *Pseudomonas aeruginosa*. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2020. Français. NNT : 2020GRALV030 . tel-03172175

HAL Id: tel-03172175

<https://theses.hal.science/tel-03172175>

Submitted on 17 Mar 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'UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Vincent Deruelle

Thèse dirigée par **Philippe HUBER**

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

Identification d'une nouvelle protéine eucaryote essentielle pour la localisation membranaire de la toxine **ExoU** de *Pseudomonas aeruginosa*

Thèse soutenue publiquement le **10 novembre 2020**,
devant le jury composé de :

Madame, Isabelle TARDIEUX

Directrice de Recherche, Institut for Advanced BioSciences (IAB), Présidente
du jury

Monsieur Matteo BONAZZI

Directeur de Recherche, Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier
(IRIM), Rapporteur

Monsieur Laurent DORTET

Maître de conférences des universités – praticien hospitalier, CHU de Bicêtre,
Rapporteur

Monsieur Thomas HENRY

Directeur de Recherche, Centre International de Recherche en Infectiologie
(CIRI), Examineur

Monsieur Étienne MEUNIER

Chargé de Recherche, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale
(IPBS), Examineur

Monsieur Philippe HUBER

Directeur de Recherche, CEA Grenoble, Directeur de thèse



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer mon travail : M. Matteo Bonazzi et M. Laurent Dortet en tant que rapporteurs de ce manuscrit et Mme Isabelle Tardieux, M. Thomas Henry et M. Etienne Meunier en tant qu'examineurs. J'adresse des remerciements additionnels à M. Thomas Henry pour son implication lors de mes comités de suivi individuel, ainsi qu'à Mme Corinne Mercier, pour la même raison. Pendant ma thèse vous m'avez fait part de votre expérience et vous m'avez conseillé sur les pistes à privilégier.

Je tiens ensuite à adresser plusieurs remerciements à Philippe Huber, mon directeur de thèse. Avant tout, merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir confié ce projet passionnant, alors même qu'on ne se connaissait pas encore ! Merci aussi pour ton encadrement exemplaire. Tu as toujours su me consacrer du temps quand j'en avais besoin et tes connaissances sur le sujet m'ont permis d'avancer dans la bonne direction. Enfin tes qualités humaines, tes conseils avisés, ta disponibilité lors de nos sorties et tes « comment s'est passé ton week-end », font que j'ai eu beaucoup de chance de réaliser ma thèse avec toi. Bon courage pour la suite !!!

J'adresse aussi de sincères remerciements à Stéphanie Bouillot. J'ai énormément appris à tes côtés, notamment la microscopie et l'analyse d'images. Je crois d'ailleurs que tu m'as transmis ta passion pour les belles images de microscopie. Tes conseils et ta sympathie ont été des alliés précieux qui ont rendu cette thèse agréable. J'ai aussi beaucoup apprécié nos discussions dans le bureau et dans le labo, pour parler de choses et d'autres.

Merci aussi à chacun des membres de l'équipe PBRC. Vous avez, chacun à votre manière, participé à ma bonne intégration au sein du groupe. Plus qu'une équipe, vous êtes un groupe qui partage une passion commune pour *Pseudomonas aeruginosa* mais aussi pour les activités de cohésion. Grâce à vous j'ai fait des raquettes, du ski de randonnée, la Via ferrata de Grenoble et plein d'autres sorties. J'aimerais remercier plus particulièrement Ina, Peter et François. Ina pour ta disponibilité et tes conseils avisés sur le projet. Peter, pour ta présence et ta bonne

humeur tout simplement. Enfin François, merci pour nos discussions passionnantes et les footings, qui m'ont permis de rester en forme physiquement.

Je souhaite également remercier l'équipe Gene&Chem, en particulier, Emmanuel Taillebourg et Marie-Odile Fauvarque, pour leurs expertises et leur aide dans la mise en place du modèle *in vivo* chez *Drosophila melanogaster*, ainsi que pour leurs remarques et leurs conseils lors de mes présentations. Merci également à Agnès Journet pour la réalisation et l'analyse du test HTRF.

Je tiens, de la même manière, à exprimer ma gratitude envers Emmanuelle Soleilhac de la plateforme CMBA et Odile Fihol-Cochet de l'équipe IMAC, pour m'avoir tant arrangé au niveau du planning de l'Incucyte, lors de mes expériences d'infection. J'ai ainsi pu mener mes expériences sereinement.

Un énorme merci aux deux « lascars » Julian et Stéphane ainsi qu'à Manon. Ça a été un réel plaisir de passer ces trois années avec vous. Vous êtes extraordinaires ! Nos discussions, nos sorties aux bars, nos randonnées et nos week-ends ont été des moments importants durant cette période, qui m'ont permis d'apprécier cette thèse et la vie grenobloise. On a passé tellement de bons moments ensemble. J'ai tellement hâte de vous revoir, au QG ou ailleurs, pour de nouvelles aventures !!!

Je voudrai aussi remercier Marie, Mathieu, Silvia, Mathilde, Bryan, Pierre, Angélica et Stéphanie, membres de l'organisation du Forum BIOTechno AuRA 2019, mais avant tout des amis avec qui j'ai eu plaisir à discuter et à travailler.

Amandine, je te suis aussi reconnaissant pour ton soutien pendant cette période et ta compréhension lors des moments où j'étais trop peu disponible pour toi.

Enfin, je voudrais adresser un énorme merci à ma famille. Vous avez toujours été là pour me soutenir et m'encourager dans mes choix, même si ceux-ci impliqués un éloignement géographique. Nos appels constants, nos soirées visio-apéro pendant le confinement et vos visites sur Grenoble, ont été des bouffées d'oxygène. Sans vous et vos encouragements, je ne serais tout simplement pas en train d'écrire ces lignes.

Merci à tous !!! Grâce à vous, cette thèse s'est passée dans d'excellentes conditions.

Avant-propos

Ce mémoire rend compte du travail que j'ai effectué au cours de mes trois années de thèse, dans le but d'obtenir le diplôme de Docteur de l'Université Grenoble-Alpes.

L'idée d'effectuer une thèse et de me lancer dans un examen approfondi d'un sujet d'étude ne m'est pas venue immédiatement. Cela a d'abord été le fruit d'un intérêt pour le domaine de la santé, puis d'une passion pour la recherche fondamentale, passion qui s'est alors confirmée au cours de mes stages et qui m'a poussé à continuer dans ce chemin, en particulier celui de l'interaction hôte-pathogène.

Au cours de mes études pour devenir Ingénieur en Biotechnologie de la Santé, j'ai ainsi souhaité effectuer des stages dans des équipes de recherche, afin de confirmer mon attrait pour ce domaine. J'ai eu la chance de pouvoir effectuer un premier stage de trois mois dans l'équipe de Françoise Jacob-Dubuisson, à l'Institut Pasteur de Lille. J'ai travaillé sur un système de transduction de signal à deux composants de *Bordetella pertussis*, le système BvgAS. Ce système est impliqué dans la régulation de l'expression des facteurs de virulence de la bactérie. Par des approches de mutagenèse dirigée, mon objectif était de caractériser l'activité phosphatase de la protéine BvgS.

Puis, afin d'élargir mes horizons et d'en apprendre davantage sur les pathogènes, j'ai intégré, au cours de mon stage de fin d'étude, l'équipe de Raffaella Iantomasi au sein de Sanofi Pasteur. Mon sujet de stage visait à documenter l'expression et la régulation de gènes impliqués dans la synthèse d'un facteur de virulence de *Staphylococcus aureus*, lui permettant notamment, d'échapper au système immunitaire. J'ai alors pris goût au travail de recherche et eu l'opportunité de travailler ensuite chez Sanofi, dans une l'équipe de la plateforme NGS, dirigée par Émilie Lessoud. Cette année passée à étudier l'expression des gènes de *Pseudomonas aeruginosa* à partir d'échantillons de patients infectés, ainsi que ceux de *S. aureus* lors de la formation de biofilm sur des cathéters, m'a donné envie d'aller plus loin. En particulier, je cherchais à revenir sur les étapes qui précèdent et déclenchent l'infection chez les patients, pour pouvoir mieux lutter contre ces pathogènes.

C'est donc dans ce contexte que j'ai contacté Ina Attrée, qui dirige l'équipe PBRC (Pathogénèse

Bactérienne et Réponses Cellulaires). J'ai alors pu discuter avec Philippe Huber qui m'a exposé un projet de thèse pour lequel il avait un financement FRM (Fondation pour la Recherche Médicale). Ce projet consistait à identifier le récepteur cellulaire de la toxine porogène ExlA, découverte en 2010 par l'équipe, chez des souches de *P. aeruginosa* ne possédant pas le système de sécrétion de type 3. Pour identifier ce récepteur, un crible génétique utilisant le système CRISPR-Cas9 a été utilisé. En parallèle, cette même technique a été utilisée sur une autre toxine nécrosante de *P. aeruginosa*, la toxine ExoU, dans le but d'identifier de nouveaux cofacteurs eucaryotes pour cette toxine. Bien que plusieurs protéines aient été identifiées comme probablement essentielles pour l'activité d'ExlA, aucune n'a pu être confirmée. A l'inverse une seule protéine a été identifiée pour le crible ExoU et confirmée. Mon projet de thèse s'est donc rapidement recentré sur cette protéine et son implication dans le mécanisme d'action de la toxine ExoU, toxine la plus virulente de *P. aeruginosa*.

Ainsi, dans ce mémoire de thèse, je dresse dans un premier temps le contexte scientifique de l'étude à travers trois chapitres d'introduction. Le premier décrit la bactérie *P. aeruginosa* et les infections qu'elle provoque, tandis que dans le deuxième, je détaille ses différents facteurs de virulence, notamment le système de sécrétion de type 3. Dans le dernier chapitre, j'aborde la toxine ExoU et l'état de l'art concernant son mécanisme d'action. Le travail réalisé au cours de ma thèse sur cette toxine est présenté dans la section « **Résultats - Chapitre 1** » avec l'article scientifique que nous avons soumis ainsi qu'une discussion.

Dans l'ensemble, mes travaux de thèse apportent une meilleure compréhension du mécanisme d'action de la toxine ExoU au cours de l'infection. Cette étude se veut être une contribution devant permettre, à terme, de déboucher sur une thérapie adjuvante lors d'infections par cette bactérie multi-résistante aux antibiotiques.

Même si mon étude s'est focalisée sur la toxine ExoU, j'ai néanmoins toujours gardé un lien avec la toxine ExlA. D'une part j'ai participé à un projet au sein de l'équipe pour comprendre l'activation de l'inflammasome par ExlA et ses effets négatifs sur un modèle d'infection murin. D'autre part, j'ai pris en charge le développement d'un test ELISA pour détecter et quantifier la toxine ExlA dans des milieux biologiques. J'expose ce dernier projet dans la section « **Résultats - Chapitres 3** ». Le chapitre 2 étant consacré à l'étude des gènes identifiés lors du criblage avec la toxine ExlA.

Table des matières

REMERCIEMENTS	1
AVANT-PROPOS	3
TABLE DES MATIERES	5
LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLEAUX	11
ABBREVIATIONS	13
INTRODUCTION	15
Chapitre 1: Présentation de l'espèce <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
A- Caractéristiques du genre <i>Pseudomonas</i>	17
B- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , un pathogène opportuniste qui s'adapte à son milieu	19
C- Mode de vie de <i>P. aeruginosa</i>	20
D- Les infections à <i>P. aeruginosa</i>	21
1- Les sites d'infection à <i>P. aeruginosa</i> et les facteurs de risques associés.....	21
2- Les infections nosocomiales	23
3- Les infections aigües	24
i- Les pneumonies.....	24
ii- Infections des voies urinaires	25
iii- Bactériémie	25
iv- Autres infections aigües	26
4- Les infections chroniques	26
i- Infection des patients atteints de mucoviscidose.....	27
ii- Autres infections chroniques causées par <i>P. aeruginosa</i>	28
5- La résistance aux antibiotiques.....	29
E- Déclenchement du système immunitaire par <i>P. aeruginosa</i>	31
Chapitre 2 : Les facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i>	33
A- Le flagelle	34
1- Structure du flagelle.....	34
2- Importance du flagelle dans la mobilité.....	35
3- Importance du flagelle dans l'infection	35
B- Les pili de type IV	36
1- Structure des pili de type IV	37
2- Importance des pili de type IV dans la mobilité.....	38
3- Importance des pili au cours de l'infection.....	39
C- Le système de sécrétion de type 2.....	40

1-	Structure du SST2.....	40
2-	Les principaux effecteurs du SST2 de type Xcp.....	41
i-	La protéase LasB.....	41
ii-	La protéase LasA.....	42
iii-	L'exotoxine A ou ToxA.....	42
iv-	Les phospholipases C.....	42
3-	Importance du SST2 au cours de l'infection.....	43
D-	Le système de sécrétion de type 3.....	43
1-	Structure du SST3.....	44
2-	Le contrôle de l'expression du SST3.....	45
3-	Les effecteurs du SST3.....	45
i-	ExoU.....	47
ii-	ExoS.....	47
iii-	ExoT.....	49
iv-	ExoY.....	50
4-	Importance du SST3 au cours de l'infection.....	51
E-	Les autres systèmes de sécrétion.....	52
1-	Le système de sécrétion de type 1.....	52
2-	Le système de sécrétion de type 5.....	52
3-	Le système de sécrétion de type 6.....	53
F-	Les autres facteurs de virulence.....	54
1-	Les lipopolysaccharides.....	54
2-	Les chromophores.....	54
3-	Les rhamnolipides.....	55
G-	Coordination des facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i> au cours d'une infection.....	55
1-	Investigation et colonisation des surfaces grâce au flagelle et aux pili de type 4.....	55
2-	Coopération des facteurs de virulence pour la traversée des barrières tissulaires.....	57
Chapitre 3: ExoU et ses cofacteurs eucaryotes.....		59
A-	ExoU est une phospholipase A2 bactérienne.....	59
1-	Les différents domaines de la toxine.....	59
2-	Le complexe ExoU-SpcU avant l'injection de la toxine dans les cellules.....	61
3-	Similarités entre le domaine PLP d'ExoU et celui des PLA2 eucaryotes.....	61
i-	Les différentes PLA2 eucaryotes.....	61
ii-	Homologies entre ExoU et les cPLA2 et iPLA2 eucaryotes.....	62
B-	Interaction d'ExoU avec le PIP2 et activation du domaine catalytique.....	64
1-	Présentation du PIP2.....	64
2-	Le PIP2 interagit avec ExoU et permet d'activer son activité phospholipase.....	65
3-	Le domaine C-terminal d'ExoU interagit avec le PIP2 et permet de localiser la toxine à la membrane plasmique.....	66
4-	Changements conformationnels permettant l'activité cytotoxique d'ExoU.....	68
C-	Oligomérisation de la toxine dans les cellules eucaryotes.....	69
D-	Interaction d'ExoU avec l'ubiquitine et les protéines ubiquitinylées.....	70
E-	Importance d'ExoU au cours de l'infection.....	72
1-	Induction de la réponse inflammatoire de l'hôte par ExoU.....	72
2-	Conséquences de l'intoxication des cellules hôtes par ExoU.....	74
F-	Inhibiteurs d'ExoU.....	75
G-	Homologues d'ExoU.....	78

RESULTATS 81

Chapitre 1: ExoU exploite le trafic vésiculaire dirigé par DNAJC5 pour se localiser à la membrane plasmique 83

A- Introduction.....	83
1- Présentation de la protéine DNAJC5.....	84
2- Rôle de DNAJC5 dans l'activité d'ExoU.....	86
B- Publication.....	87
C- Résultats complémentaires.....	133
1- Interaction entre ExoU et DNAJC5.....	133
i- Co-immunoprécipitation entre les deux protéines.....	133
ii- Visualisation par la technique HTRF.....	135
iii- Docking possible entre DNAJC5 _{Nter} et ExoU.....	137
iv- Gel filtration et « pull-down » avec DNAJC5 et ExoU.....	139
2- Implication du domaine Cter d'ExoU dans l'interaction avec les vésicules.....	143
3- Rôle de DNAJC5 dans l'ubiquitylation d'ExoU.....	144
4- Conclusion.....	145

Chapitre 2: Identification du récepteur cellulaire d'ExlA 147

A- Introduction.....	147
B- Identification des ARNg surreprésentés suite à des infections avec une souche ExlA ⁺	148
C- Mutation des gènes codant pour les récepteurs potentiels d'ExlA.....	150
D- Conclusion.....	151

Chapitre 3: Développement d'un test ELISA pour la détection d'ExlA..... 153

A- Introduction.....	153
B- Présentation du test ELISA en sandwich.....	154
C- Expériences préliminaires avec les anticorps polyclonaux.....	155
D- Test ELISA avec des échantillons <i>in vitro</i>	156
E- Test ELISA avec des échantillons <i>in vivo</i>	157
F- Conclusion.....	159

DISCUSSION GENERALE 161

A- Le rôle joué par DNAJC5 dans le mécanisme d'activation d'ExoU.....	163
B- Vers une meilleure compréhension du mécanisme d'action d'ExlA.....	165

MATERIELS & METHODES 167

Chapitre 1: Interaction entre ExoU et DNAJC5 169

A- Construction de la souche exprimant la toxine ExoU-HA.....	169
B- Sécrétome bactérien avec induction du SST3.....	170
C- Co-immunoprécipitation.....	170
D- Production des protéines recombinantes.....	171
E- Chromatographie d'exclusion.....	172
F- Pull-down avec les protéines exprimées séparément.....	172
G- Pull-down avec les protéines co-exprimées.....	173
H- Test HTRF pour quantifier l'interaction entre ExoU et DNAJC5.....	173
1- Préparation des contrôles.....	173

2-	Préparation des échantillons testés	173
3-	Évaluation de l'interaction entre les protéines.....	174
Chapitre 2: Criblage avec la toxine ExlA.....		175
A-	Infection des cellules A549-CRISPR avec ExlA.....	175
B-	Extraction, séquençage et analyse d'ADN génomique.....	176
C-	Inhibition des gènes sélectionnés.....	177
1-	ARNg ciblant les gènes identifiés.....	177
2-	Préparation des particules lentivirales contenant les ARNg.....	178
D-	Production de cellules déficientes pour les gènes d'intérêt	179
E-	Test de cytotoxicité des cellules mutées	179
Chapitre 3: Protocoles pour le test ELISA		181
A-	ELISA direct avec les anticorps polyclonaux	181
B-	ELISA en sandwich avec les anticorps polyclonaux et monoclonaux.....	181
C-	Caractéristiques des expectorats de patients infectés.....	182
ANNEXES		183
Annexe 1: Liste des participations à des événements scientifiques.....		185
Annexe 2: Poster présenté à la 12 ^{ème} journée scientifique de l'IBS - Juin 2019 (Grenoble).		186
Annexe 3: Résumé pour la présentation du poster lors de la JAD de l'EDCSV – Juin 2019 (Grenoble)		188
Annexe 4: Communication orale lors du « Mini-Colloque Pseudomonas 2019 » - Septembre 2019 (Voiron).....		189
Annexe 5: Article présentant l'activation de l'inflammasome par ExlA.....		190
BIBLIOGRAPHIE		209

Liste des Figures

Figure 1: Niches environnementales occupées par le genre <i>Pseudomonas</i> mettant en évidence la large distribution de ces espèces	18
Figure 2: Cycle de vie du biofilm de <i>P. aeruginosa</i>	21
Figure 3: Prévalence des micro-organismes respiratoires, retrouvés chez les patients atteints de mucoviscidose et regroupés par âge.....	28
Figure 4: Activation de la réponse immunitaire innée face à une infection par <i>P. aeruginosa</i>	32
Figure 5: Les facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i>	33
Figure 6: Flagelle des bactéries à Gram négatif	34
Figure 7: Pili de type IV de <i>P. aeruginosa</i>	38
Figure 8: Représentation schématique du SST2 chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
Figure 9: Le système de sécrétion de type 3 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
Figure 10: Arbre phylogénétique représentant la population d'isolats de <i>P. aeruginosa</i>	46
Figure 11: Interaction entre ExoS et une protéine 14-3-3	48
Figure 12: Modèle d'interaction entre ExoY et la F-actine	51
Figure 13: Modèle « Touch-Seed-and-Go » mettant en avant la coopération du flagelle et les pili de type IV pour la colonisation de surface par <i>P. aeruginosa</i>	56
Figure 14: Structure du gène <i>exoU</i> et de la protéine ExoU.....	61
Figure 15: Hydrolyse d'un lipide membranaire en position sn-2 par une PLA2	62
Figure 16: Alignement des domaines phospholipases A2 de type patatine, retrouvés dans la toxine ExoU de <i>P. aeruginosa</i> et dans les iPLA2 et cPLA2 humaines ainsi que dans les patatines végétales	63
Figure 17: Localisation et structure du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate	65
Figure 18: Le domaine MLD d'ExoU interagit avec le PIP2.....	67
Figure 19: Représentation schématique de l'association d'ExoU avec la membrane plasmique et des changements conformationnels résultants	69
Figure 20: Interaction entre ExoU et l'ubiquitine	71
Figure 21: Activation des voies de signalisation eucaryote par ExoU.....	73
Figure 22: Molécules inhibitrices de l'activité d'ExoU	76

Figure 23: Nouvelles molécules susceptibles d'inhiber la toxicité d'ExoU	77
Figure 24: Voie de sécrétion MAPS.....	85
Figure 25: Représentation schématique de la protéine DNAJC5 (CSP α) humaine	85
Figure 26 : Exocytose de molécules contenues dans une vésicule, par le complexe VAMP2/SNAP25.....	86
Figure 27 : Sécrétion d'ExoU-HA par le mutant CHA Δ ST contenant le plasmide pUCP-exoU ^{S142A} -HA.....	134
Figure 28 : Co-immunoprécipitation d'ExoU et de DNAJC5.....	134
Figure 29 : Co-immunoprécipitation d'ExoU-HA par DNAJC5-FLAG après différents temps d'infection.....	135
Figure 30 : Détection d'une interaction entre DNAJC5 et ExoU par HTRF.	136
Figure 31 : Modèle d'interaction directe entre ExoU et DNAJC5 _{Nter}	138
Figure 32 : Évaluation du modèle de docking entre ExoU et DNAJC5.....	139
Figure 33 : Représentation schématique des protéines purifiées avec leur tag.	140
Figure 34 : Profils de filtration sur gel pour les interactions ExoU et DNAJC5.....	141
Figure 35 : Pull-down avec les protéines recombinantes ExoU, DNAJC5 _{Nter} et DNAJC5 _{Cter}	142
Figure 36 : Pull-down d'ExoU et de DNAJC5 _{Cter} co-exprimées chez E.coli BL21 (DE3) ...	142
Figure 37 : Co-localisation de DNAJC5 (vert) et d'ExoU ^{Δ680-684} (rouge).....	143
Figure 38 : Co-localisation de DNAJC5 (vert) et d'ExoU ^{K178R} (rouge)	145
Figure 39 : Criblage des cellules A549 mutées par les ARNg avec E.coli-ExlBA.....	149
Figure 40 : Test de cytotoxicité avec la toxine ExlA sur les cellules mutées	151
Figure 41 : Cartographie des anticorps sur la séquence ExlA.....	154
Figure 42 : Principe du test ELISA	155
Figure 43 : Test ELISA direct contre ExlA purifiée avec les anticorps polyclonaux	155
Figure 44 : Dosage ELISA d'ExlA dans les surnageants de cultures bactériennes.....	157
Figure 45 : ELISA d'ExlA dans les lavages broncho-alvéolaires (BAL) murins.....	158
Figure 46 : Dosage ELISA dans les expectorations de patients.....	158

Liste des Tableaux

Tableau 1: Facteurs de risque associés et prévalence de <i>P. aeruginosa</i> pour différents types d'infections nosocomiales.	22
Tableau 2: Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
Tableau 3: Liste des gènes identifiés par le crible avec ExlA et codant pour des protéines localisées au niveau de la membrane plasmique.....	150
Tableau 4: Liste des oligonucléotides utilisés pour ajouter un tag HA au gène <i>exoU</i>	169
Tableau 5: Liste des oligonucléotides utilisés pour amplifier et séquencer les fragments d'ADNg, contenant les séquences d'ARNg, de chaque échantillon, après le criblage avec la toxine ExlA	176
Tableau 6: Liste des ARNg utilisés pour inhiber les gènes d'intérêt identifiés par le crible avec la toxine ExlA.....	177
Tableau 7: Liste des six autres couple d'ARNg utilisés pour inhiber les gènes d'intérêt identifiés par le crible avec la toxine ExlA	178
Tableau 8: Liste des prélèvements respiratoires.....	182

Abbréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADPRT	ADP ribosyl-transférase
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARNg	Acide RiboNucléique guide
BAL	Lavage Broncho-Alvéolaire
Cas9	<i>CRISPR associated protein 9</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CSP α	<i>Cystein-String Protein α</i>
DAG	DiAcylGlycérol
DNAJC5	<i>DnaJ (40 kD Heat shock protein / Hsp40) member C5</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinases
ERM	Ézrine, Radixine et Moésine
ExlA	Exolysine A
ExoS	Exotoxine S
ExoT	Exotoxine T
ExoU	Exotoxine U
ExoY	Exotoxine Y
GAP	<i>GTPase Activating Protein</i>
GMPC	Guanosine MonoPhosphate cyclique
Hsc70	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein (HSPA8)</i>
Hsp70	<i>70 kDa heat shock protein (HSPA1A)</i>
Hsp90	<i>90 kDa heat shock protein</i>
HTRF	<i>Homogeneous Time Resolved Technology</i>
IL	InterLeukine
IP	Iodure de Propidium
IP ₃	Inositol 1,4,5-triPhosphate
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
LPS	<i>LipoPolySaccharide</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MAPS	<i>Misfolded-Associated Protein Secretion</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MLD	<i>Membrane Localization Domain</i>
PFT	<i>Pore-Forming Toxin</i>
PH	<i>Pleckstrin Homology</i>
PI4P	PhosphatidyInositol-4-Phosphate
PIP2	PhosphatidyInositol-4,5-bisphosphate
PLA2	PhosphoLipases A2
PLP	<i>Patatin-Like Phospholipase</i>
SST	Système de Sécrétion de Type
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>

Introduction

Chapitre 1

Présentation de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*

A- Caractéristiques du genre *Pseudomonas*

Le terme *Pseudomonas* a été proposé en 1894 par le botaniste allemand Walter Emil Friedrich August Migula pour un genre qu'il a décrit comme « Cellules avec des organes polaires de motilité. La formation de spores se produit chez certaines espèces, mais elle est rare ». Ce genre regroupe aujourd'hui plus de 200 espèces de bactéries, en forme de bâtonnets et mesurant de 0,5 à 1,0 μm de diamètre sur 1,5 à 5,0 μm de longueur (Jun *et al.*, 2016; Moore *et al.*, 2006). La plupart de ces bactéries à Gram négatif sont saprophytes, cependant, plus de 25 espèces sont pathogènes pour les plantes les animaux ou les humains. On retrouve notamment l'espèce *P. syringae*, un phytopathogène majeur, responsable de l'émergence de maladies chez les arbres fruitiers ou encore *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri* et *P. chlororaphis*, qui sont associées à des infections chez l'homme et les animaux (Peix *et al.*, 2009). Ces espèces pathogènes sont opportunistes et ne peuvent infecter leur cible que si celle-ci est déjà affaiblie par une lésion ou une première infection par exemple. Bien que le nombre d'espèces pathogènes soit faible, l'utilisation abusive de médicaments pourrait augmenter ce nombre.

Une autre caractéristique du genre *Pseudomonas* est que ces espèces sont retrouvées dans une multitude d'habitats tels que l'eau, le sol, les plantes, les animaux et l'homme (**Figure 1**) (Scales *et al.*, 2014). Tout habitat proposant des composés organiques simples ou complexes, une température comprise entre 4 et 42°C et un pH entre 4 et 8, est susceptible d'être un environnement propice pour *Pseudomonas*. Le seul facteur limitant la colonisation de ces espèces est le besoin en oxygène car ce sont des bactéries aérobies (Moore *et al.*, 2006; Peix *et al.*, 2009). Cependant, il existe des conditions où certaines espèces de *Pseudomonas* peuvent survivre en condition anaérobie. Ces espèces utilisent alors le nitrate comme accepteur d'électron alternatif à l'oxygène pour la phosphorylation oxydative. Cela a été documenté pour

P. stutzeri, et *P. aeruginosa*, mais leur croissance est lente et de l'arginine ainsi que des extraits de levures doivent être présents dans le milieu de culture (Moore *et al.*, 2006).

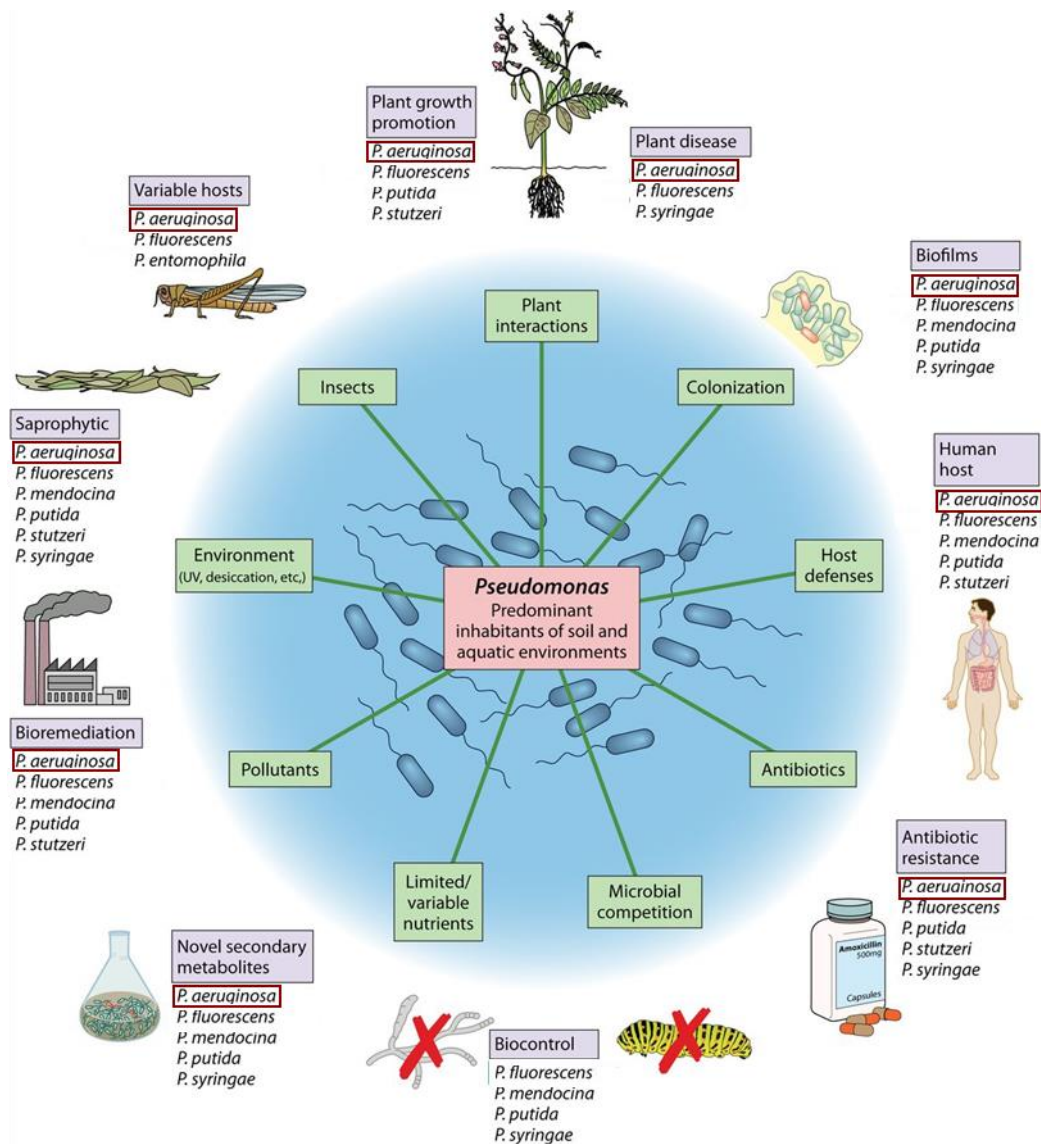


Figure 1: Niches environnementales occupées par le genre *Pseudomonas* mettant en évidence la large distribution de ces espèces (Scales *et al.*, 2014)

Les espèces du genre *Pseudomonas* ont pu coloniser ces différentes niches écologiques grâce à leur adaptabilité, leur grande polyvalence métabolique et leur plasticité génétique. En effet, elles ont la capacité de transférer horizontalement des éléments entre différentes souches (Qiu *et al.*, 2006) et possèdent un génome important ; près de 6,3 millions de paires de bases pour la souche *P. aeruginosa* PA01 (Stover *et al.*, 2000). De plus, environ 10% des gènes des génomes de *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. syringae* et *P. fluorescens*, codent pour des produits impliqués dans la régulation des gènes. Cela explique la capacité du genre *Pseudomonas* à s'adapter aux différentes contraintes environnementales (Moore *et al.*, 2006).

Parmi les différentes espèces qui composent le genre *Pseudomonas*, l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* est la plus connue car la plus souvent associée aux infections humaines.

B-*Pseudomonas aeruginosa*, un pathogène opportuniste qui s'adapte à son milieu

Plusieurs noms ont été attribués à ce pathogène opportuniste comme *Bacillus pyocyaneus*, *Bakterium aeruginosa*, *Pseudomonas polycolor*, et *Pseudomonas pyocyaneus*, avant sa dénomination finale. Ces noms reflètent la forme en bâtonnet de cet organisme, mais aussi l'aspect bleu-vert caractéristique d'une culture de cette bactérie ou du pus lors d'infection. En effet, elle produit un mélange de deux pigments, la pyocyanine de couleur bleu et la pyoverdine, une fluorescéine jaune (Botzenhart and Döring, 1993). Découverte en 1862 par Lucke qui a observé des organismes en forme de bâtonnet dans le pus bleu-vert de plaies infectées, *P. aeruginosa* n'a été isolée en culture qu'en 1882 par Carle Gessard à partir de plaies cutanées de deux patients (Gessard, 1984; Lyczak *et al.*, 2000).

La bactérie possède plusieurs appendices lui permettant de se mouvoir dans différents milieux. Tout d'abord un flagelle polaire, qui favorise la nage de la bactérie dans un environnement liquide ainsi que son essaimage (« swarming ») sur des surfaces semi-liquides (0,5 à 1% de gélose), à condition que le milieu présente des sources spécifiques d'azote et de carbone, telles que le glutamate et le glucose (Köhler *et al.*, 2000; Rashid and Kornberg, 2000). La bactérie possède également des pili de type IV qui favorisent son adhérence et son déplacement (« twitching ») sur des surfaces solides (Dasgupta *et al.*, 2003; Mattick, 2002). Enfin *P. aeruginosa* présente une motilité glissante (« sliding motility ») sur des surfaces semi-solides, essentielle pour coloniser les milieux favorisant la répression flagellaire, comme par exemple les voies respiratoires humaines (Murray and Kazmierczak, 2008).

Le premier génome de *P. aeruginosa* à avoir été séquencé est celui de la souche PA01 en 2000, puis d'autres génomes ont été séquencés comme celui des souches PA14 et PA7 respectivement en 2006 et 2010 (Lee *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2010; Stover *et al.*, 2000). La taille de ces génomes peut varier de 5,2 à 7 millions de paires de bases selon les souches. L'étude de Wolfgang sur le génome de 18 souches couramment retrouvées dans les infections humaines et dans l'environnement, a démontré une forte conservation du contenu génomique, notamment des gènes codant pour les facteurs de virulence (Wolfgang *et al.*, 2003). De plus, le génome de *P. aeruginosa* contient une forte proportion de gènes impliqués dans la régulation, le métabolisme ainsi que les systèmes de transport et d'efflux de composés organiques (Stover *et al.*, 2000).

Toutes ces caractéristiques génomiques reflètent l'adaptation évolutive de *P. aeruginosa* pour coloniser et prospérer dans une grande variété d'environnement.

La bactérie réside principalement dans les environnements humides des milieux communautaire et hospitalier, comme le sol, les bodes des éviers et les douches, ainsi que dans les systèmes d'eau artificiels (Pellett *et al.*, 1983; Rutherford *et al.*, 2018). Pour le milieu hospitalier, elle a également pu être isolée à partir de cathéters, d'implants, de piscines (pour la physiothérapie et l'hydrothérapie), mais aussi à partir d'humidificateurs ou de solutions pour lentilles (Abdallah *et al.*, 2014; Blanc *et al.*, 2007; Harris *et al.*, 1984; Lakkis and Fleiszig, 2001; Pollack, 1984). En revanche, *P. aeruginosa* est très peu présente dans la flore microbienne normale de l'homme. La bactérie est très peu retrouvée sur la peau et dans les narines et son taux de colonisation, dans les selles et la cavité buccale, est faible (D'Agata, 2015; Morrison and Wenzel, 1984). Cependant, l'hospitalisation d'un patient peut considérablement augmenter son taux de colonisation, notamment si celui-ci présente une altération des barrières cutanées ou des muqueuses, à la suite d'actes chirurgicaux ou d'une déficience dans son système immunitaire.

Suivant l'environnement dans lequel se trouve *P. aeruginosa*, la bactérie peut se présenter sous deux modes de vie bien distincts, une forme planctonique ou une forme sessile, lorsqu'il y a formation d'un biofilm

C- Mode de vie de *P. aeruginosa*

L'état planctonique correspond à la forme libre des bactéries, qui peuvent alors se déplacer de façon isolée les unes des autres. Dans cet état, les bactéries expriment leur flagelle et les pili de type IV pour se mouvoir. Sous cette forme, elles sont le plus souvent associées à des infections de courte durée, mais avec des symptômes sévères. Le passage de l'état planctonique à sessile s'opère quand les bactéries se fixent sur une surface pour former des microcolonies. Par la suite, les bactéries vont croître et produire des exopolysaccharides pour adopter une forme en champignon, correspondant à un biofilm mature (**Figure 2**). Ainsi dans cet état, la densité bactérienne est localement plus élevée que dans l'état planctonique. La formation d'un biofilm est nécessaire pour la colonisation des tissus humains au cours d'infections chroniques et pour la persistance de la bactérie dans les dispositifs médicaux implantés. Au cours de cette transition vers une forme sessile, de nombreux gènes sont régulés dans le but d'adapter le comportement de la bactérie à son nouveau mode de vie en communauté. En passant au stade biofilm, les gènes impliqués dans la formation des exopolysaccharides sont surexprimés, afin de favoriser

l'adhésion des bactéries, tandis que les gènes de motilité et de virulence sont réprimés (Dunne, 2002). Une fois le biofilm arrivé à maturation et afin d'assurer la survie dans un milieu hostile, des bactéries du biofilm peuvent se détacher et retrouver un caractère planctonique. Cette dispersion permet aux bactéries de coloniser de nouveaux environnements et de réinitialiser le processus de formation du biofilm (Rollet *et al.*, 2009; Mikkelsen *et al.*, 2011; Joseph *et al.*, 2016).

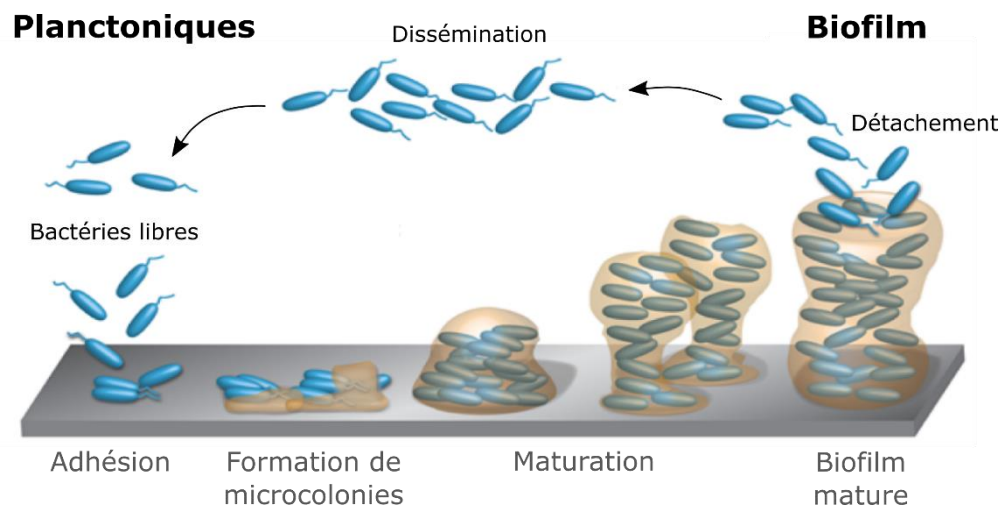


Figure 2: Cycle de vie du biofilm de *P. aeruginosa*. D'après (Joseph *et al.*, 2016)

D-Les infections à *P. aeruginosa*

P. aeruginosa est capable d'infecter une grande variété d'hôtes, vertébrés comme non-vertébrés. La bactérie est un pathogène sévère pour les plantes, les insectes, mais aussi les amibes et nématodes, ainsi que les mammifères comme les souris et l'homme (Boman *et al.*, 1972; D'Argenio *et al.*, 2001; Jander *et al.*, 2000; Pukatzki *et al.*, 2002; Rahme *et al.*, 1995; Tan *et al.*, 1999). Chez l'homme, la bactérie est un pathogène opportuniste et il est donc nécessaire que son système immunitaire soit affaibli ou que les barrières du corps présentent une rupture, pour que *P. aeruginosa* puisse initier une infection.

1- Les sites d'infection à *P. aeruginosa* et les facteurs de risques associés

Les sites d'infection de *P. aeruginosa* chez l'homme sont divers, tout comme les facteurs de risque associés à ces infections. Les personnes les plus à risques sont celles atteintes de mucoviscidose, suite à l'épaississement du mucus des voies respiratoires et les patients en milieu hospitalier. Ces derniers peuvent en effet présenter des lésions graves ou un déficit du système

immunitaire causé par une chimiothérapie ou le VIH par exemple, favorisant l'infection. (Franzetti *et al.*, 1992; Lyczak *et al.*, 2000). La pause d'un cathéter ou une intubation sont également des facteurs de risque chez les patients hospitalisés (David *et al.*, 2005).

Le **Tableau 1** résume les principales pathologies causées par *P. aeruginosa* en milieu hospitalier ainsi que les facteurs de risque associés. La bactérie est principalement associée aux infections pulmonaires (13,94%) et aux infections de la peau et des tissus mous (9, 29%) (Santé Publique France, 2017)

Tableau 1: Facteurs de risque associés et prévalence de *P. aeruginosa* pour différents types d'infections nosocomiales (Santé Publique France, 2017).

Site d'infection	Facteurs de risque	Pathologie	Rang de <i>P.aeruginosa</i> *
Poumon	Intubation, respiration assistée, VIH mucoviscidose, bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)	Pneumonie	2 ^{ème}
Peau et tissus mous (muscles, tendons, ligaments, tissu adipeux)	Blessure profonde : plaie, brûlure, acte chirurgical	Infection cutanée	2 ^{ème}
Système urinaire	Pose de cathéter urinaire ou voies urinaires obstruées	Infection urinaire	5 ^{ème}
Sang	Cathéter intravasculaire, seringue contaminée, taux de globules blancs faible (chimiothérapie), organe infecté donnant accès à la circulation sanguine	Bactériémie	5 ^{ème}

* parmi les bactéries isolées sur ces sites d'infections

P. aeruginosa est également à l'origine d'autres types d'infection en dehors de l'hôpital comme :

- Des otites externes, liées à une infection du conduit auditif externe ou de l'oreille profonde. Le principal facteur de risque pour ces infections est la nage en eau douce (Schaefer and Baugh, 2012).
- Des kératites (infections oculaires). Les principaux facteurs de risques sont une blessure de la cornée et une contamination des lentilles de contact ou de la solution de lavage (Sun *et al.*, 2012).

- Des folliculites (infections des follicules pileux). Les principaux facteurs de risques sont la fréquentation de spa ou bains bouillonnants insuffisamment chlorés (Zichichi *et al.*, 2000).

Les infections pulmonaires, toute origine confondue (hospitalier et non-hospitalier), restent la principale cause d'infection à *P. aeruginosa*. Cela se produit notamment chez les personnes présentant une détérioration des défenses pulmonaires, comme celles atteintes de mucoviscidose, de bronchopneumopathie chronique obstructive ou celles sous respiration mécanique. Cependant, bien que cela soit rare, quelques cas de pneumonie fatale à *P. aeruginosa*, acquise en communauté chez des personnes auparavant saines, ont déjà été documentés (Hatchette *et al.*, 2000). Dans cette étude, les facteurs de risques mis en cause sont l'exposition des patients à des aérosols provenant d'eaux contaminées par la bactérie et des antécédents de tabagisme. En effet, en tenant compte du fait que cette dernière donnée n'était disponible que chez 6 des 12 cas rapportés, 84 % des patients fumaient en moyenne 40 paquets par an.

2- Les infections nosocomiales

Les infections nosocomiales se définissent comme étant des infections contractées dans un établissement de soins. Ces infections doivent survenir au moins 48 h après l'admission du patient pour être considérées « nosocomiales ». C'est généralement dans les services de réanimation, de soins intensifs et les centres de brûlés, que le risque d'infection à *P. aeruginosa* est le plus important. Dans ces espaces, les patients sont en effet souvent immunodéprimés, intubés, ventilés et porteurs de cathéters.

Selon une étude de 2012, menée par l'Institut nationale de Veille Sanitaire (InVS), 5% des patients hospitalisés en France ont contracté une infection nosocomiale. Cela représente 750 000 infections par an. Les trois bactéries majoritairement associées à ces infections sont *Escherichia coli* (26%), *Staphylococcus aureus* (16%) et *P. aeruginosa* (8,4%). Le taux plus faible d'infections nosocomiales causées par *P. aeruginosa*, peut être lié au fait que cette bactérie est très peu présente chez l'homme en tant que bactérie commensale, contrairement aux deux autres bactéries. Or, dans la majorité des cas, les infections nosocomiales sont des infections endogènes, c'est-à-dire que le patient est infecté par ses propres bactéries au cours de certains actes chirurgicaux. En outre, les infections contractées à l'hôpital par *P. aeruginosa* se font via l'environnement hydrique des services (lavabos, robinets, savons, humidificateurs),

car il s'agit d'un environnement humide, propice au développement et à la multiplication de la bactérie (Floret *et al.*, 2009).

Le microenvironnement dans lequel se trouve la bactérie et l'état pathologique du patient, vont engendrer des modifications génotypiques chez *P. aeruginosa*, aboutissant à deux types d'infection : aiguës ou chroniques (Hogardt and Heesemann, 2010; Ventre *et al.*, 2006).

3- Les infections aiguës

Ces infections sont soudaines et brèves et principalement associées à des infections de type nosocomiales. Elles se caractérisent par un mode de vie planctonique de *P. aeruginosa*, ainsi que par l'expression d'un grand nombre de facteurs de virulence. On observe notamment une propagation rapide de la bactérie, liée à une mobilité flagellaire accrue, ainsi qu'une forte expression des pili de type IV. Ces appendices induisent aussi une réponse inflammatoire forte, suite au contact de la bactérie avec les cellules de l'hôte. De plus, les systèmes de sécrétion de type 2 et 3 sont également activés, provoquant la libération de protéases et de toxines et donc la formation de lésions tissulaires. Cela cause des dommages au niveau des barrières épithéliales et crée des ouvertures, favorisant la dissémination de la bactérie (Gellatly and Hancock, 2013). Cette dissémination sera d'autant plus importante si le système immunitaire de l'hôte est affaibli et donc incapable de faire face au pathogène.

i- Les pneumonies

Les pneumonies causées par *P. aeruginosa* sont généralement acquise en milieu hospitalier et rarement d'origine communautaire. Ces infections pulmonaires sont également plus fatales en milieu hospitalier, car les patients présentent préalablement un endommagement des voies respiratoires, causé par une ventilation mécanique, un traumatisme ou une infection virale antérieure. Ces facteurs augmentent aussi le risque d'une dissémination de la bactérie à travers le système sanguin. En règle générale, les pneumonies contractées à l'hôpital par *P. aeruginosa* surviennent chez les patients mécaniquement ventilés, qui sont en soins intensifs ou les patients neutropéniques (Fernández-Barat *et al.*, 2017). Pour donner un exemple, parmi les patients dans les unités de soins intensifs européennes nécessitant une ventilation mécanique, *P. aeruginosa* était responsable de 23,1% des cas de pneumonie (Koulenti *et al.*, 2009). Dans certaines unités de soin, les pneumonies dues à *P. aeruginosa* ont pu atteindre 30% voire 50% des pneumopathies, ce qui a pour effet, entre autres, de prolonger la durée de séjour en soins intensifs et d'augmenter la mortalité (Heyland *et al.*, 1999; Maqbool *et al.*, 2017). Concernant

les cas de pneumonies d'origine communautaire, les personnes sont souvent atteintes d'une maladie pulmonaire chronique avant l'apparition de la pneumonie bactérienne. Cependant quelques cas de personnes auparavant en bonne santé et ayant contractées une pneumonie communautaire grave, causée *P. aeruginosa*, ont été décrits (Hatchette *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2019).

ii- Infections des voies urinaires

Les infections des voies urinaires sont les infections les plus répandues chez les patients hospitalisés, représentant jusqu'à 49% des infections nosocomiales. Parmi ces infections, 7 à 10% sont causées par *P. aeruginosa*. Or la présence de cette bactérie chez ces patients entraîne des complications sévères pouvant aboutir à une forte mortalité, notamment si les patients présentent une autre maladie sévère (Lamas Ferreiro *et al.*, 2017). C'est principalement la cathétérisation des voies urinaires, qui est à l'origine de ces infections et elle est souvent associée à la formation de biofilm, ce qui peut conduire à une infection urinaire récurrente et chronique (Mittal *et al.*, 2009).

iii- Bactériémie

P. aeruginosa est la bactérie à Gram négatif la plus souvent impliquée dans les infections sanguines. Ces infections résultent, soit de la dissémination des bactéries dans le milieu sanguin, à partir d'un premier site d'infection, suite à la rupture des barrières tissulaires, soit de l'introduction de dispositifs médicaux, tels que les cathéters, qui donnent un accès direct au sang. Dans tous les cas, ces infections sanguines causées par *P. aeruginosa* sont souvent fatales pour le patient, d'autant plus si le traitement antimicrobien initial est inapproprié (Micek *et al.*, 2005). Dans une publication récente, Choi et ses collègues, ont démontré que les patients présentant une infection des voies respiratoires, causée par *P. aeruginosa*, étaient plus susceptibles de contracter une bactériémie, que ceux présentant une infection des voies urinaires. (Choi *et al.*, 2018). Si la charge bactérienne n'est pas diminuée par l'action du système immunitaire et la prise d'antibiotiques adéquats, alors la bactériémie peut conduire à une septicémie (réaction inflammatoire généralisée suite à la dissémination de la bactérie dans tout l'organisme), voire une défaillance circulatoire aiguë ou choc septique (diminution brutale de la tension artérielle et défaillance multi-viscérale).

iv- *Autres infections aiguës*

En raison de sa capacité à vivre et prospérer dans les environnements humides, qui constituent son réservoir principal, *P. aeruginosa* va pouvoir coloniser et infecter les yeux. En effet, cette bactérie est régulièrement impliquée dans les infections cornéennes graves et elle est l'espèce bactérienne la plus fréquemment isolée chez les porteurs de lentilles, ayant contractés une kératite. Le port de lentille étant la cause la plus fréquente de kératite devant les maladies et traumatismes oculaires (Green *et al.*, 2008).

Ce pathogène est également impliqué dans les infections cutanées. En effet, comme pour la bactériémie, *P. aeruginosa* est la bactérie à Gram négatif la plus souvent retrouvée dans les brûlures infectées. Ces infections sont la principale cause de morbidité chez les brûlés. La perte de la fonction barrière de la peau, facilite également l'entrée de pathogènes opportunistes, comme *P. aeruginosa*, dans la circulation sanguine et peut conduire à une bactériémie (Armour *et al.*, 2007).

Enfin, *P. aeruginosa* peut infecter d'autres parties du corps, comme les os, les articulations, l'endocarde ou encore l'appareil digestif. Les infections ostéoarticulaires dues à *P. aeruginosa* sont rares. Dans une étude menée entre 2002 et 2011, à l'hôpital Roger Salengro du CHU de Lille, la prévalence de *P. aeruginosa* dans ces infections n'était que de 3,6 % contre 27 % pour *Staphylococcus aureus* (Titécat *et al.*, 2013). De même, les infections de l'endocarde causées par *P. aeruginosa* sont rares et affectent des patients particuliers, comme ceux possédant un dispositif médical implantable actif (valves prothétiques, pacemaker). Concernant les infections gastro-intestinales par *P. aeruginosa*, elles affectent principalement les personnes souffrant d'obstruction gastro-intestinale et les patients neutropéniques (Ohara and Itoh, 2003)

Outre les infections aiguës, *P. aeruginosa* est également responsable d'infections chroniques. Ces infections surviennent à la suite d'infections aiguës, si celles-ci ne sont pas traitées à temps ou correctement, mais d'autres facteurs peuvent favoriser cette chronicité.

4- Les infections chroniques

Les infections chroniques ont habituellement un début progressif et une durée longue. Elles se caractérisent par une colonisation, puis une persistance d'une ou plusieurs bactéries. Le nombre et le type de bactérie pouvant évoluer avec le temps. Ces bactéries ont un mode de vie sous forme de biofilm. Parmi les infections chroniques, *P. aeruginosa* est surtout identifiée chez les personnes souffrant de symptômes respiratoires (obstruction des voies respiratoires), telles que

celles atteintes de mucoviscidose ou d'une maladie pulmonaire obstructive chronique.

i- Infection des patients atteints de mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie génétique récessive incurable, provoquée par une mutation sur le gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), qui code pour une protéine du même nom. Elle affecte principalement les fonctions respiratoires et digestives. En France, un enfant sur 4 500 nouveau-nés est atteint par cette maladie et l'espérance de vie ne dépasse pas 46 ans. La plupart décèdent d'insuffisance respiratoire. Actuellement, 1 500 mutations différentes ont été reportées et rendues responsables de l'apparition de la maladie. Ces mutations conduisent à l'inactivation, la malformation, voire à l'absence de la protéine CFTR. La plus courante (70% des cas) est la mutation deltaF508 entraînant un défaut de repliement de la protéine après synthèse, empêchant sa localisation sur la surface apicale des cellules épithéliales. En temps normal, elle forme un canal qui permet le passage d'ions chlorures vers l'extérieur de la cellule, pour hydrater et fluidifier le mucus, une substance impliquée dans l'évacuation des poussières et des bactéries grâce au mouvement ciliaire. Sa mutation engendre un blocage des ions chlorures dans les cellules et aboutit à une augmentation de la viscosité et de l'épaisseur du mucus. L'accumulation du mucus au niveau des bronches va obstruer les bronchioles et devenir un milieu propice pour le développement de bactéries, notamment *P. aeruginosa*. A l'âge adulte, 80% des patients atteints de mucoviscidose sont infectés par cette bactérie. Ces infections respiratoires chroniques sont la principale cause de décès chez ces patients (Bhagirath *et al.*, 2016; Emerson *et al.*, 2002).

Comme illustré sur la **Figure 3**, les populations bactériennes dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose évoluent au cours du temps. Cependant, deux bactéries sont majoritairement présentes et se disputent cet environnement. Il s'agit de *S. aureus*, qui est principalement retrouvée chez les jeunes patients et *P. aeruginosa*, qui apparaît progressivement pour finir majoritaire en fin de vie. Cette inversion s'opère grâce à la faculté de *P. aeruginosa* de sécréter, ou d'induire la production par l'hôte, d'antimicrobiens, capables d'éliminer *S. aureus*. En effet, lors de carence en fer, *P. aeruginosa* sécrète des molécules appelées 2-alkyl-4 (1H)-quinolones, qui ciblent et tuent *S. aureus*. De plus, *P. aeruginosa* stimule la production d'une enzyme par les cellules épithéliales, la phospholipase A2 de type-IIA, capable d'éliminer les bactéries à Gram positif (Nguyen *et al.*, 2015; Pernet *et al.*, 2014).

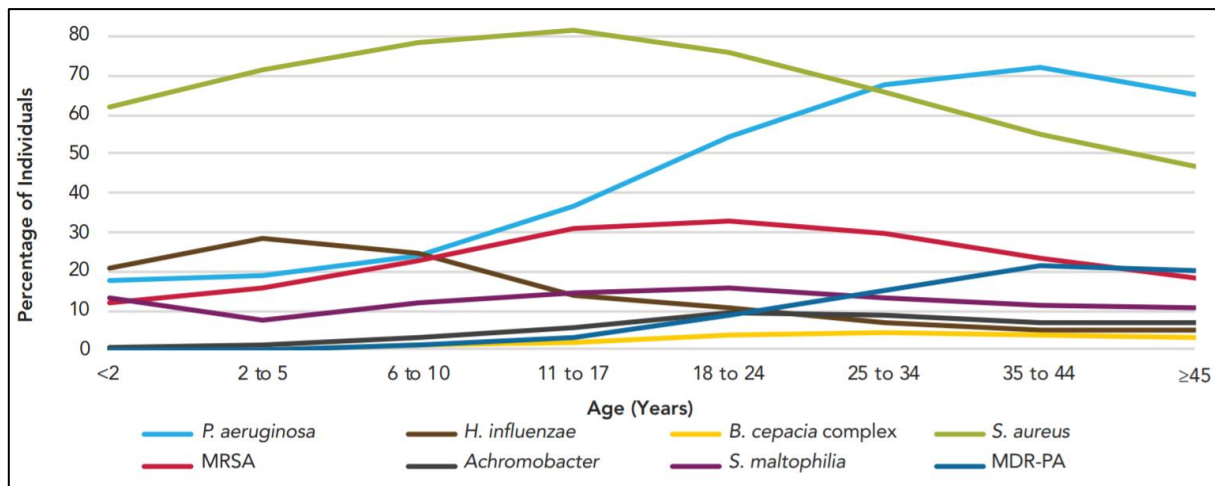


Figure 3: Prévalence des micro-organismes respiratoires, retrouvés chez les patients atteints de mucoviscidose et regroupés par âge (« 2017 Patient Registry Annual Data Report » 2017)

D'autres facteurs sont également responsables de la persistance de *P. aeruginosa* chez ces patients. En particulier, la limitation en oxygène et en nutriment, la prise d'antibiotiques et la réponse immunitaire élevée, forcent *P. aeruginosa* à évoluer vers des clones plus adaptés à ce nouvel environnement. Des modifications génétiques vont donc conduire à la perte de la mobilité, à une diminution des facteurs de virulence, ainsi qu'à une augmentation de la résistance face aux antibiotiques (Cullen and McClean, 2015; Hogardt and Heesemann, 2010; Smith *et al.*, 2006; Ventre *et al.*, 2006; Warren *et al.*, 2011; Whiteley *et al.*, 2001). Ces mutations évolutives favorisent également l'émergence de clones mucoïdes, présentant une surexpression des gènes codant pour les exopolysaccharides. Ces exopolysaccharides jouent un rôle important dans la formation du biofilm et offrent une protection à *P. aeruginosa* contre le système immunitaire de l'hôte et les antibiotiques, afin que la bactérie perdure dans cet environnement hostile (Bjarnsholt *et al.*, 2009; Breidenstein *et al.*, 2011). De plus, sous sa forme biofilm, *P. aeruginosa* va sécréter des composés, comme les rhamnolipides ou la pyocyanine, qui vont augmenter l'inflammation et donc les dommages tissulaires (Jensen *et al.*, 2007; Mowat *et al.*, 2011).

ii- Autres infections chroniques causées par *P. aeruginosa*

Bien que l'infection chronique par *P. aeruginosa*, chez les patients atteints de mucoviscidose, soit la pathologie la plus fréquente, il existe d'autres pathologies où la bactérie est associée de façon chronique. En particulier, d'autres maladies touchant le poumon ou le tractus urinaire, la peau et les oreilles.

Concernant les pathologies pulmonaires, *P. aeruginosa* est un pathogène régulièrement

associée aux personnes atteintes de maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC). En effet, ces personnes présentent des difficultés respiratoires liées à une obstruction du flux d'air et une forte production d'expectorations, ce qui favorise les infections chroniques par des pathogènes opportunistes. La prévalence de *P. aeruginosa* chez ces personnes est de 4 à 15% et sa présence est fortement corrélée avec la production d'exacerbations symptomatiques (Martínez-Solano *et al.*, 2008; Rosell *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2010). *P. aeruginosa* est également responsable d'infections chroniques chez les patients atteints de bronchiectasie, d'asthme chronique ou de cancer du poumon (Davies *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2018; Holm *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2012).

En outre, comme évoqué dans la partie « Les infections aiguës », *P. aeruginosa* provoque des infections chroniques du tractus urinaire, en formant un biofilm à la surface des sondes utilisées (Kirmusaoglu *et al.*, 2017; Mittal *et al.*, 2009). Cette production de biofilm n'est pas liée à la production d'exopolysaccharides, contrairement à ce qui est observé dans le poumon, mais à la libération d'ADN extracellulaire via le contact des bactéries avec l'urine et l'urée du patient (Cole *et al.*, 2014).

P. aeruginosa est également responsable de plaies chroniques, notamment chez les personnes diabétiques, en raison d'une mauvaise circulation sanguine qui diminue la réponse immunitaire et la guérison (Mulcahy *et al.*, 2014; Serra *et al.*, 2015). Enfin, c'est un pathogène commun retrouvé dans les infections chroniques de l'oreille moyenne, appelées otites moyennes suppurées chroniques (Mansoor *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2016).

Dans tous les cas, la prise en charge à temps du patient avec un traitement adapté est primordiale afin d'augmenter ses chances de survie face à une infection par *P. aeruginosa*, qui peut se révéler fatale. Cependant, beaucoup de souches ont développé une résistance aux antibiotiques couramment utilisés, ce qui pose un problème de santé majeur.

5- La résistance aux antibiotiques

L'utilisation intense et récurrente d'antibiotiques, pour traiter les patients infectés par *P. aeruginosa*, a abouti à l'émergence de souches multirésistantes aux différentes classes d'antibiotiques, qui sont les β -lactamines hors carbapénèmes (pénicillines, céphalosporines et monobactames), les carbapénèmes, les fluoroquinolones et aminosides (Barbier and Wolff, 2010). Cela a conduit l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) à classer *P. aeruginosa* comme priorité critique pour la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques, en février 2017.

La sélection de souches résistantes aux antibiotiques s'opère par différents mécanismes. Comme illustré dans le **Tableau 2**, la résistance de ces souches peut être liée à la mutation chromosomique de gènes induisant : i) une modification des cibles des agents antibactériens ii) la surexpression de pompes à efflux, iii) l'augmentation de l'imperméabilité de la membrane externe, suite à la formation d'un biofilm et l'inhibition de porines, et iv) l'expression constitutive de gènes de résistance (Bonomo and Szabo, 2006; Lister *et al.*, 2009; Barbier and Wolff, 2010; Hwang and Yoon, 2019). Plus inquiétant, on peut également observer l'acquisition de gènes de résistance par transfert horizontal, pendant l'antibiothérapie (Barbier and Wolff, 2010; Pachori *et al.*, 2019). Les souches multirésistantes peuvent cumuler plusieurs de ces mécanismes de résistance, limitant considérablement les options thérapeutiques pour les éradiquer et ainsi soigner les patients.

Tableau 2: Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa* (Barbier and Wolff, 2010)

Classe d'antibiotiques	Résistances par mutations (chromosomiques)			Résistances par acquisition de gènes (quasi exclusivement plasmidiques)					
	Mécanisme	Support génétique	Molécules concernées	Mécanisme	Support génétique	Molécules concernées			
β-lactamines	Hyperproduction de la céphalosporinase ampC	<i>ampC</i> (<i>ampD</i> , <i>ampR</i>)	TIC, TCC, PIP, PTZ, FEP, CAZ, AZT	β-lactamases de classe A¹	<i>bla_{PSE}</i>	TIC, PIP			
				Pénicillines		<i>bla_{PER}</i> , <i>bla_{GES}</i> , <i>bla_{VEB}</i>	TIC, TCC, PIP, PTZ, FEP, CAZ, AZT		
				BLSE			<i>bla_{KPC}</i>	Ensemble des β-lactamines ² (IMI, MER, DOR : I/R)	
Efflux actif	<i>MexAB-oprM</i> <i>MexXY-oprM</i> <i>MexCD-oprJ</i>	TIC, TCC, AZT, MER FEP FEP	β-lactamases de classe B¹ (métaallo-carbapénèmases)	<i>bla_{VIM}</i> , <i>bla_{IMP}</i> , <i>bla_{GIM}</i>	Ensemble des β-lactamines sauf AZT				
			Imperméabilité aux carbapénèmes		<i>OprD</i>	IMI (± MER et DOR)	β-lactamases de classe D	<i>bla_{OXA}</i>	Variable (sauf IMI, MER, DOR)
							Aminosides		Efflux actif
Fluoroquinolones	Modification de la cible (topo-isomérase II-IV)	<i>gyrA</i> (++) , <i>parC</i>	CIP	Non rapporté (notamment <i>Qnr</i> et <i>AAC[6']-Ib-cr</i>)	Modification de la cible (méthylation de l'ARNr)	<i>rmt</i>	Toutes		
					Colistine	Modifications de la structure de la membrane externe (exceptionnelle)	Non rapporté	Autres	CIP

Ces souches multi- voire pan-résistantes ont des conséquences directes sur l'augmentation de la mortalité, les interventions chirurgicales, le temps de séjour à l'hôpital et le coût global pour traiter l'infection (Aloush *et al.*, 2006; Lister *et al.*, 2009). Actuellement, de nouvelles approches voient le jour afin de limiter les infections par des souches multirésistantes de *P. aeruginosa*. Ces approches concernent l'utilisation de différentes combinaisons d'antibiotiques, ainsi que le développement de nouveaux antibiotiques (Doripenem, plazomicin, POL7001). On voit également apparaître l'utilisation de nouvelles stratégies thérapeutiques, seules ou en

combinaison avec des thérapies conventionnelles. Parmi ces nouvelles thérapies, certaines visent à empêcher la formation du biofilm (inhibiteurs du quorum-sensing et des lectines bactériennes, chélateurs des ions fer), à améliorer la pénétration des antibiotiques dans la bactérie (nanoparticules), à prévenir les infections (vaccins) ou à lyser ces bactéries (peptides antimicrobiens et thérapie phagique) (Pang *et al.*, 2019).

Pour conclure, la sévérité des infections à *P. aeruginosa* est liée à la forte capacité d'adaptation de la bactérie pour survivre dans des environnements hostiles, mais aussi à son incroyable résistance face à de multiples antibiotiques.

E- Déclenchement du système immunitaire par *P. aeruginosa*

La colonisation et le franchissement des barrières naturelles de l'hôte (peau et muqueuses) par *P. aeruginosa*, conduit à l'activation du système immunitaire. Ce système immunitaire met en jeu l'immunité innée, qui est un mécanisme de défense non spécifique et l'immunité acquise, dite adaptative, qui est sélective de l'agent pathogène à éliminer. L'immunité innée se déclenche très tôt, suite à la reconnaissance de motifs moléculaires associés à certaines structures du pathogène, comme le flagelle, les pili et les LPS, regroupés sous l'acronyme PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns), par des récepteurs cellulaires spécifiques, les PRR (Pattern Recognition Receptors). Ces récepteurs se situent au niveau des cellules épithéliales, des neutrophiles et des monocytes/macrophages et se composent entre-autres, des récepteurs membranaires TLR (Toll-Like Receptors) et des récepteurs cytosoliques NLR (Nod-Like Receptors). L'activation des TLR se traduit par la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et IL-18) au sein de cellules sentinelles comme les macrophages alvéolaires dans le poumon ou les cellules NK (DiMango *et al.*, 1995; Wesselkamper *et al.*, 2008; Bonfield *et al.*, 2012). Ces cytokines sont ensuite activées et sécrétées, suite à l'activation de NLRs et l'assemblage d'un inflammasome de type NLRC4 ou NLRP3. Cette première phase inflammatoire entraîne la synthèse et la sécrétion de chimiokines, comme l'IL-6 et l'IL-8, déclenchant le passage de cellules immunitaires du sang vers le tissu infecté (**Figure 4**). Les cellules recrutées, majoritairement composées de neutrophiles, vont éliminer les bactéries par phagocytose. Les facteurs du complément participent aussi à cette élimination en formant des pores dans la membrane bactérienne, grâce au complexe d'attaque membranaire (CAM) (Lavoie *et al.*, 2011). Ainsi, l'infection des poumons par *P. aeruginosa*, déclenche une réponse inflammatoire intense chez l'hôte. Pour preuve, les patients atteints de mucoviscidose et infectés par *P. aeruginosa* présentent généralement une inflammation excessive, avec notamment une

forte expression de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-8 (DiMango *et al.*, 1995; Kube *et al.*, 2001; Bonfield *et al.*, 2012).

L'immunité acquise se déclenche plus tardivement, parfois plusieurs jours après le premier contact avec le pathogène. Elle est activée après digestion du pathogène par les phagocytes, en particulier les cellules dendritiques. Ces cellules fixent des peptides bactériens sur les récepteurs CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) et les présentent aux lymphocytes T et B, au niveau des ganglions lymphatiques, permettant entre-autres, la production d'anticorps spécifiques et de cellules mémoires.

Pour persister et disséminer dans l'organisme, *P. aeruginosa* va atténuer le système immunitaire de l'hôte à l'aide de plusieurs facteurs de virulence qui seront détaillés dans le **Chapitre 2** (Allen *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2009; Diaz *et al.*, 2008; Garrity-Ryan *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2003; Skopelja-Gardner *et al.*, 2019; Van Gennip *et al.*, 2009). L'activation de l'immunité innée est nécessaire à l'élimination du pathogène, mais est à double-tranchant : la stimulation incessante de la réaction inflammatoire liée à la persistance de la bactérie est délétère pour l'organisme et cause des lésions graves.

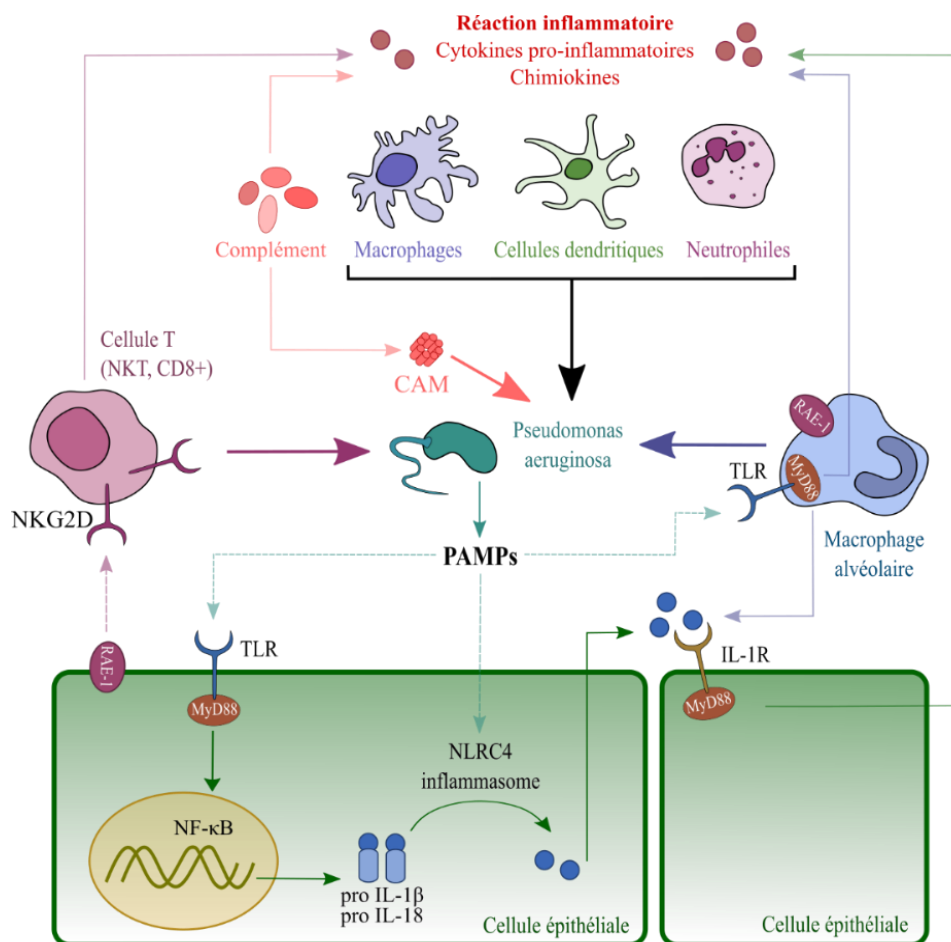


Figure 4: Activation de la réponse immunitaire innée face à une infection par *P. aeruginosa*

Chapitre 2

Les facteurs de virulence de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa possède plusieurs facteurs de virulence, qui constituent un arsenal dont la bactérie se sert pour adhérer, survivre et coloniser différents hôtes (**Figure 5**). Parmi ces facteurs de virulence, certains sont associés à la membrane bactérienne, comme le flagelle et les pili de type IV et permettent à la bactérie de se déplacer et d'adhérer sur des surfaces cellulaires ou acellulaires. D'autres exportent des toxines ou des enzymes dans le milieu extracellulaire ou directement dans les cellules cibles. C'est le cas des systèmes de sécrétion, qui jouent un rôle essentiel dans le pouvoir pathogène de la bactérie. *P. aeruginosa* exerce une fine régulation de ces facteurs de virulence afin de les adapter au contexte de l'infection, aigüe ou chronique. En particulier, les facteurs cités précédemment seront exprimés au cours d'une infection aigüe, tandis qu'ils seront réprimés lors du passage à la chronicité.

Dans ce chapitre, je détaillerai ces facteurs et leurs rôles dans l'infection. Pour les systèmes de sécrétion, je me focaliserai en particulier sur les systèmes de sécrétion de type 2 et 3, car ils jouent un rôle majeur dans les infections aigües. De plus, le type 3 permet la libération de la toxine ExoU dans les cellules cibles, toxine sur laquelle a porté mon projet de thèse.

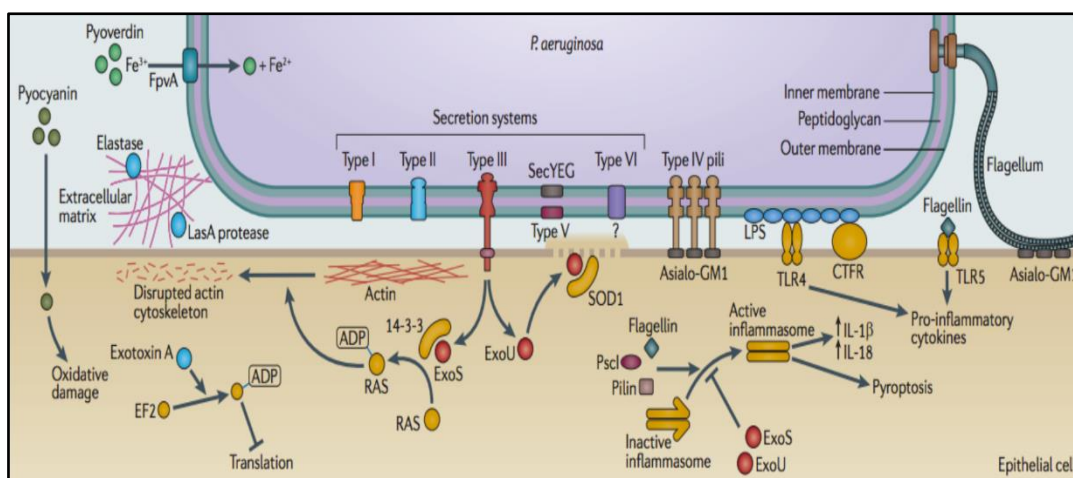


Figure 5: Les facteurs de virulence de *P. aeruginosa* (Hauser and Ozer, 2011)

A-Le flagelle

Le rôle du flagelle est d'assurer la mobilité et le chimiotactisme de *P. aeruginosa* vers des substrats spécifiques, mais il joue également un rôle dans la virulence de la bactérie et la réponse inflammatoire de l'hôte.

1- Structure du flagelle

P. aeruginosa est une bactérie monotriche, c'est à dire qu'elle ne possède qu'un seul flagelle polaire, mesurant de 15 à 20 μm de long (**Figure 6**). Il est composé de plusieurs protéines et se divise en trois compartiments bien distincts :

- Le corps basal, enchâssé dans la paroi de la bactérie, qui est composé de deux anneaux fixes, L et P et de deux anneaux mobiles M et S couplés à un système statique. Ensemble, ils constituent un complexe responsable de la rotation du flagelle, qui s'effectue grâce à un gradient électrochimique de proton ou de sodium existant entre l'intérieur et l'extérieur de la bactérie.
- Un filament hélicoïdal, composé d'un assemblage de protéines FliC (flagelline) et qui se termine par la protéine FliD.
- Un crochet rigide, qui sert de lien entre les deux premiers compartiments.

Le mouvement de rotation généré par le corps basal est transmis à une tige axiale, par les anneaux M et S, ce qui entraîne la rotation du crochet. De par son aspect en forme de « coude » et sa rigidité, le crochet transmet cette rotation au filament, qui effectue alors un mouvement hélicoïdal, propulsant la bactérie (Pallen and Matzke, 2006).

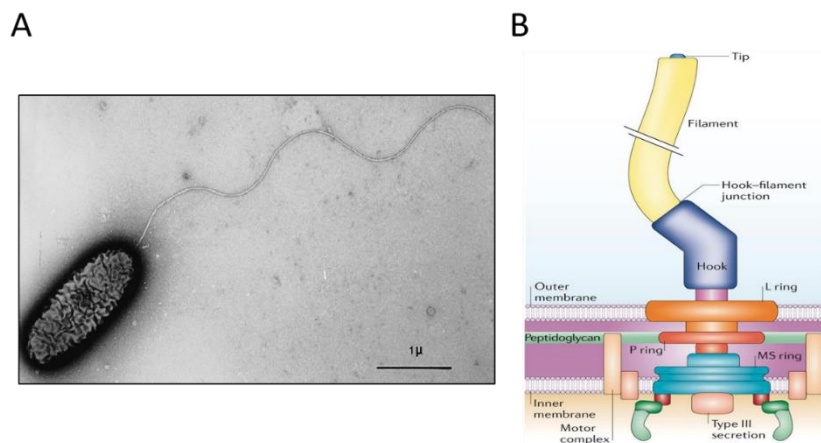


Figure 6: Flagelle des bactéries à Gram négatif. **A.** Flagelle polaire monotriche de *Pseudomonas aeruginosa* vu en microscopie électronique (Wisplinghoff and Seifert, 2010). **B.** Structure du flagelle (Pallen and Matzke, 2006)

2- Importance du flagelle dans la mobilité

Ce flagelle confère à *P. aeruginosa* une mobilité de type nage (« swimming ») ou de type « essaimage » (« swarming ») selon l'environnement où se trouve la bactérie.

La nage est une mobilité rapide dans les environnements aqueux ou expérimentaux, comportant moins de 0,4% d'agar. Dans ces conditions, la bactérie peut se déplacer à une vitesse de plusieurs dizaines de micromètres par seconde, par exemple 41 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ pour la souche PAK (Doyle *et al.*, 2004; Murray and Kazmierczak, 2006). Selon les stimulus, la bactérie pourra se mouvoir vers l'avant ou vers l'arrière pour se déplacer vers un environnement propice ou au contraire, s'éloigner d'un environnement peu favorable. Cette adaptation de la nage aux signaux externes, ou chimiotactisme, est médiée par des chémorécepteurs qui engendrent une cascade de signalisation, modifiant la fréquence de rotation dans le sens horaire ou anti-horaire du flagelle (Sampedro *et al.*, 2015). Ces chémorécepteurs sont enchâssés dans la membrane cytoplasmique et captent des ligands situés dans le périplasme. Chez *P. aeruginosa*, il existe 26 chémorécepteurs différents, qui montrent un chimiotactisme positif envers les acides aminés, l'éthylène et le malate (Kato *et al.*, 2008; Sampedro *et al.*, 2015)

La mobilité de type essaimage correspond à un déplacement coordonné de bactéries sur des surfaces semi-solides, mimée en laboratoire par de l'agar mou comportant 0,5 à 0,7% d'agar. Cette mobilité requiert la présence du flagelle mais aussi des pili de type IV et la production de biosurfactant, comme les rhamnolipides, qui réduisent la friction entre la bactérie et la surface sur laquelle elle se déplace. Ce type de déplacement est induit lorsque certains acides aminés, comme le glutamate ou l'aspartate, sont la seule source d'azote du milieu. De plus, la morphologie de *P. aeruginosa* évolue pour favoriser cette mobilité. En effet, les bactéries sont plus allongées et surtout, certaines se voit attribuer un deuxième flagelle situé au même pôle que le premier flagelle (Köhler *et al.*, 2000; Rashid and Kornberg, 2000).

3- Importance du flagelle dans l'infection

Le flagelle est important pour les différentes étapes du processus infectieux. D'une part, il est essentiel pour l'adhésion de *P. aeruginosa* sur des surfaces cellulaires ou acellulaires. Il permet l'adhésion de la bactérie sur les cellules épithéliales du côté basolatéral, ainsi que sur le mucus recouvrant les voies respiratoires, via les protéines FliC et FliD (Arora *et al.*, 1998; Bucior *et al.*, 2012; Lillehoj *et al.*, 2002; Scharfman *et al.*, 2001). D'autre part, il contribue à la persistance de la bactérie sur le lieu de l'infection. Cela a été démontré au niveau cutané mais également dans le poumon, où le flagelle réduit l'effet bactéricide de la protéine A du surfactant (Garcia

et al., 2018; Zhang *et al.*, 2007). Enfin, cet appendice est responsable de la dissémination de la bactérie. Il favorise l'invasion de l'épiderme et participe au chimiotactisme de la bactérie, notamment vers les zones lésées et vers d'autres organes à travers le système sanguin (Drake and Montie, 1988; Feldman *et al.*, 1998; Garcia *et al.*, 2018; Matilla and Krell, 2018; Schwarzer *et al.*, 2016).

Cependant, le flagelle active une réponse immunitaire innée, susceptible d'éliminer la bactérie. Au niveau des cellules des voies respiratoires et de l'épiderme, la flagelline FliC est reconnu par les récepteurs TLR2 et TLR5, ce qui stimule la libération de cytokines (Adamo *et al.*, 2004; Balloy *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2018). Cela induit le recrutement des neutrophiles vers le lieu de l'infection ainsi que la production de mucus (Mohamed *et al.*, 2012). De plus, la nage de la bactérie médiée par le flagelle et sa liaison au mucus, vont faciliter l'élimination de la bactérie via les mécanismes de clairance de l'hôte comme la phagocytose et l'escalator muco-ciliaire (Amiel *et al.*, 2010; Feldman *et al.*, 1998; Lovewell *et al.*, 2011).

Le flagelle est donc un facteur de virulence important pour l'initiation puis l'aggravation de l'infection, mais qui est par la suite, facilement ciblé par le système immunitaire inné. Ainsi, cet appendice extracellulaire est réprimé lors du passage d'une infection aiguë vers une infection chronique. Cela explique que les souches environnementales et la plupart des isolats cliniques de *P. aeruginosa* sont flagellés et mobiles, contrairement aux souches retrouvées dans les infections chroniques. (Mahenthiralingam *et al.*, 1994; Wolfgang *et al.*, 2004).

B- Les pili de type IV

Les pili de type IV sont des appendices filamenteux de surface très flexibles. Chez *P. aeruginosa* il existe deux sous-classes de pili de type IV, selon la séquence primaire de la sous-unité piline : les IVa et IVb. Les pili de type IVa sont associés à la mobilité de type contraction (« twitching ») ainsi qu'à l'adhérence et la virulence de la bactérie, tandis que les pili de type IVb sont associés au transfert horizontal de gène (Carter *et al.*, 2010). Au sein des pili de type IVb, il existe encore une sous-classe nommée Tad (pour « Tight adherence pili »). *P. aeruginosa* peut présenter ces trois sous-classes de pili de type IV sur une même souche, mais chacun a un système d'assemblage séparé. Comme les pili de type IVb et Tad ne sont généralement pas associés à la mobilité et que leur implication dans la virulence n'est que peu décrite, je présenterai les pili de type IV en me référant à la sous-classe IVa.

1- Structure des pili de type IV

Chez *P. aeruginosa*, les pili de type IV sont polaires et chaque pilus mesure environ 6 nm de diamètre et jusqu'à plusieurs micromètres de long. Ces pili peuvent être situés au même pôle que le flagelle, le pôle opposé ou les deux pôles (Cowles *et al.*, 2013). Leur nombre dépend de l'état de la bactérie, si elle est sous forme planctonique ou exposée à une surface. En effet, l'assemblage polaire des pili est contrôlé par le contact de la bactérie avec des surfaces solides (Cowles and Gitai, 2010). Lavantie *et al.*, ont montré que, sous forme planctonique, seuls 30% des bactéries de *P. aeruginosa* ont des pili, avec en moyenne un seul pilus, mais que l'exposition à une surface (15 min) augmente considérablement ce pourcentage, ainsi que le nombre de pili par bactérie, qui peut être supérieur à 8 (Laventie *et al.*, 2019).

La structure du pilus de type IV peut être divisé en 4 sous-complexes (**Figure 7**) (Burrows, 2012; McCallum *et al.*, 2016; Wehbi *et al.*, 2011) :

- Un sous-complexe enchâssé dans la membrane externe, composé de la sécrétine PilQ et de sa lipoprotéine pilotine, PilF. Cette dernière participe à l'élongation du pilus ainsi qu'à la localisation et l'oligomérisation de la sécrétine PilQ, qui elle constitue un canal permettant la sortie du pilus en dehors de la bactérie.
- Un sous-complexe situé au niveau de la membrane interne, composé de PilC, PilD et de trois ATPase PilB, PilT et PilU. La prépiline peptidase PilD permet la biogénèse du pilus puisqu'elle clive la séquence signal des pilines afin d'obtenir des pilines matures. Ces pilines matures sont ensuite polymérisées par PilB et PilC qui fournissent l'énergie nécessaire pour cet assemblage alors que PilT et PilU sont impliquées dans leur dépolymérisation.
- Un complexe d'alignement, qui relie les composants des membrane cytoplasmique et externe (PilMNOP et FimV).
- La fibre constituant le pilus est quant à elle composée principalement de la piline majeure PilA puis vers l'extrémité, des pilines mineurs ainsi que l'adhésine PilY1.

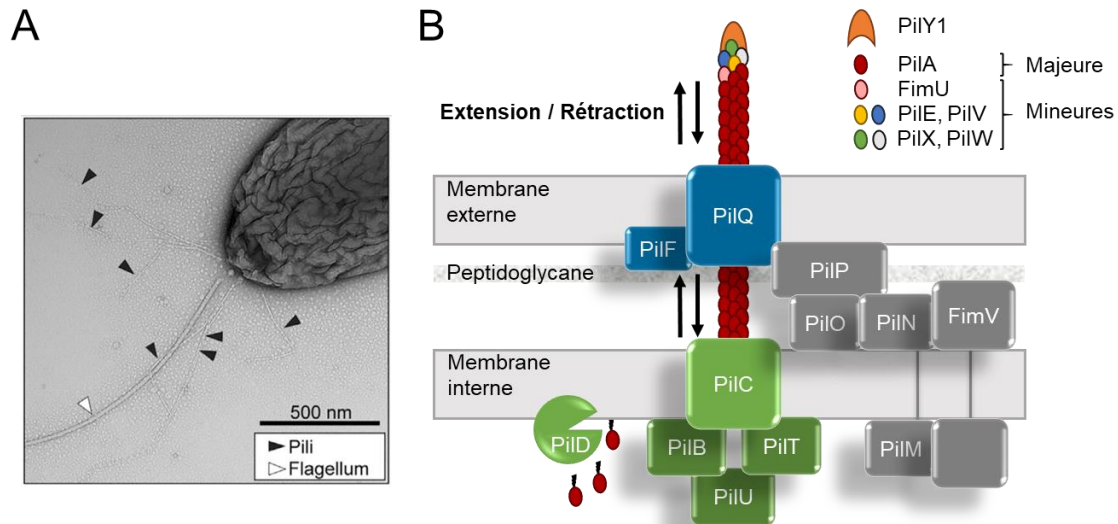


Figure 7: Pili de type IV de *P. aeruginosa*. A. Pili de type IV après 15 min d'exposition sur une surface solide vu en microscopie électronique (Laventie et al., 2019). B. Schéma d'un pilus. D'après (Burrows, 2012) et (Nguyen et al., 2015b)

2- Importance des pili de type IV dans la mobilité

Comme mentionné précédemment, les pili de type IV sont importants pour la mobilité de type « swarming » (Köhler *et al.*, 2000). Cependant, ils ne sont pas directement impliqués dans le déplacement mais permettent plutôt de renforcer l'association des bactéries entre-elles, afin d'engendrer et de coordonner ce mouvement collectif (Anyan *et al.*, 2014).

La mobilité des bactéries liée aux pili est principalement de type « twitching ». Il s'agit d'un mouvement de traction sur une surface solide, où les bactéries se regroupent pour former des « radeaux » et se déplacent linéairement le long de leur axe longitudinal. Ce mouvement est engendré par les mécanismes successifs de polymérisation puis dépolymérisation des pilines, permettant l'extension des pili, qui se fixent alors à la surface, puis se rétractent au niveau de leur base. Les bactéries se déplacent donc de manière saccadée, comme tractées par des grappins (Merz *et al.*, 2000; Talà *et al.*, 2019). Ce type de déplacement est activé à la suite de différents signaux environnementaux comme la présence de lipides, notamment les phosphatidyléthanolamines, la production d'alginate, la présence d'ADN extracellulaire ou encore la carence en fer (Whitchurch *et al.*, 1996; Kearns *et al.*, 2001; Patriquin *et al.*, 2008; Gloag *et al.*, 2013)

Enfin, les pili de type IV sont également impliqués dans deux autres modes de déplacement pour l'exploration locale, le « crawling » et le « walking ». Durant le crawling, la bactérie se déplace en rampant le long de son axe longitudinal tandis que durant le walking, la bactérie est

orientée verticalement, et « marche » de façon perpendiculaire à son axe. Selon le type de déplacement choisi, les bactéries pourront couvrir de grande distance ou explorer rapidement la zone sur laquelle elles sont attachées (Conrad *et al.*, 2011).

3- Importance des pili au cours de l'infection

Lors d'une infection, les pili sont essentiels pour l'adhésion des bactéries aux cellules. Il se lie à différents récepteurs se trouvant sur la partie apicale ou basolatérale des cellules épithéliales. En particulier les N-glycanes ou les glycosphingolipides, telles que les protéines asialo-GM1 et asialo-GM2 pour la partie apicale et les intégrines pour la partie basolatérale, via l'adhésine PilY1 (Sheth *et al.*, 1994; Bucior *et al.*, 2012; Heiniger *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2011).

Le rapprochement entre la bactérie et les cellules, permis par les pili de type IV, contribue à la virulence de *P. aeruginosa* (Comolli *et al.*, 1999a; Bucior *et al.*, 2012). La fonction d'adhésion des pili favorise notamment l'injection de toxines, via le système de sécrétion de type 3 (Heiniger *et al.*, 2010; Hayashi *et al.*, 2015; Golovkine *et al.*, 2016a; Sundin *et al.*, 2002). Basso *et al.*, ont également montré que les pili étaient nécessaires à l'activité cytotoxique de la « pore-forming » toxine ExlA, parce qu'ils favorisent un contact étroit et donc une concentration locale d'ExlA forte au niveau de la cellule cible (Basso *et al.*, 2017a). De plus, ces appendices sont essentiels au développement d'un biofilm mature, permettant à *P. aeruginosa* de persister sur le lieu de l'infection (Klausen *et al.*, 2003; Barken *et al.*, 2008).

La mobilité de type twitching générée par les pili, est aussi responsable de la virulence et de la dissémination des bactéries dans l'organisme (Alarcon *et al.*, 2009; Comolli *et al.*, 1999b; Zolfaghar *et al.*, 2003). Cependant les pili peuvent induire l'activation des facteurs de virulence, indépendamment de leur rôle joué dans la mobilité. Persat *et al.*, ont démontré que les pili de type IV était un système chimio-mécano-répondant qui, lors du contact avec une surface, stimulent la production d'AMPc, entraînant l'activation de gènes régulés par le facteur Vfr (Virulence Factor Regulator), dont certains facteurs de virulence (Siryaporn *et al.*, 2014; Persat *et al.*, 2015). Marko *et al.*, ont également démontré, dans un modèle d'infection aigüe chez *Caenorhabditis elegans*, que les pilines mineures et l'adhésine PilY1 participaient à l'activation des gènes de virulence (Marko *et al.*, 2018).

Néanmoins, les pili induisent une réponse inflammatoire. L'injection de protéines purifiées de piline est responsable du recrutement de leucocytes, ainsi que d'une inflammation locale dans un modèle murin d'infection pulmonaire aigüe (Tang *et al.*, 1995). De plus, la liaison de la piline avec les glycolipides asialylés (aGM1), qui sont associés au récepteur TLR2 sur la surface

apicale des cellules des voies respiratoires, provoque une cascade de réaction stimulant l'activation du facteur NF- κ B et l'expression de gènes pro-inflammatoires (Soong *et al.*, 2004).

Parmi les autres facteurs de virulence existant chez les bactéries, on distingue les systèmes de sécrétion, permettant la libération de protéines dans le milieu extérieur ou dans un autre organisme. *P. aeruginosa*, possède cinq des sept systèmes de sécrétion bactériens ; ceux de type 4 et 7 n'ayant pas identifiés chez cette bactérie (Green and Meccas, 2016).

C- Le système de sécrétion de type 2

Le SST2 permet la sécrétion de toxines et d'enzymes ayant, pour effet, de dégrader l'environnement proche de la bactérie. Les effecteurs de ce système franchissent les deux membranes des bactéries à Gram négatif par un processus en deux étapes. Ils sont d'abord pris en charge par la machinerie Sec ou Tat, selon l'état déplié ou replié de l'effecteur, afin de traverser la membrane interne et d'être exportés dans le périplasme. Cette étape s'accompagne du clivage du peptide signal situé en N-terminal, puis du repliement de l'effecteur. Ceux-ci sont ensuite transloqués à travers la membrane externe par le SST2, puis libérés dans le milieu extracellulaire (Voulhoux *et al.*, 2001; Douzi *et al.*, 2012).

1- Structure du SST2

Le SST2 est composé de 11 à 16 protéines différentes et peut se diviser en trois compartiments distincts (**Figure 8**) (Bleves *et al.*, 2010) :

- Une plateforme enchâssée dans la membrane interne, contenant une ATPase qui fournit l'énergie au système.
- Un canal de large diamètre, la sécrétine, située dans la membrane externe et qui reconnaît les effecteurs repliés du périplasme
- Un pseudopilus, qui fonctionne comme un piston, grâce à l'hydrolyse de l'ATP et qui permet d'expulser les effecteurs. Ce pseudopilus est composé d'un assemblage d'une pseudopiline majeure avec quatre pseudopilines mineures, exportées depuis le cytoplasme par la machinerie Sec

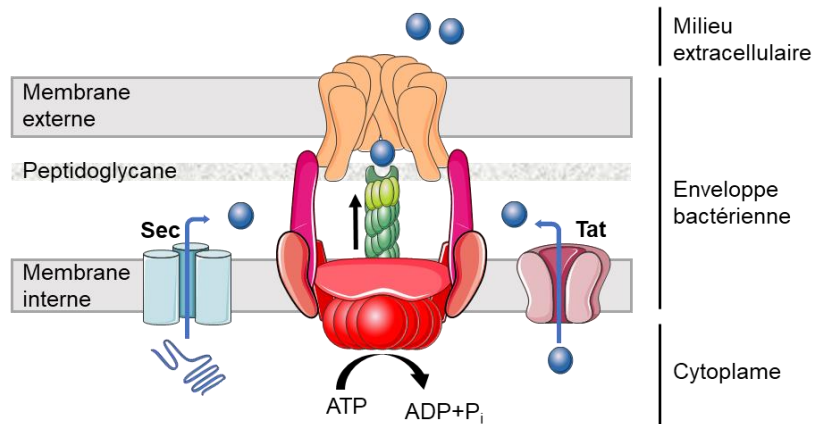


Figure 8: Représentation schématique du SST2 chez *Pseudomonas aeruginosa*. D'après (Douzi et al., 2012)

Il existe trois types de SST2, présentant la même organisation générale et qui peuvent fonctionner indépendamment les uns des autres. Le système Xcp, qui permet la sécrétion d'au moins 12 effecteurs différents, dont les principales toxines et enzymes de dégradation (Bleves *et al.*, 2010). Le système Hxc, actif uniquement dans les milieux de croissance faibles en phosphates et dédié à la sécrétion d'un seul effecteur, LapA, une phosphatase alcaline (Ball *et al.*, 2002; Cadoret *et al.*, 2014). Et enfin, le système Txc, présent uniquement dans la souche PA7 de *P. aeruginosa* et responsable de la sécrétion d'une protéine de liaison à la chitine, CbpE (Cadoret *et al.*, 2014).

2- Les principaux effecteurs du SST2 de type Xcp

Parmi les effecteurs principaux de ce système, on trouve l'exotoxine A, les protéases LasA et LasB, ainsi que les phospholipases C. Le SST2 peut également sécréter la protéase IV (PrpL), et des lipases comme LipA et LipC (Martínez *et al.*, 1999).

i- La protéase LasB

LasB est une métalloprotéinase importante pour la colonisation de l'hôte et la destruction des tissus. Elle entraîne la dégradation de plusieurs composants de la matrice extracellulaire comme le collagène, la fibronectine, la vitronectine et l'élastine. Elle clive également les protéines des jonctions serrées (occludine et claudine-1 et 4) et la VE-cadhérine (VE pour « vascular endothelial »), l'un des principaux composants des jonctions endothéliales. Cela conduit à la rupture des barrières tissulaires, ainsi qu'à l'invasion et la dissémination de la bactérie vers d'autres organes à travers le sang (Beaufort *et al.*, 2013; Nomura *et al.*, 2014; Golovkine *et al.*, 2014). LasB permet également de déjouer les défenses immunitaires de l'hôte. Elle clive les

protéines A et D du surfactant pulmonaire, normalement responsables de la clairance bactérienne et elle réduit la phagocytose des macrophages, ainsi que la production de certains composants immunitaires comme les cytokines et les protéines du complément (Mariencheck *et al.*, 2003; Bleves *et al.*, 2010; Bastaert *et al.*, 2018).

ii- La protéase LasA

Tout comme LasB, LasA a une activité élastolytique (clive l'élastine), mais cette activité est faible. Elle participe plutôt au renforcement de l'activité élastolytique de LasB. De plus, elle possède une activité staphylolytique, c'est-à-dire que la protéase est capable de cliver le peptidoglycane de *S. aureus*, permettant l'élimination de la bactérie (Peters and Galloway, 1990; Kessler *et al.*, 1997). Cela confère probablement un avantage sélectif à *P. aeruginosa* contre *S. aureus* lors de la compétition pour la colonisation du poumon, chez les patients atteints de mucoviscidose.

iii- L'exotoxine A ou ToxA

Il s'agit d'une toxine AB dont le domaine B (pour « Binding ») se fixe sur le récepteur CD91 de la cellule cible, permettant l'internalisation de la toxine. Après séparation avec son récepteur, ToxA est clivée, libérant ainsi son domaine A (pour « Activity »), qui subit un transport rétrograde jusqu'au réticulum endoplasmique (RE) avant de rejoindre le cytosol. Ce domaine inactive le facteur d'élongation EF-2 grâce à son activité ADP-ribosyltransférase, entraînant une inhibition de la synthèse des protéines et la mort cellulaire (Bleves *et al.*, 2010; Michalska and Wolf, 2015).

iv- Les phospholipases C

Lors d'une carence en phosphate, *P. aeruginosa* peut sécréter trois phospholipases C, qui sont PlcH, PlcN et PlcB. Ces enzymes dégradent les phospholipides des membranes cellulaires, diminuent la fonction du surfactant pulmonaire et déclenchent la libération de molécules inflammatoires (Holm *et al.*, 1991; König *et al.*, 1997; Terada *et al.*, 1999; Kipnis *et al.*, 2006; Ostroff *et al.*, 1990; Barker *et al.*, 2004). Par ailleurs, PlcH est une phospholipase hémolytique, capable de lyser des globules rouges et d'inhiber l'angiogenèse, tandis que PlcB participe au chimiotactisme de la bactérie et à la mobilité de type twitching (Barker *et al.*, 2004; Vasil *et al.*, 2009).

3- Importance du SST2 au cours de l'infection

Les toxines libérées par le SST2 sont essentielles pour la virulence de la bactérie, en particulier, l'exotoxine A et l'élastase LasB. En effet des bactéries déficientes en l'un ou l'autre de ces effecteurs sont moins virulentes dans des modèles d'infection murins (Miyazaki *et al.*, 1995; Bastaert *et al.*, 2015). L'activité de LasB sur les cellules et sur certains mécanismes de défense de l'hôte, explique son importance au cours de l'infection. D'une part, l'élastase protège la bactérie contre l'activité des macrophages alvéolaires. Elle dégrade les protéines du surfactant SP-A et SP-D, qui participent normalement à l'élimination de la bactérie en induisant la perméabilisation membranaire ou la phagocytose par les macrophages (Pikaar *et al.*, 1995; Mariencheck *et al.*, 2003; Beatty *et al.*, 2005; Kuang *et al.*, 2011). Elle dégrade aussi d'autres molécules importantes de l'immunité innée, comme certaines cytokines et molécules antimicrobiennes, ainsi que des facteurs du complément (Bastaert *et al.*, 2018; Kheir *et al.*, 2018; Saint-Criq *et al.*, 2018). D'autre part, LasB provoque le clivage de protéines jonctionnelles essentielles pour l'adhésion des cellules endothéliales entres-elles ou à la matrice, comme la VE-cadhérine, entraînant le détachement puis la destruction de ces cellules par apoptose (anoikis) (Beaufort *et al.*, 2013; Golovkine *et al.*, 2014). Le SST2 est donc essentiel lors de l'infection du système vasculaire par *P. aeruginosa* puisqu'il permet à la bactérie de briser la barrière endothéliale et d'échapper au système immunitaire de l'hôte.

De plus, bien que le SST3 soit le facteur de virulence principal de *P. aeruginosa*, des souches dépourvues de SST3, mais présentant un SST2 actif, induisent une mortalité avec cependant, un effet retard, dans un modèle de pneumonie aigüe chez des souris dépourvues de TLR2 et TLR4 (Jyot *et al.*, 2011). De même, Le Berre *et al.*, ont démontré que le SST3 et l'élastase étaient des facteurs de virulence importants dans un modèle murin de pneumonie aiguë (Le Berre *et al.*, 2011).

D-Le système de sécrétion de type 3

Il s'agit du facteur de virulence principal de *P. aeruginosa* au cours d'une l'infection aiguë. Ce système de sécrétion permet à la bactérie d'injecter des toxines (appelées également effecteurs) directement dans le cytosol des cellules cibles. Ces exotoxines sont : ExoS, ExoT, ExoU et ExoY. Le SST3 est donc capable de traverser les deux membranes bactériennes, ainsi que la membrane plasmique des cellules eucaryotes.

1- Structure du SST3

Le SST3 forme un injectisome composé d'au moins 25 protéines différentes et peut se diviser en trois compartiments distincts (**Figure 9**) (Hauser, 2009) :

- Un corps basal, enchâssé dans les membranes interne et externe de la bactérie et composé notamment de la protéine PscN qui catalyse la dissociation du complexe chaperonne/effecteur et fournit l'énergie nécessaire pour le transport et la sécrétion des effecteurs (Akeda and Galán, 2005; Halder *et al.*, 2019)
- Une aiguille, composée d'un assemblage de la protéine PscF, qui forme un cylindre creux à travers lequel passe les effecteurs. Cette structure mesure entre 60 et 120 nm de long et entre 6 et 10 nm de large. En revanche, le diamètre interne relativement petit de l'aiguille (2,0 à 2,5 nm), implique que les effecteurs soient dans un état déplié pour se déplacer dans cette structure (Pastor *et al.*, 2005; Matteï *et al.*, 2011)
- Le translocon, situé à la pointe de l'aiguille, formé des protéines PcrV, PopB et PopD, qui permet de libérer les effecteurs dans le cytosol des cellules eucaryotes. Seules PopB et PopD forment le pore dans la membrane de la cellule cible. PcrV n'en fait pas partie, bien qu'elle soit indispensable à sa formation (Goure *et al.*, 2004)

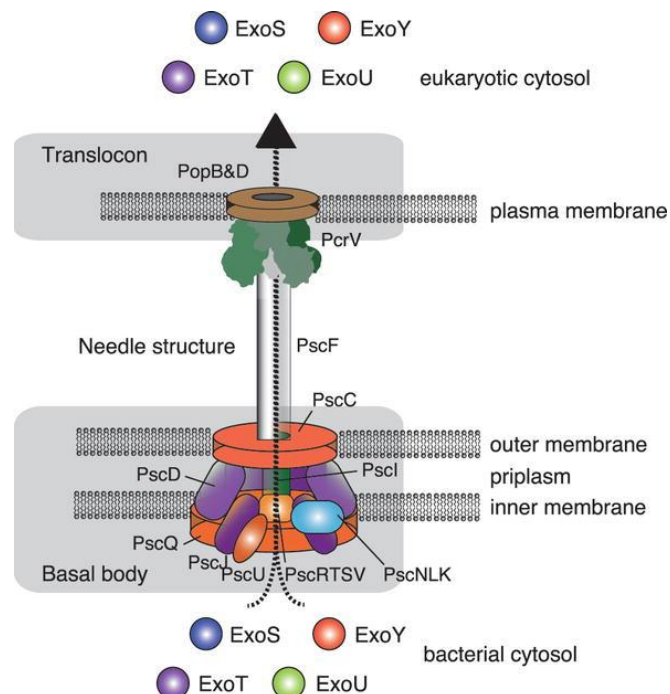


Figure 9: Le système de sécrétion de type 3 de *Pseudomonas aeruginosa*. (Naito et al., 2017)

La formation du pore, indépendamment de la translocation des toxines, peut altérer la perméabilité membranaire, l'épigénome des cellules et conduire à la mort cellulaire (Dacheux

et al., 2001; Hauser, 2009; Galle *et al.*, 2012a; Dortet *et al.*, 2018).

Certaines protéines du SST3 sont associées à des chaperonnes, dont les rôles sont de maintenir ces protéines dans le cytoplasme bactérien sous un état stable et de faciliter leur distribution au niveau du corps basal. Les chaperonnes ne sont en aucun cas exportées à travers le SST3, contrairement à leur effecteur. PscE et PscG sont par exemple les chaperonnes de PscF, tandis que PcrH est la chaperonne des protéines PopB et PopD. Concernant les effecteurs, SpcS est la chaperonne des exotoxines ExoS et ExoT, tandis que SpcU est la chaperonne d'ExoU. En revanche aucune chaperonne n'a été identifiée pour ExoY (Parsot *et al.*, 2003; Hauser, 2009; Galle *et al.*, 2012b).

2- Le contrôle de l'expression du SST3

Les gènes du SST3 sont sous le contrôle direct d'un régulateur transcriptionnel nommé ExsA, dont l'activité est dépendante de trois autres protéines, ExsC, ExsD et ExsE. En l'absence de signaux inducteurs, les protéines du SST3 sont exprimées à un niveau basal et ExsA est complexée à ExsD, ce qui empêche son activité. L'induction du SST3 par des signaux environnementaux comme le contact avec les cellules, la carence en calcium ou la présence d'albumine et de caséines, induit la translocation d'ExsE à travers le SST3. Cela permet à ExsC de se lier à ExsD et de libérer ExsA, qui peut alors se lier à la région promotrice des gènes du SST3 et les surexprimer (Kim *et al.*, 2005; Hauser, 2009; Galle *et al.*, 2012b; McMackin *et al.*, 2019).

D'autres facteurs peuvent jouer sur la transcription et la traduction d'ExsA et réguler ainsi l'expression du T3SS. On trouve notamment des systèmes à deux composants tels que RetS/LadS et GacA/GacS, le système de signalisation cAMP/Vfr et l'ARN régulateur non codant RsmA. (Yahr and Wolfgang, 2006; Diaz *et al.*, 2011; McMackin *et al.*, 2019).

3- Les effecteurs du SST3

Comme mentionné précédemment, quatre exotoxines majeures sont injectées par le SST3 de *P. aeruginosa* : ExoS, ExoT, ExoU et ExoY. Cependant, toutes les souches ne possèdent pas les gènes de ces quatre effecteurs. Ainsi, en général, tous les isolats possèdent le gène *exoT*, environ 89% ont le gène *exoY*, tandis que les gènes *exoS* et *exoU* sont mutuellement exclusifs et retrouvés respectivement dans 72 et 28% des isolats. Une exception est à noter malgré tout : la souche PA99, un isolat clinique sécrétant naturellement ExoS, ExoU et ExoT (Shaver and

Hauser, 2004). La prévalence de ces toxines dépend également de l'origine de la souche. Par exemple, les souches possédant le gène *exoU* sont plus fréquemment isolées dans les infections sanguines et les plaies infectées (40% des isolats), que chez les patients atteints de mucoviscidose (10%). A l'inverse, les souches possédant le gène *exoS* sont majoritairement retrouvées dans l'environnement et chez les patients atteints de mucoviscidose (Feltman *et al.*, 2001; Ozer *et al.*, 2019). De plus, les effecteurs sécrétés définissent le phénotype d'une souche pendant l'infection (**Figure 10**). Les souches exprimant ExoU (« PA14-like ») sont les plus cytotoxiques, tandis que les souches sécrétant ExoS (« PA01-like ») sont associées à un phénotype plus invasif (Finck-Barbançon *et al.*, 1997; Fleiszig *et al.*, 1997; Hauser, 2009; Schulert *et al.*, 2003; Shaver and Hauser, 2004).

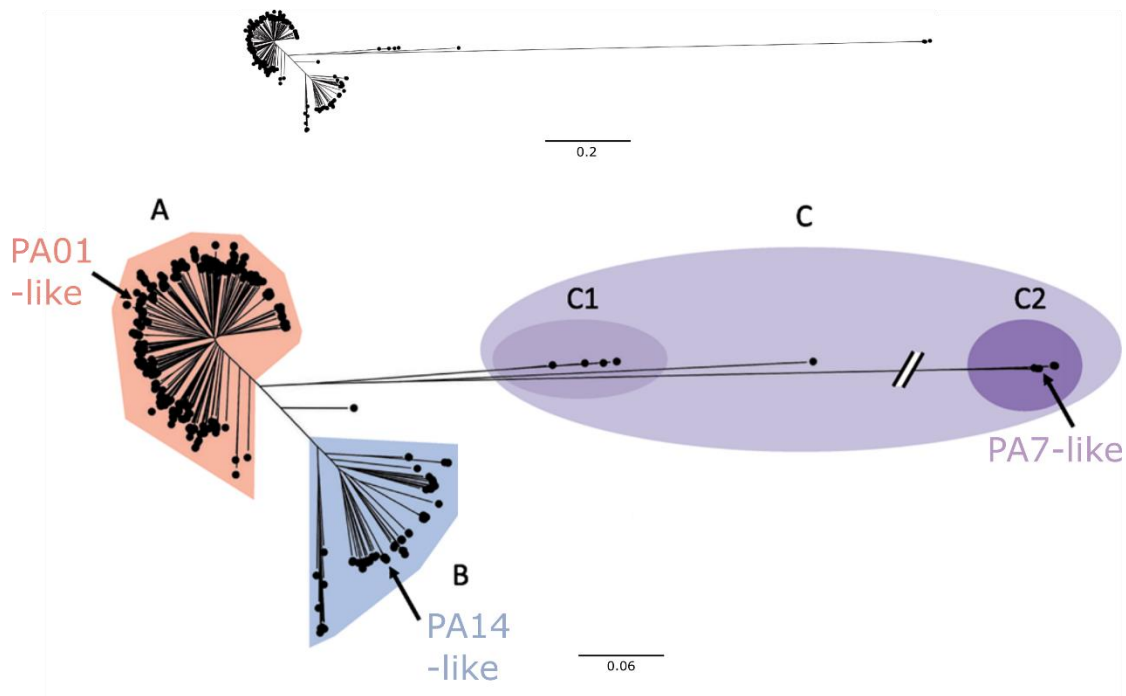


Figure 10: Arbre phylogénétique représentant la population d'isolats de *P. aeruginosa*. Les souches exprimant ExoU sont regroupées sous le nom « PA14-like », celles exprimant ExoS sous le nom « PA01-like » et les souches exprimant la toxine ExlA sont regroupées sous le nom « PA7-like ». D'après (Ozer *et al.*, 2019)

D'autres substrats peuvent être sécrétés par le SST3 de *P. aeruginosa*, comme certains composants flagellaires, la cytotoxine NDK (« Nucleoside Diphosphate Kinase ») et les effecteurs PemA et PemB. Cependant ces substrats sont très peu voire non cytotoxiques dans des modèles d'infection cellulaire, comparé aux quatre effecteurs classiques cités précédemment. (Burstein *et al.*, 2015; Ince *et al.*, 2015; Neeld *et al.*, 2014).

i- ExoU

ExoU est l'effecteur le plus toxique sécrété par le SST3 (Lee *et al.*, 2005). Elle est exprimée par environ un tiers des souches cliniques de *P. aeruginosa* et est associée au cas d'infection les plus sévères et aux lésions les plus importantes (Finck-Barbançon *et al.*, 1997; Feltman *et al.*, 2001; Schulert *et al.*, 2003; Shaver and Hauser, 2004; Park *et al.*, 2017). En outre, les souches possédant le gène *exoU* sont plus résistantes aux antibiotiques que les autres souches (Park *et al.*, 2017; Sawa *et al.*, 2014; Subedi *et al.*, 2018). Pour devenir active et induire une nécrose rapide des cellules, cette phospholipase requiert des facteurs eucaryotes (Hauser, 2009; Galle *et al.*, 2012b). Ces cofacteurs seront détaillés dans le chapitre suivant (**Chapitre 3**) ainsi que le mécanisme d'action de la toxine et ses effets sur les différents types cellulaires.

ii- ExoS

ExoS est une toxine bifonctionnelle de 453 acides aminés, ayant à la fois une activité GAP (« GTPase activating protein ») en N-terminal et une activité ADP ribosyl-transférase (ADPRT) en C-terminal. (Hauser, 2009).

Lors de son injection par le SST3 dans les cellules épithéliales, ExoS circule dans le cytoplasme. La toxine se lie dans un premier temps sur la face interne de la membrane plasmique, puis migre rapidement vers l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique. Ce transport rétrograde est permis par la liaison d'ExoS aux endosomes précoces (Rab5⁺) et tardifs (Rab9⁺), eux-mêmes fixés sur les microtubules. La toxine peut ensuite être recyclée vers la membrane plasmique mais ce trafic antérograde est moins bien détaillé pour l'instant (Deng *et al.*, 2007).

Au cours de son trafic vésiculaire, ExoS inactive plusieurs protéines. Le domaine GAP d'ExoS va cibler des petites GTPases telles que Rho, Rac et Cdc42, qui jouent un rôle important dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et qui contrôlent des voies de transduction de signal essentielles à la croissance cellulaire. Ce domaine, en maintenant ces petites GTPases sous une forme inactive liée au GDP, entraîne une dépolymérisation de l'actine via l'activation de la cofiline, puis l'arrondissement et la mort des cellules (Hauser, 2009; Huber *et al.*, 2014).

Le domaine ADPRT est le plus actif et cible également des petites GTPases telles que Ras, Rac et Cdc42, ainsi que la famille de protéines ERM (Ézrine, Radixine et Moésine) qui permettent de lier l'actine à la membrane plasmique (Maresso *et al.*, 2007). Le transfert de l'ADP-ribose vers ces protéines cibles (GTPases et ERM), inhibe leurs fonctions et entraîne également l'arrondissement des cellules via la désorganisation du cytosquelette d'actine, la rétraction cellulaire, puis la perte d'adhérence. De plus, l'inactivation de Ras conduit à l'inhibition de la

voie de signalisation MEK-ERK et diminue ainsi drastiquement la prolifération cellulaire (Henriksson *et al.*, 2000a). Il convient de préciser cependant que, contrairement aux cellules épithéliales, le démantèlement du cytosquelette d'actine et la perte d'adhésion focale dans les cellules endothéliales, est indépendant de l'inhibition des protéines ERM. En effet, dans ces cellules, ce processus dépend uniquement de l'inactivation séquentielle des GTPases Rho, Rac et Cdc42, puis de la voie Lim kinase (Huber *et al.*, 2014). En parallèle, l'activité ADPRT d'ExoS déclenche l'apoptose des cellules via l'activation de la voie JNK, conduisant au relargage du cytochrome *c* par les mitochondries et à l'activation de la caspase 9 (Jia *et al.*, 2003; Elsen *et al.*, 2013). Ce domaine inhibe également la synthèse d'ADN, le trafic vésiculaire et l'endocytose (Pederson and Barbieri, 1998; Kaufman *et al.*, 2000; Maresso *et al.*, 2004; Deng and Barbieri, 2008; Hauser, 2009). L'activation de ce domaine requiert toutefois la liaison d'ExoS avec un cofacteur de l'hôte, les protéines 14-3-3 (Fu *et al.*, 1993; Henriksson *et al.*, 2000b). La toxine interagit en effet avec ces protéines, principalement via des contacts hydrophobes entre la région dénommée « LDLA-box », comprenant les résidus 420 à 430, qui forment une vaste surface d'interaction hydrophobe et un sillon présentant des propriétés amphipathiques, localisé entre les résidus 165 et 220 des protéines 14-3-3 (**Figure 11**) (Masters *et al.*, 1999; Yasmin *et al.*, 2006; Ottmann *et al.*, 2007; Yasmin *et al.*, 2010). Selon Karlberg *et al.*, les protéines 14-3-3 activent le domaine ADPRT d'ExoS en chaperonnant la région « LDLA-box » pour éviter l'agrégation de la toxine avec elle-même (Karlberg *et al.*, 2018).

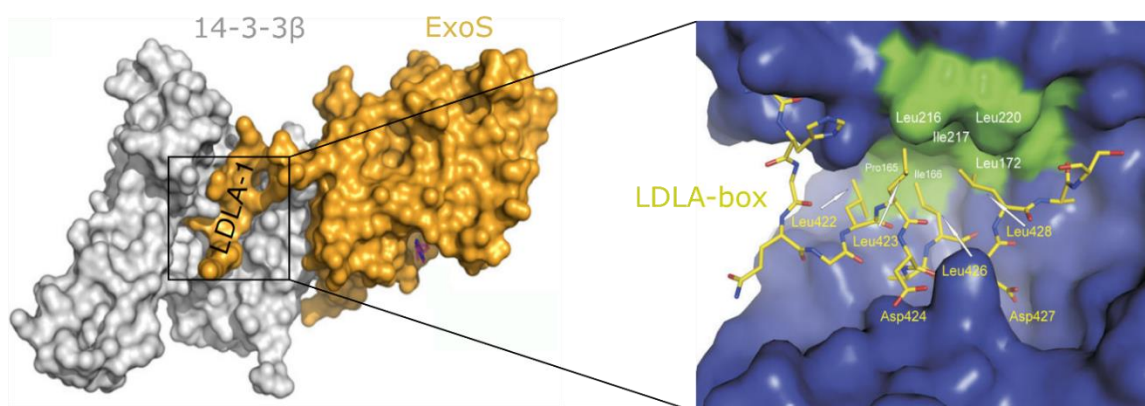


Figure 11: Interaction entre ExoS et une protéine 14-3-3. **A.** Représentation du complexe ExoS:14-3-3β. ExoS est représentée en or et un monomère de l'homodimère 14-3-3β est représenté en gris. La position de la boîte LDLA dans le sillon amphipathique est indiquée. D'après (Karlberg *et al.*, 2018). **B.** Interaction entre la « LDLA-box » d'ExoS, représentée par des bâtonnets, et le sillon de la protéine 14-3-3. Les résidus de cette protéine interagissant avec ExoS sont représentés en vert. D'après (Ottmann *et al.*, 2007).

Rangel *et al.* ont montré, dans un modèle murin de pneumonie, qu'ExoS inhibait l'activité de phagocytose des macrophages et des neutrophiles, favorisant la persistance de la bactérie (Rangel *et al.*, 2014; Rocha *et al.*, 2003). De plus, cette toxine induit la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires par les monocytes, contribuant à l'aggravation des lésions pulmonaires (Epelman *et al.*, 2000, 2004). Enfin, de par son action sur le cytosquelette des cellules épithéliales et endothéliales, ExoS facilite également la pénétration de *P. aeruginosa* à travers les tissus (Huber *et al.*, 2014; Soong *et al.*, 2008).

iii- *ExoT*

La toxine ExoT de *P. aeruginosa*, constituée de 457 résidus, partage 76% d'identité au niveau de sa séquence en acides aminés avec ExoS, et possède également une activité GAP et une activité ADPRT en N et C-terminal respectivement.

Le domaine GAP d'ExoT cible les mêmes GTPases qu'ExoS et provoque des effets similaires (Hauser, 2009; Kazmierczak and Engel, 2002). Ce domaine déclenche également la voie intrinsèque (ou mitochondriale) de l'apoptose. En effet, le domaine GAP d'ExoT provoque l'accumulation des protéines Bcl-2 pro-apoptotiques (Bax et Bid) dans la membrane mitochondriale, conduisant au relargage du cytochrome *c* et à l'activation des caspases 9 puis -3. Ce mécanisme est partiellement lié à l'activation de la voie JNK (Wood *et al.*, 2015b). En revanche, son domaine ADPRT, bien qu'activé de manière similaire par le même cofacteur eucaryote qu'ExoS, cible des protéines différentes. Ces protéines sont les Crk (« CT10 Regulator of Kinase) et la phosphoglycérate kinase 1, PGK-1 (Sun and Barbieri, 2003). L'ADP-ribosylation rend la protéine Crk cytotoxique et provoque l'apoptose des cellules par perte des contacts focaux. Plus précisément, l'ajout de ce groupement sur la protéine CrkI empêche sa liaison avec les protéines d'adhésion focale phosphorylées, p130^{cas} et la paxilline, ce qui perturbe leur localisation subcellulaire et déstabilise les contacts focaux. Par conséquent, les interactions cellules-matrice extracellulaire, assurés par les intégrines, sont diminuées et ce qui conduit à l'anoïkose des cellules (Deng *et al.*, 2005; Wood *et al.*, 2015a).

Même si ExoT est capable de bloquer la phagocytose et de perturber les barrières épithéliales pour faciliter la dissémination bactérienne, la virulence de *P. aeruginosa* liée à l'activité d'ExoT, dans un modèle de pneumonie aigüe, est mineure comparée à celle d'ExoS et d'ExoU (Garrity-Ryan *et al.*, 2000; Huber *et al.*, 2014; Shaver and Hauser, 2004). Cela peut s'expliquer par la dégradation rapide de la toxine par le protéasome de la cellule, suite à sa poly-ubiquitinylation par l'ubiquitine E3 Cbl-b (Balachandran *et al.*, 2007). En revanche, dans un

modèle d'infection de la cornée, ExoT est tout aussi toxique qu'ExoS ou ExoU et contribue à l'apoptose des neutrophiles ainsi qu'à la colonisation et la survie bactérienne (Lee *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2012).

iv- ExoY

ExoY est une nucléotidyl cyclase de 378 acides aminés, qui induit l'accumulation intracellulaire de plusieurs nucléotides cycliques, notamment le cGMP et le cUMP (Beckert *et al.*, 2014; Khanppnavar and Datta, 2018). L'augmentation des nucléotides cycliques, suite à l'injection d'ExoY, modifie l'expression de plusieurs gènes, dont des gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire et dans la défense antibactérienne de l'hôte. En particulier, ExoY supprime l'activation de TAK1, un régulateur essentielle de la voie MAPK, et par conséquence, inhibe également l'activation de la voie NF- κ B et la production de l'IL-1 β (He *et al.*, 2017; Jeon *et al.*, 2017). Ainsi la toxine empêche la production de cytokines pro-inflammatoires et permettrait donc à *P. aeruginosa*, d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. ExoY provoque également une désorganisation du cytosquelette ainsi que l'arrondissement des cellules (Yahr *et al.*, 1998; Cowell *et al.*, 2005; Ichikawa *et al.*, 2005; Hauser, 2009).

Belyy *et al.*, ont récemment identifié l'actine filamenteuse (F-actine) comme étant le cofacteur eucaryote activateur d'ExoY (Belyy *et al.*, 2016, 2018a). La présence de F-actine stimule en effet considérablement l'activité d'ExoY et perturbe le désassemblage spontané de l'actine, conduisant à la stabilisation de ces filaments. La toxine semble se lier latéralement le long des filaments, via des interactions hydrophobes entre son domaine C-terminal, notamment les résidus Phe-367 et Leu-371 et des résidus situés à proximité de l'Asp-25, un résidu polaire chargé négativement, exposé sur la face latérale de l'actine (**Figure 12**) (Belyy *et al.*, 2016, 2018b). D'autres régions d'ExoY semblent aussi contribuer à l'interaction avec l'actine filamenteuse.

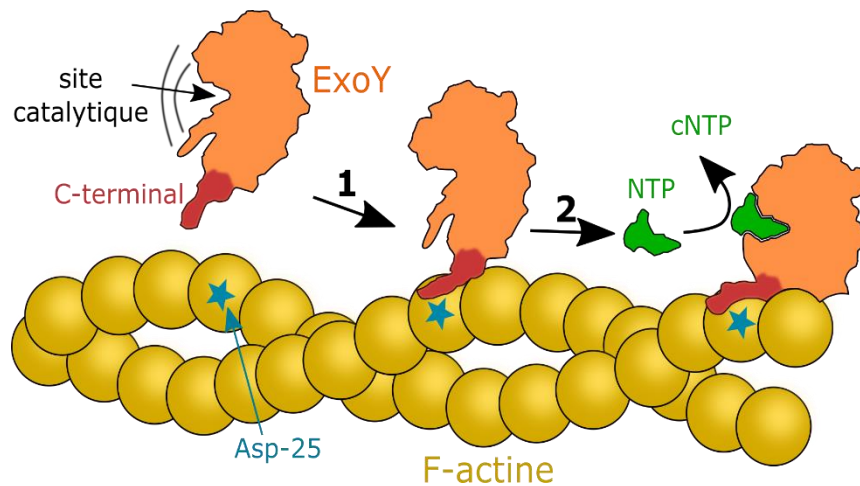


Figure 12: Modèle d'interaction entre ExoY et la F-actine. En l'absence de son activateur, ExoY est inactive, probablement en raison d'un centre catalytique très instable. Son activation se déroule en deux étapes : **Étape 1** : La région C-terminale (rouge) d'ExoY interagit avec la F-actine à proximité du résidu Asp-25. **Étape 2** : Une seconde interaction entre la toxine et l'actine, entraîne des changements conformationnels et la stabilisation du complexe, provoquant la réorganisation et l'activation du site catalytique d'ExoY.

Son rôle dans la pathogénicité de *P. aeruginosa* est encore controversé. Certaines publications démontrent que la sécrétion d'ExoY n'est pas associée à une augmentation de la virulence de la bactérie envers les cellules (Schulert *et al.*, 2003; Ganter *et al.*, 2009; Huber *et al.*, 2014; Jeon *et al.*, 2017), tandis que d'autres publications suggèrent qu'ExoY pourrait induire une augmentation de la perméabilité endothéliale, favorisant la dissémination de la bactérie (Ochoa *et al.*, 2012; Sayner Sarah L. *et al.*, 2004; Stevens *et al.*, 2014). Ces contradictions pourraient être attribuées aux différences souches utilisées, qui produisent des niveaux d'expression d'ExoY différents.

4- Importance du SST3 au cours de l'infection

L'expression du SST3 et de ses effecteurs est fortement corrélée avec la gravité de l'infection dans des modèles animaux de pneumonie, bactériémie, kératite ou de brûlure (Hauser, 2009; Howell *et al.*, 2013). D'ailleurs le blocage de PcrV dans plusieurs modèles murins d'infection, à l'aide d'anticorps anti-PcrV, permet de réduire le nombre de bactéries, d'atténuer l'inflammation et les blessures pulmonaires et d'augmenter la survie des souris (Frank *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2014; Warrener *et al.*, 2014). De même, le blocage du SST3 réduit la virulence de *P. aeruginosa* dans un modèle d'infection de *Galleria mellonella* (Ngo *et al.*, 2019) Il en est de même chez les patients infectés par *P. aeruginosa* où l'expression du SST3 est associée à l'augmentation de la morbidité et de la mortalité (Roy-Burman *et al.*, 2001; Hauser

et al., 2002; El-Solh *et al.*, 2012). En particulier, l'expression de la toxine ExoU est un facteur aggravant chez les patients atteints de pneumonie acquise en milieu hospitalier ou de bactériémie (El-Solh *et al.*, 2012; Schulert *et al.*, 2003).

E- Les autres systèmes de sécrétion

P. aeruginosa possède trois autres systèmes de sécrétion qui sont le SST1, le SST5 et le SST6

1- Le système de sécrétion de type 1

Ce système traverse les deux membranes des bactéries à Gram négatif et permet donc la sécrétion de protéines directement dans le milieu extra-cellulaire. Chez *P. aeruginosa* il existe deux systèmes de sécrétion de type 1, le système Apr et le système Has (Bleves *et al.*, 2010; Filloux, 2011).

Le système Apr permet la sécrétion de la protéase alcaline AprA et de la protéine AprX dont la fonction est inconnue (Bleves *et al.*, 2010; Duong *et al.*, 2001). La protéase alcaline dégrade les protéines du complément C1q, C2 et C3, ainsi que les cytokines TNF- α et IFN- γ , permettant à la bactérie d'échapper au système immunitaire inné et notamment la lyse par les neutrophiles (Hong and Ghebrehiwet, 1992; Laarman *et al.*, 2012; Parmely *et al.*, 1990). Elle dégrade également la fibrine et les monomères de flagelline, empêchant l'activation des récepteurs TLR5 et la production de cytokines pro-inflammatoires (Bardoel *et al.*, 2011; Kipnis *et al.*, 2006).

Le système Has (« Heme acquisition system ») permet quant à lui, la sécrétion d'une protéine de liaison à l'hème, HasAp (Filloux, 2011). Cet hémophore capture l'hème de l'hémoglobine qui est ensuite internalisé grâce au récepteur HasR (Wandersman and Delepelaire, 2004) permettant à la bactérie d'acquérir du fer pour ses fonctions métaboliques.

L'analyse du génome de *P. aeruginosa* a permis d'identifier d'autres systèmes de sécrétion de type 1, comme le système Tes qui sécrète la protéine TesG, un effecteur capable de supprimer la réponse inflammatoire de l'hôte au cours d'une infection chronique pulmonaire (Filloux, 2011; Zhao *et al.*, 2019).

2- Le système de sécrétion de type 5

La sécrétion de substrats par le SST5 se fait en 2 étapes. Les substrats sont d'abord transportés à travers la membrane interne par la machinerie Sec pour être libérés dans le périplasma, puis

ils sont pris en charge par un transporteur pour passer la membrane externe. Selon la façon dont le substrat est sécrété à travers la membrane externe, on distinguera deux types de SST5, les auto-transporteur et le système de sécrétion à deux partenaires (Bleves *et al.*, 2010)

Chez *P. aeruginosa* le SST5 permet notamment la sécrétion des protéines LepA, EstA et PlpD. LepA est une protéase qui active la réponse inflammatoire de l'hôte via les récepteurs PAR, mais qui contribue à la virulence et à la croissance de la bactérie *in vivo* (Kida *et al.*, 2008, 2011). EstA est une estérase impliquée dans la production de rhamnolipides, ainsi que dans la mobilité et la formation du biofilm, tandis que PlpD appartient à la famille de protéines « Patatin-like protein » et possède une activité phospholipase (Salacha *et al.*, 2010; Wilhelm *et al.*, 2007). Ce système est également responsable de la sécrétion de toxines comme PdtA et ExlA qui participent à la virulence de *P. aeruginosa* (Elsen *et al.*, 2014; Faure *et al.*, 2014). ExlA, pour Exolysine A, est une toxine porogène, sécrétée par des souches n'exprimant pas de SST3. Certaines de ces souches sont particulièrement virulentes grâce à la sécrétion d'ExlA (Elsen *et al.*, 2014; Reboud *et al.*, 2017a). Dans les macrophages, Basso *et al.*, ont démontré que le pore formé par ExlA, dans la membrane plasmique, entraînait un efflux potassique qui active la voie NLRP3 de l'inflammasome. Cette activation permet la maturation de l'IL-1 β via la caspase-1 et conduit à la mort des cellules par pyroptose (Basso *et al.*, 2017b). En revanche dans les cellules épithéliales et endothéliales, la formation du pore par ExlA induit un influx massif d'ions calciques, qui dans un premier temps, activent la métalloprotéase ADAM10 et provoquent le clivage des E- et VE-cadhérines. Ce mécanisme conduit ainsi à l'ouverture des jonctions intercellulaires et favorise la pénétration des bactéries dans le système sanguin et la dissémination des bactéries vers d'autres organes (Bouillot *et al.*, 2017; Reboud *et al.*, 2017b). Dans un deuxième temps, le flux de Ca²⁺ induit la mort cellulaire par osmolyse. Basso *et al.*, ont également montré que les pili de type IV étaient nécessaires pour l'activité toxique d'ExlA sur les cellules épithéliales, certainement en favorisant le rapprochement entre les surfaces bactériennes et mammifères. Par ce processus, la concentration locale d'ExlA au niveau de la membrane de la cellule hôte augmente considérablement, favorisant probablement l'oligomérisation de la toxine et la formation de pores (Basso *et al.*, 2017a).

3- Le système de sécrétion de type 6

Le SST6 fonctionne comme un système de perforation, similaire à celui utilisé par les phages et permet l'injection de toxines dans différents organismes (Chen *et al.*, 2015; Filloux, 2011; Pena *et al.*, 2019). Il existe trois SST6 chez *P. aeruginosa*, le SST6-1, -2 et -3 (Bleves *et al.*,

2010; Chen *et al.*, 2015). Le SST6-1 ne cible que les procaryotes et injecte trois substrats nommés Tse1–3, dont la toxine Tse2, qui stoppent la croissance bactérienne chez les bactéries ne possédant pas le facteur d’immunité correspondant (Hood *et al.*, 2010). Ce système est exprimé au cours d’infections chroniques et contribue donc à la colonisation de l’hôte par *P. aeruginosa* dans une communauté microbienne complexe (Mougous *et al.*, 2006). A l’inverse, les SST6-2 et -3 peuvent cibler les cellules procaryotes et eucaryotes. Ces systèmes injectent des phospholipases D, nommées PldA pour le SST6-2 et PldB pour le SST6-3. Ces phospholipases exercent une activité antibactérienne et facilitent l’internalisation de la bactérie dans les cellules épithéliales (Jiang *et al.*, 2014; Russell *et al.*, 2013). Le rôle du SST6 est donc de faciliter la croissance et la colonisation de *P. aeruginosa*, au cours d’une infection, vis à-vis des autres bactéries de l’hôte (Sana *et al.*, 2016)

F- Les autres facteurs de virulence

1- Les lipopolysaccharides

Les lipopolysaccharides (LPS) tapissent l’extérieur de la membrane externe de *P. aeruginosa*. Ils se composent de trois parties : une chaîne lipidique hydrophobe (lipide A), permettant l’ancrage à la membrane, un cœur oligosaccharidique hydrophile (noyau) sur lequel est rattaché une chaîne polysaccharidique variable (antigène O), dépassant de la membrane externe.

Les LPS permettent l’adhésion de *P. aeruginosa* sur les cellules épithéliales via les récepteurs α GM1 et CFTR (Gupta *et al.*, 1994; Schroeder *et al.*, 2002). De plus, le LPS peut se fixer sur les récepteurs TLR4 des macrophages et des cellules épithéliales, entraînant une réponse rapide du système immunitaire par la production de cytokine (Bäckhed *et al.*, 2002; Hajjar *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2008; Rossol *et al.*, 2011).

2- Les chromophores

P. aeruginosa sécrète trois chromophores qui sont la pyoverdine, la pyocheline et la pyocyanine. Deux sont des sidérophores : la pyoverdine et la pyocheline. La pyoverdine est exprimée lors de la colonisation du poumon et favorise l’acquisition du fer pour la croissance bactérienne (Haas *et al.*, 1991). De plus, la liaison de la ferri-pyoverdine (pyoverdine ayant captée du fer) avec son récepteur membranaire bactérien, FpvA, induit la transcription des gènes de synthèse de la pyoverdine ainsi que de certains facteurs de virulence comme la protéase PrpL et l’exotoxine A (Lamont *et al.*, 2002). La pyocheline et plus précisément la ferri-

pyocheline, agit quant à elle en synergie avec la pyocyanine pour générer des radicaux libres cytotoxiques qui vont endommager les cellules épithéliales (Britigan *et al.*, 1992).

La pyocyanine est également impliquée dans d'autres mécanismes de virulence. Elle inactive l'inhibiteur de protéases α 1PI, augmentant ainsi les lésions des cellules des voies respiratoires et des cellules endothéliales (Britigan *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 1996). Elle provoque aussi la production d'IL-8 et l'apoptose des neutrophiles et inhibe la signalisation cellulaire et le battement ciliaire (Allen *et al.*, 2005; Denning *et al.*, 1998a, 1998b; Rada and Leto, 2013). Ainsi des bactéries déficientes en pyocyanine sont moins virulentes *in vivo* (Allen *et al.*, 2005; Lau *et al.*, 2004).

3- Les rhamnolipides

Les rhamnolipides sont des biosurfactants glycolipidiques, sécrétés à la surface des bactéries, qui jouent plusieurs rôles au cours de l'infection. Tout d'abord ils protègent la bactérie contre les mécanismes de défense de l'hôte. Ils perturbent la clairance mucociliaire, inhibent la phagocytose et induisent la nécrose des neutrophiles (Jensen *et al.*, 2007; Kanthakumar *et al.*, 1996; McClure and Schiller, 1996). L'inhibition de la synthèse des rhamnolipides réduit en effet la persistance de *P. aeruginosa* au niveau des poumons de souris infectées (Van Gennip *et al.*, 2009). Ensuite, ils sont importants pour l'infection des tissus. Ils ont une activité hémolytique et antimicrobienne et sont capables d'induire la lyse des amibes *Dictyostelium discoideum* (Cosson *et al.*, 2002; Fujita *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 2005). Au niveau des voies respiratoires, les rhamnolipides altèrent les jonctions serrées, favorisant l'invasion paracellulaire de *P. aeruginosa* (Zulianello *et al.*, 2006). Enfin, les rhamnolipides stabilisent le biofilm mature et sont impliqués dans la nage des bactéries de type « swarming » (Caiazza *et al.*, 2005; Davey *et al.*, 2003).

G-Coordination des facteurs de virulence de *P. aeruginosa* au cours d'une infection

1- Investigation et colonisation des surfaces grâce au flagelle et aux pili de type 4

Comme expliqué précédemment, ces deux appendices sont des facteurs essentiels pour la mobilité et la pathogénicité de *P. aeruginosa*. Ils présentent des caractéristiques différentes, notamment au niveau de l'adhésion et du type de déplacement induit. Ainsi au cours d'une

infection, certaines bactéries vont être flagellées, tandis que d'autres présenteront des pili. Cela permettra, pour une même population bactérienne, d'utiliser les avantages de ces deux types d'appendice pour investiguer et rechercher, sur une surface cellulaire, une voie de transmigration idéale. En effet, pendant que les bactéries exprimant des pili scannent localement la surface et interagissent fortement avec celle-ci, les bactéries flagellées vont explorer d'autres secteurs plus éloignés (Golovkine *et al.*, 2016b). De plus, ces deux appendices permettent aux bactéries de résister à l'écoulement des fluides biologiques qui tentent de les évacuer.

Ces deux appendices coopèrent également au cours de l'infection pour booster la colonisation de surface et la dissémination. Laventie *et al.*, proposent un programme coopératif de virulence appelé « Touch-Seed-and-Go » dans lequel, à la suite du contact avec une surface (Touch) une division asymétrique s'opère et conduit à une bactérie « mère » flagellée et une bactérie « fille » comportant des pili. Cette bactérie fille reste attachée à la surface (Seed) et stimule la production d'AMPc via les pili de type IV, induisant l'expression de facteurs de virulence et donc la colonisation du tissu. En revanche, la bactérie mère, toujours flagellée, peut quant à elle se détacher et renager pour coloniser d'autres sites plus éloignés (Go) (Figure 13) (Laventie *et al.*, 2019).

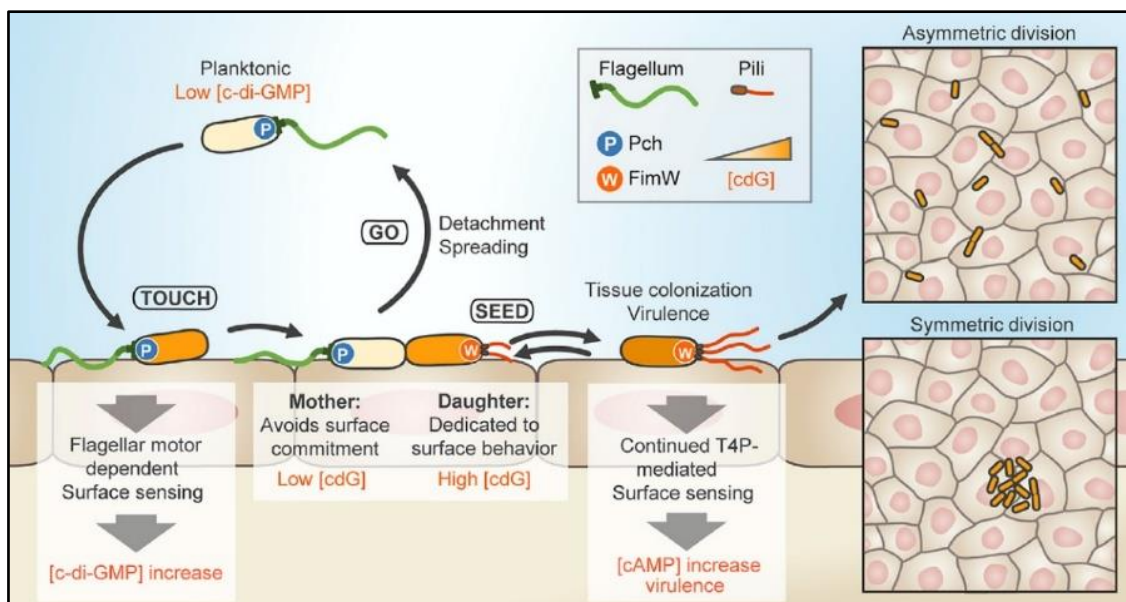


Figure 13: Modèle « Touch-Seed-and-Go » mettant en avant la coopération du flagelle et les pili de type IV pour la colonisation de surface par *P. aeruginosa* (Laventie *et al.*, 2019).

2- Coopération des facteurs de virulence pour la traversée des barrières tissulaires

P. aeruginosa est incapable de traverser un épithélium polarisé avec des jonctions serrées continues. Ainsi, pour transmigrer à travers l'épithélium, la bactérie va rechercher des zones spécifiques entre les cellules et utiliser plusieurs facteurs de virulence pour dégrader ces interstices et accéder au niveau basal. Golovkine *et al.* ont en effet démontré que l'interruption des jonctions serrées entre les cellules épithéliales, lors des divisions ou extrusions cellulaires, est exploitée par *P. aeruginosa* pour accéder à la face basolatérale des cellules (Golovkine *et al.*, 2016a). Profitant d'un point de faiblesse dans la mise en place des jonctions, par exemple lors d'un remodelage tissulaire, les bactéries utilisent les pili de type 4 pour se fixer sur la paroi latérale des cellules et injecter les toxines du SST3, entraînant ainsi une rétraction cellulaire et l'ouverture d'une voie plus large pour la transmigration d'autres bactéries. De plus, le flagelle joue un rôle important dans la migration des bactéries vers ces zones particulières, en permettant aux bactéries de rejoindre plus rapidement la zone où la jonction est rompue.

Une fois le compartiment basal atteint, les pili de type IV permettent une mobilité de type twitching sous les cellules, afin d'accéder aux cellules environnantes. Les protéases sécrétées par les bactéries (LasB et AprA) clivent alors les protéines de la membrane basale (laminines, collagène) et favorisent la progression bactérienne, tandis que les toxines injectées par le SST3 permettent de rétracter les cellules voisines. Ainsi *P. aeruginosa* combine plusieurs facteurs de virulence pour pénétrer dans les tissus puis disséminer et propager l'infection de façon concentrique (Heiniger *et al.*, 2010; Golovkine *et al.*, 2016a, 2018).

Contrairement aux jonctions adhérentes des cellules épithéliales, où la E-cadhérine est réfractaire au clivage par *P. aeruginosa*, la barrière endothéliale est plus vulnérable à l'invasion. La protéase LasB, sécrétée par le SST2 clive effectivement la VE-cadhérine, une protéine adhésive majeure des jonctions inter-endothéliales. Cette protéolyse induit une rupture des jonctions intercellulaires et favorise l'intoxication des cellules au niveau basolatéral par le SST3. Ainsi le SST2 et le SST3 coopèrent également pour passer la barrière vasculaire et provoquer la rétraction de ces cellules (Golovkine *et al.*, 2014, 2018).

En revanche, les bactéries ne possédant pas de SST3 mais exprimant la toxine porogène ExlA, sont capables de franchir les jonctions adhérentes de l'épithélium et de l'endothélium. En effet, comme indiqué plus haut, les E- et VE-cadhérines sont sensibles à la protéase ADAM10, activée par la formation du pore et l'influx de calcium dans les cellules par ExlA (Reboud *et al.*, 2017b; Golovkine *et al.*, 2018).

Chapitre 3

ExoU et ses cofacteurs eucaryotes

La toxine ExoU a été identifiée pour la première fois chez *P. aeruginosa* en 1997 par l'équipe de Dara W. Frank et rendue responsable de la cytotoxicité de certaines souches observée dans des modèles *in vitro*, ainsi que des lésions sévères de l'épithélium dans un modèle d'infection pulmonaire aiguë (Finck-Barbançon *et al.*, 1997). Depuis, beaucoup d'études se sont consacrées à la caractérisation des différentes structures de la toxine, son mécanisme d'action et ses effets sur les cellules et organismes ciblés par *P. aeruginosa*. En effet, ExoU est l'effecteur le plus toxique sécrété par le SST3 et induit une mort rapide des cellules, en 1 à 2 heures. Cette mort cellulaire se caractérise par une perte d'intégrité de la membrane plasmique, compatible avec la nécrose (Hauser, 2009).

A-ExoU est une phospholipase A2 bactérienne

1- Les différents domaines de la toxine

Le gène *exoU* de 2064 bp est situé juste en amont du gène *spcU* qui code pour la chaperonne d'ExoU. Tous deux sont localisés dans l'îlot de pathogénicité 2 (PAPI-2), une séquence d'insertion de 11-kb, retrouvée dans le génome chromosomique des souches ExoU⁺ et comportant notamment des gènes dédiés à la virulence chez les plantes et les animaux (**Figure 14A**) (He *et al.*, 2004).

La structure d'ExoU a été résolue en complexe avec SpcU car la protéine seule est trop instable pour pouvoir être cristallisée (Benson *et al.*, 2011). Il convient d'ailleurs de noter que le complexe ExoU-SpcU, dans la bactérie, a une stœchiométrie de 1:1, (Gendrin *et al.*, 2012; Halavaty *et al.*, 2012).

Tandis que SpcU est une petite protéine de 15 kDa comportant 137 acides aminés, ExoU est une protéine soluble de 74 kDa (687 acides aminés) et est composée de quatre principaux domaines, chacun remplissant une fonction spécifique pour la toxine (**Figure 14B**) (Gendrin *et al.*, 2012; Halavaty *et al.*, 2012). Le premier domaine, situé en N-terminal, composé des acides

aminés 52 à 100, correspond à une séquence spécifique permettant l'interaction de la toxine avec sa chaperonne bactérienne SpcU, bien que SpcU se lie également à d'autres régions d'ExoU (Gendrin *et al.*, 2012; Halavaty *et al.*, 2012). Ce domaine est noté CBS pour « Chaperonne Binding Site » (Finck-Barbançon *et al.*, 1998). Il est suivi d'un domaine PLP pour « Patatin-Like Phospholipase », acides aminés 106 à 471, responsable de l'activité phospholipase de la toxine (Finck-Barbançon and Frank, 2001) (voir la partie suivante sur les PLA2 eucaryotes). Cette séquence contient en effet une dyade catalytique constituée des résidus Ser-142 et Asp-344, identiques aux phospholipases A2 cytosoliques et calcium-indépendantes, retrouvées chez les mammifères (respectivement cPLA2 et iPLA2) (Sato *et al.*, 2003). Enfin, l'extrémité C-terminale se compose de deux domaines. Un domaine nécessaire à la localisation membranaire de la toxine, dénommé MLD (« Membrane Localization Domain ») et composé des résidus 588 à 687, ainsi qu'un domaine « bridging », comprenant les résidus 480 à 580 (Rabin *et al.*, 2006). Des mutations par substitution ou délétion, des résidus compris dans le domaine MLD, provoquent en effet une perte de la localisation membranaire de la toxine (Rabin and Hauser, 2003, 2005; Rabin *et al.*, 2006; Stirling *et al.*, 2006; Schmalzer *et al.*, 2010; Veessenmeyer *et al.*, 2010; Gendrin *et al.*, 2012; Tyson *et al.*, 2015; Tessmer *et al.*, 2017). Cela corrobore les précédents résultats montrant que les domaines MLD retrouvés dans d'autres toxines bactériennes, sont nécessaires à leur localisation membranaire (Geissler *et al.*, 2010, 2012). Pour le domaine « bridging », celui-ci pourrait servir de plateforme pour placer les domaines adjacents, le domaine catalytique et celui de liaison à la membrane, à proximité (Gendrin *et al.*, 2012). Ces deux domaines situés à l'extrémité C-terminale d'ExoU, interagissent avec des facteurs eucaryotes afin d'activer l'activité lipase de la toxine et d'induire la mort cellulaire (Rabin and Hauser, 2005; Schmalzer *et al.*, 2010; Veessenmeyer *et al.*, 2010). L'identité ainsi que l'interaction de ces cofacteurs eucaryotes avec ExoU seront détaillées dans les paragraphes suivants. Plusieurs domaines sont donc responsables de la toxicité d'ExoU, chacun jouant un rôle spécifique pour l'activité, la conformation et la localisation de la toxine dans les cellules hôtes (Finck-Barbançon and Frank, 2001; Rabin and Hauser, 2005).

Un autre domaine a pu être identifié. Il s'agit de la séquence de signalisation située en N-terminal, formée par les quinze premiers acides aminés, qui correspond à un motif commun présent dans la partie N-terminale des autres toxines du SST3. Cette séquence pourrait être impliquée dans la reconnaissance des toxines par le système de sécrétion de type 3, afin qu'elles soient sécrétées (Finck-Barbançon *et al.*, 1997; Hauser, 2009).

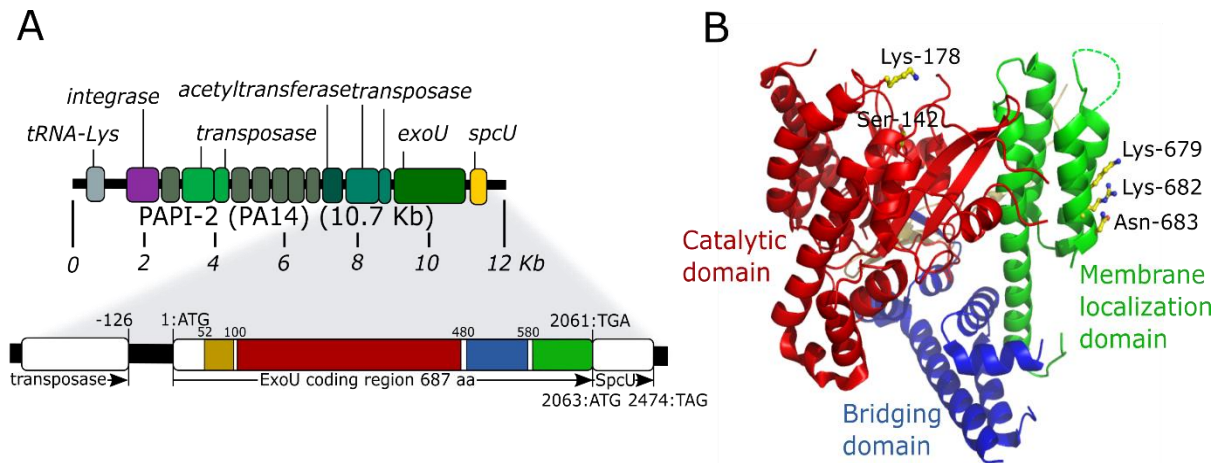


Figure 14: Structure du gène *exoU* et de la protéine ExoU. **A.** Représentation schématique de l'îlot de pathogénicité 2 (PAPI-2) contenant le gène *exoU*. D'après (Sawa et al., 2016). **B.** La structure cristalline d'ExoU avec ses quatre domaines distincts. D'après (Gendrin et al., 2012)

2- Le complexe ExoU-SpcU avant l'injection de la toxine dans les cellules

Dans les bactéries possédant la toxine, ExoU est associée à sa chaperonne SpcU, ce qui a pour effet de séquestrer la toxine dans le cytosol bactérien sous une forme inactive. Cette interaction permet effectivement d'abriter et de fermer le site catalytique d'ExoU par une région vraisemblablement flexible, rendant inaccessible ce site aux substrats lipidiques de la membrane plasmique. L'Asp-344 est notamment localisé dans cette région flexible. Une modification structurale est donc nécessaire afin de déplacer cette région et de permettre l'accès au substrat dans le site actif (Gendrin *et al.*, 2012). Cet arrangement structural est très similaire à celui de la cPLA2 humaine (Dessen *et al.*, 1999).

Lors du rapprochement de la bactérie avec des cellules cibles, le complexe ExoU-SpcU migre vers le SST3, où l'hydrolyse de l'ATP par l'ATPase PscN, permet de dissocier ExoU de sa chaperonne. La toxine est ensuite dépliée et sécrétée à travers l'aiguille de ce système afin d'être injectée dans le cytoplasme des cellules cibles (Akeda and Galán, 2005; Halder *et al.*, 2019). Il est important de noter que SpcU est requis pour une sécrétion maximale d'ExoU mais que la chaperonne n'est pas sécrétée dans la cellule hôte avec la toxine (Finck-Barbançon *et al.*, 1998).

3- Similarités entre le domaine PLP d'ExoU et celui des PLA2 eucaryotes

i- Les différentes PLA2 eucaryotes

Les phospholipases A2 (PLA2s) sont une famille d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des

phospholipides membranaires en position sn-2, libérant ainsi un acide gras libre, comme l'acide arachidonique, et un lysophospholipide (**Figure 15**). Les PLA2s sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires tels que le métabolisme lipidique, la transduction de signal, la défense de l'hôte et la modulation de la réponse inflammatoire via les médiateurs lipidiques produits (Burke and Dennis, 2009; Dennis, 1994; Funk, 2001; Henderson, 1987; Ricciotti Emanuela and FitzGerald Garret A., 2011; Rivera and Chun, 2008). Selon leur localisation, leur structure et leur activité, elles sont divisées en quinze groupes qui sont regroupés sous cinq grandes catégories (Burke and Dennis, 2009; Dennis, 1994; Schaloske and Dennis, 2006). Ainsi, on distingue :

- Les PLA2 sécrétées (sPLA2)
- Les PLA2 cytosoliques (cPLA2)
- Les PLA2 indépendantes du calcium (iPLA2)
- Les PLA2 associées aux lipoprotéines (Lp-PLA2) ou acétyl-hydrolases activatrices des plaquettes (PAF-AH)
- Les PLA2 lysosomales

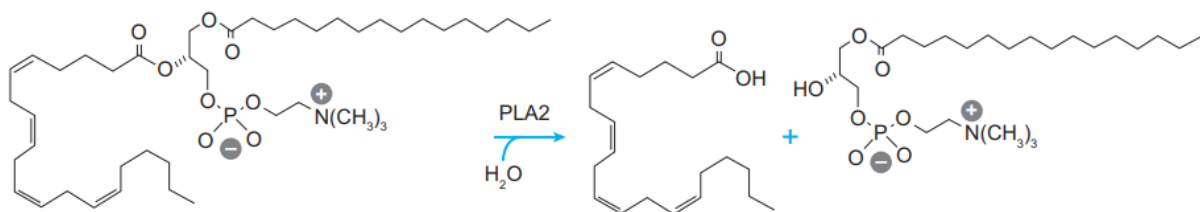


Figure 15: Hydrolyse d'un lipide membranaire en position sn-2 par une PLA2 (Lambeau and Gelb, 2008)

ii- Homologies entre ExoU et les cPLA2 et iPLA2 eucaryotes

La patatine représente une famille de glycoprotéines, retrouvée abondamment dans les tubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) et qui sert de protéine de stockage. Cependant elle présente également une activité estérase, avec un grand nombre de substrats lipidiques, comme les phospholipides (Jiménez-Atiénzar *et al.*, 2003). Sato *et al.*, ont été les premiers à identifier un domaine phospholipase de type patatine (PLP) dans la séquence d'ExoU (Sato *et al.*, 2003). La toxine présente en effet trois régions hautement conservées, typiques des domaines PLP retrouvés dans les patatines végétales et les PLA2 humaines, telles que les iPLA2 et les cPLA2 (**Figure 16**). Ces trois régions représentent :

- Un motif riche en glycine, formant un trou d'oxyanion, permettant de positionner la fonction ester du substrat et de stabiliser le complexe enzyme-substrat (Dessen *et al.*, 1999).
- Un motif de type sérine-hydrolase suivi d'un motif comportant un résidu aspartate, formant une dyade catalytique impliquée dans l'attaque nucléophile de l'ester du substrat, en position sn-2 (Dessen *et al.*, 1999).

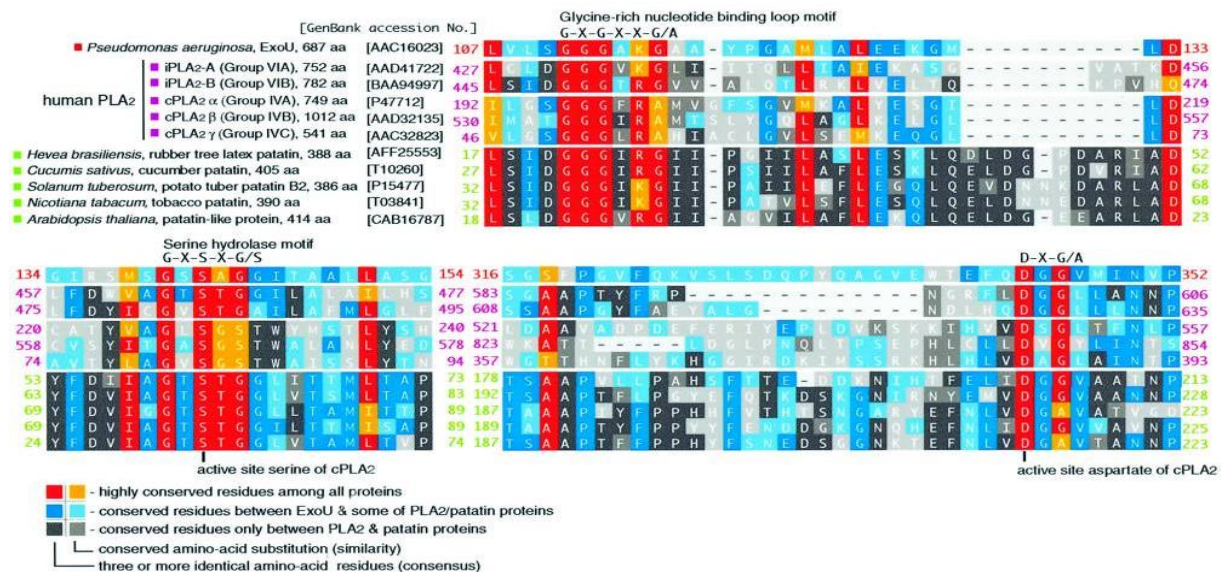


Figure 16: Alignement des domaines phospholipases A2 de type patatine, retrouvés dans la toxine ExoU de *P. aeruginosa* et dans les iPLA2 et cPLA2 humaines ainsi que dans les patatines végétales (Sato *et al.*, 2003).

Ainsi, cette dyade est responsable de l'activité lipase d'ExoU et donc de son activité cytotoxique. L'utilisation d'inhibiteurs de l'activité lipase des iPLA2 et cPLA2, ou de l'activité lipase d'ExoU, comme la pseudolipase A, réduit en effet la cytotoxicité d'ExoU, lors de l'infection de levures ou de cellules de mammifères traitées préalablement avec ces composés (Phillips *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2003; Tamura *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2007). De plus, l'introduction de mutations faux-sens dans cette dyade, induit également une perte de l'activité lipase et rend la toxine non cytotoxique (Gendrin *et al.*, 2012; Pankhaniya *et al.*, 2004; Phillips *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2003). Cela corrobore et explique les observations phénotypiques, qui montraient une perte de l'intégrité membranaire, conduisant à une mort cellulaire par nécrose plutôt que par apoptose, suite à une infection par une souche ExoU⁺. Le domaine PLP d'ExoU est effectivement responsable de la lyse des lipides membranaires et donc de la destruction des membranes cellulaires (Apodaca *et al.*, 1995; Hauser and Engel, 1999; Pankhaniya *et al.*, 2004; Phillips *et al.*, 2003). En particulier, la toxine est responsable du clivage d'une large gamme de

phospholipides et de lysophospholipides (Tamura *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2005).

Des domaines de type PLP ont également été identifiés au niveau de protéines provenant d'autres bactéries, pathogènes ou non, comme *Mycobacterium tuberculosis*, *Vibrio cholerae* et *Pseudomonas putida* (Banerji and Flieger, 2004).

Comme précisé dans **Introduction - Chapitre 2D**, le diamètre interne relativement petit de l'aiguille du SST3, implique que les effecteurs soient dans un état déplié pour se déplacer dans cette structure. Ainsi, ExoU est injectée sous forme dépliée dans le cytoplasme des cellules cibles et est donc inactive. Bien que son mécanisme d'activation reste encore mal défini, certaines protéines eucaryotes ont été identifiées comme cofacteurs, interagissant directement avec la toxine pour modifier sa conformation et activer son activité phospholipase. Ces facteurs sont intracellulaires puisque qu'ExoU n'est pas cytotoxique quand la toxine est ajoutée à la surface des cellules, ce qui est en accord avec le fait qu'elle soit injectée dans les cellules et non sécrétée dans le milieu extérieur (Phillips *et al.*, 2003). Des résidus distincts sont impliqués dans l'interaction entre ExoU et ces cofacteurs et seront détaillés dans les paragraphes suivants. Le fait qu'ExoU ait besoin de ces facteurs eucaryotes pour être active, explique sa spécificité envers les phospholipides des cellules et son incapacité à lyser la membrane bactérienne.

B-Interaction d'ExoU avec le PIP2 et activation du domaine catalytique

1- Présentation du PIP2

Le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) est un lipide membranaire présent principalement dans le feuillet interne de la membrane plasmique des cellules eucaryotes (Golebiewska *et al.*, 2008; Ingólfsson *et al.*, 2014). Ce phosphoinositide n'est cependant pas distribué de manière homogène au niveau de la membrane plasmique puisqu'il se localise principalement sur les radeaux lipidiques et les contacts focaux (Golub and Caroni, 2005; Legate *et al.*, 2011). De plus, c'est un composant mineur de la membrane, car ce lipide ne représente que 1 à 3% des lipides totaux de la membrane plasmique (Ferrell and Huestis, 1984; Czech, 2000; McLaughlin *et al.*, 2002). D'autres études ont révélé que le PIP2 était également localisé au niveau des membranes intracellulaires, comme celles retrouvées sur l'appareil de Golgi, les endosomes et le réticulum endoplasmique, mais de façon marginale (Watt *et al.*, 2002; Vicinanza *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2015) (**Figure 17A**).

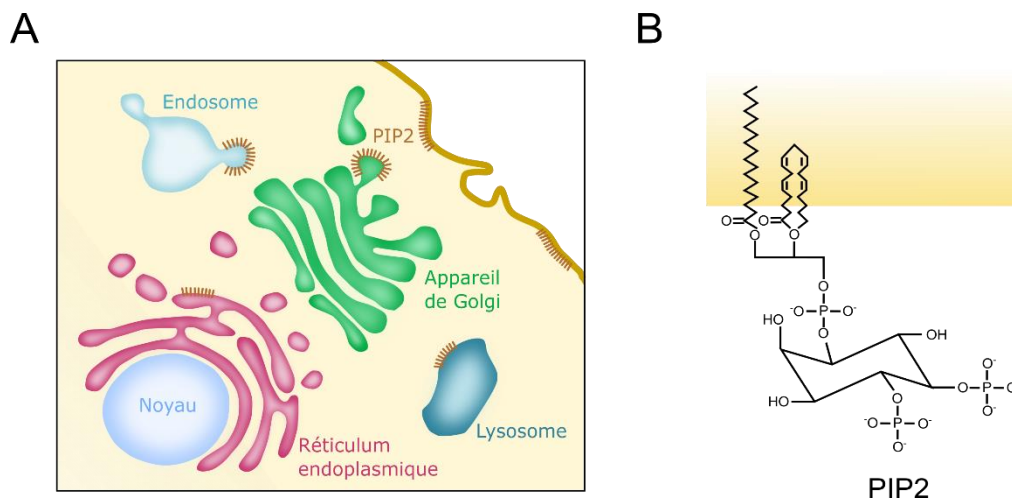


Figure 17: Localisation et structure du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. **A.** Distribution subcellulaire du PIP2 dans une cellule de mammifère. Le PIP2 est représenté par des traits orange. D'après (Tan et al., 2008). **B.** Structure du PIP2 associé à la membrane plasmique. D'après (Telezhkin et al., 2012)

Ce lipide joue un rôle essentiel dans divers processus cellulaires comme la production de seconds messagers (diacylglycérol : DAG et inositol 1,4,5-triphosphate : IP₃), la fixation du cytosquelette à la membrane plasmique, l'exocytose, l'endocytose et l'activation d'enzymes et de canaux ioniques (Czech, 2000; Raucher *et al.*, 2000; Martin, 2001; McLaughlin *et al.*, 2002; Di Paolo and De Camilli, 2006; Suh and Hille, 2008; Wen *et al.*, 2011; Telezhkin *et al.*, 2012; Phan *et al.*, 2019). La distribution asymétrique du PIP2 entre les feuillettes interne et externe de la membrane est également à l'origine du remodelage de la membrane, notamment de sa courbure, entraînant par exemple le recrutement de protéines endocytaires (Shukla *et al.*, 2019). De plus, le PIP2 est important pour le maintien de la polarité membranaire et le trafic polarisé des molécules de signalisation (Thapa and Anderson, 2012; Thapa *et al.*, 2012). Son groupe de tête, fortement chargé négativement, lui permet d'attirer des protéines contenant des groupements polybasiques vers la membrane plasmique (**Figure 17B**) (Heo *et al.*, 2006). Ainsi, le PIP2 est directement impliqué dans le recrutement et l'activation d'effecteurs et de molécules de signalisation, au niveau de la membrane plasmique, comme certaines protéines liant l'actine, notamment les protéines WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) et ERM (Sechi and Wehland, 2000; Thapa and Anderson, 2012; Senju and Lappalainen, 2019).

2- Le PIP2 interagit avec ExoU et permet d'activer son activité phospholipase

Comme l'activité phospholipase d'ExoU est fortement augmentée par la présence de fractions membranaires, les recherches pour découvrir un cofacteur d'ExoU se sont orientées vers les

constituants principaux des membranes, les lipides (Stirling *et al.*, 2006; Tyson and Hauser, 2013). En utilisant différents lipides membranaires comme substrats, dans un test d'activité PLA₂, Tyson et Hauser ont démontré que le PIP₂ permettait d'activer la toxine. Des concentrations inférieures à la concentration physiologique du PIP₂ sont notamment suffisantes pour activer pleinement la toxine (Tyson and Hauser, 2013). Par la suite, d'autres études sont venues conforter l'idée que le PIP₂ était un cofacteur d'ExoU, et que ce lipide était essentiel pour activer la toxine (Gendrin *et al.*, 2012; Sato and Frank, 2014; Tyson *et al.*, 2015; Springer *et al.*, 2019). Ainsi, comme cela a déjà été documenté pour d'autres phospholipases, ExoU interagit avec le PIP₂ pour favoriser son activité phospholipase (Mosior *et al.*, 1998; Casas *et al.*, 2006; Le Berre *et al.*, 2006).

3- Le domaine C-terminal d'ExoU interagit avec le PIP₂ et permet de localiser la toxine à la membrane plasmique

ExoU se localise à la membrane plasmique suite à son injection dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. Comme le PIP₂ est principalement retrouvé à ce niveau, il est donc fortement probable, qu'en plus de favoriser l'activité lipase de la toxine, ce lipide serve de cible pour localiser ExoU à la membrane (Rabin *et al.*, 2006; Stirling *et al.*, 2006). Des mutations dans le domaine C-terminal d'ExoU, entre les résidus 550 et 687, entravent effectivement la liaison de la toxine avec le PIP₂ et empêchent la localisation membranaire d'ExoU (Rabin *et al.*, 2006; Gendrin *et al.*, 2012; Tyson *et al.*, 2015). De même, chez la levure, la mutation de phosphatases requises pour la localisation appropriée du PIP₂ à la membrane, perturbe également la localisation d'ExoU, qui se retrouve alors associée à des structures intracellulaires (Tyson *et al.*, 2015). ExoU empêche aussi la fixation d'un facteur connu pour se lier au PIP₂ au niveau de la membrane plasmique, la protéine PLC δ 1 (Sato and Frank, 2014). Ainsi, l'interaction d'ExoU avec ce lipide permet de localiser la toxine sur la face interne de la membrane plasmique des cellules hôtes (Tyson *et al.*, 2015).

Étant donné que la partie C-terminale d'ExoU semble interagir directement avec le PIP₂, les recherches pour identifier le domaine, voire les résidus d'ExoU essentiels pour cette interaction, se sont concentrées sur cette zone. En se basant sur la structure d'ExoU, Gendrin *et al.*, ont judicieusement remarqué que certains résidus dans le domaine MLD, formaient une structure polaire principalement basique, qui pourraient se lier aux phospholipides eucaryotes chargés négativement, comme le PIP₂ (**Figures 14B et 18**). C'est notamment le cas pour les résidus,

Lys-679, Arg-682 et Asn-683, qui sont situés en périphérie de la toxine, facilitant l'association avec un partenaire potentiel. Les auteurs ont alors démontré que la délétion de ces résidus, entraînait, en effet, la perte de l'interaction entre la toxine et le PIP2 (Gendrin *et al.*, 2012). La présence de sites de liaison au PIP2 dans le domaine MLD d'ExoU, a aussi été suggérée par d'autres équipes (Tyson *et al.*, 2015; Tessmer *et al.*, 2017; Springer *et al.*, 2019). Les boucles inter-hélicoïdales L1 et L3 du domaine MLD, semblent également bien adaptées pour assurer l'interaction avec des lipides membranaires chargés négativement. L'orientation des résidus de ces boucles, ainsi que la présence d'acides aminés cationiques et non polaires formant des motifs «basique-hydrophobe», peut faciliter la formation de nouveaux contacts tertiaires avec le PIP2 (Tessmer *et al.*, 2017; Springer *et al.*, 2019). En particulier, les résidus Gln-620, Gln-623 et Arg-661 d'ExoU, situés respectivement sur les boucles L1 et L3, semblent important pour ce processus (**Figure 18A**) (Anderson *et al.*, 2013; Tyson and Hauser, 2013; Tyson *et al.*, 2015; Springer *et al.*, 2019). Selon Springer *et al.*, ces résidus pourraient soit interagir directement avec le récepteur, soit aider au renforcement et au maintien de l'interaction entre le PIP2 et son site de liaison sur ExoU. Leur modèle de «docking» montre les interactions possibles, via des liaisons salines et hydrogènes, entre les groupements phosphates d'un analogue soluble du PIP2, le diC8-PIP2 (dioctanoyl PIP2), et les résidus situés sur les boucles L1 et L3, en particulier le résidu Arg-661 (**Figure 18B**) (Springer *et al.*, 2019).

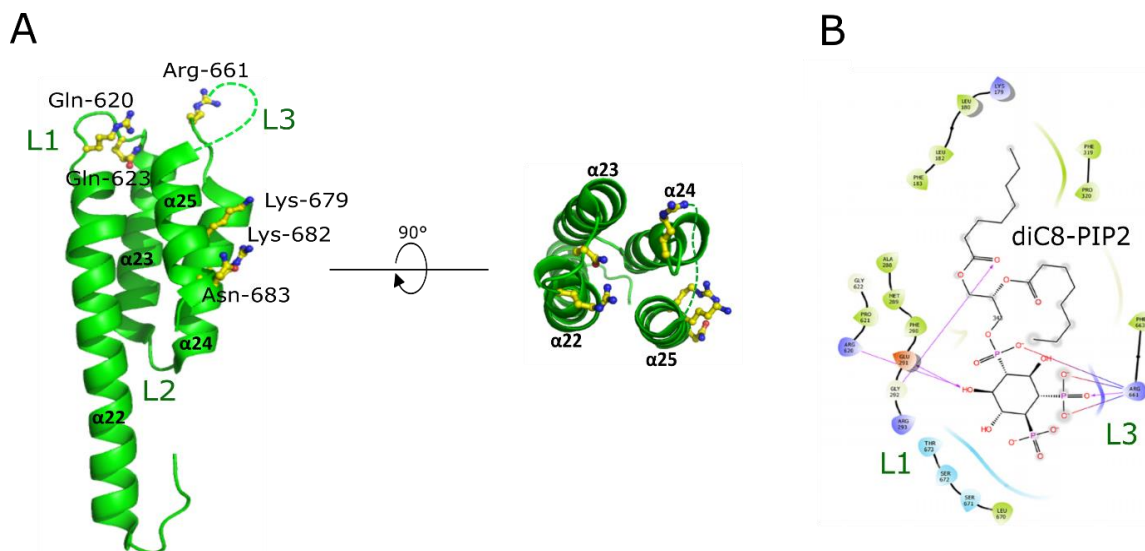


Figure 18: Le domaine MLD d'ExoU interagit avec le PIP2. **A.** Structures du domaine MLD d'ExoU avec les quatre hélices ($\alpha 22$ -25) et les trois boucles inter-hélicoïdales (L1-L3). **B.** Docking représentant l'interaction entre les groupements phosphates du diC8-PIP2 et les résidus situés les boucles L1 et L3 (Springer *et al.*, 2019)

Ainsi, outre sa fonction d'activateur, le PIP2 semble également être un composant essentiel pour le guidage d'ExoU vers l'interface membranaire, comme cela a déjà été documenté pour la phospholipase C (Katan and Williams, 1997). ExoU, via son domaine MLD, se lie donc au PIP2 pour se rapprocher de la membrane plasmique et hydrolyser les substrats lipidiques voisins (Sato and Frank, 2014).

4- Changements conformationnels permettant l'activité cytotoxique d'ExoU

Comme ExoU est injectée sous forme dépliée dans le cytoplasme des cellules, l'activation de son domaine phospholipase pour induire la mort cellulaire requière donc des changements conformationnels afin d'obtenir une protéine repliée (Galán *et al.*, 2014). Plusieurs études ont démontré que la présence de liposomes contenant du PIP2, mimant un rapprochement avec la membrane plasmique, engendre des réarrangements conformationnels dans tout le domaine C-terminal d'ExoU, permettant l'activation de son domaine phospholipase (Rabin *et al.*, 2006; Veessenmeyer *et al.*, 2010; Tessmer *et al.*, 2017; Feix *et al.*, 2019). Dans un premier temps, suite à l'interaction entre le domaine MLD et le PIP2, les boucles inter-hélicoïdales d'ExoU, L1 et L3, ainsi que certains résidus présents sur les hélices adjacentes, pénètrent profondément dans la bicouche lipidique, tandis que la boucle inter-hélicoïdale L2 semble rester dans la partie cytosolique (Tessmer *et al.*, 2017). Ce phénomène a déjà été décrit pour les boucles du domaine C2 de la phospholipase cytosolique A2 humaine et de la protéine kinase C alpha, qui s'enchâssent également dans la membrane (Frazier *et al.*, 2002; Malmberg *et al.*, 2003; Landgraf *et al.*, 2008). Cela entraîne un détachement des quatre hélices du domaine MLD qui s'éloignent du domaine catalytique. (Tessmer *et al.*, 2017; Feix *et al.*, 2019). Ce processus engendre, dans un deuxième temps, un déplacement du domaine « bridging », qui n'interagit cependant pas avec la membrane. Ces changements stabilisent la toxine sur la membrane plasmique et induisent un autre changement conformationnel allostérique dans le domaine PLP. Au cours de ce dernier changement, la région flexible du domaine phospholipase est déplacée, juxtaposant ainsi les sites catalytiques sur les lipides de la face interne de la membrane plasmique, qui deviennent alors accessibles au domaine phospholipase. Par conséquent, tout ce processus améliore l'affinité globale de la toxine pour la bicouche lipidique et incite cette dernière à adopter une conformation unique et essentielle pour son activité phospholipase (**Figure 19**).

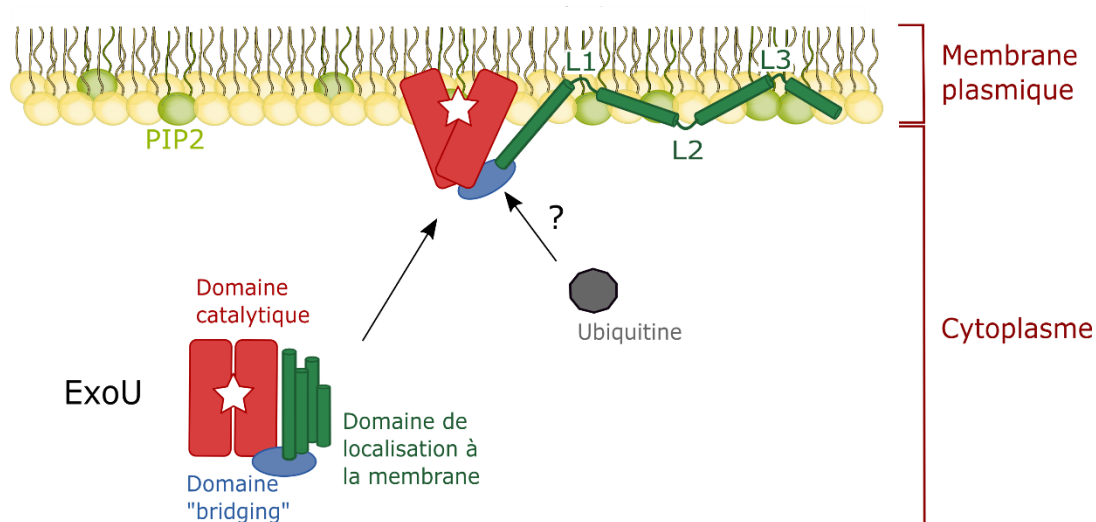


Figure 19: Représentation schématique de l'association d'ExoU avec la membrane plasmique et des changements conformationnels résultants. Les quatre cylindres, la structure ovale et l'étoile correspondent respectivement aux quatre hélices du domaine MLD, le domaine « bridging » et les sites catalytiques. L'ubiquitine est représentée par un pentagone gris et semble interagir de façon non covalente avec le domaine « bridging » d'ExoU, vraisemblablement après la liaison de cette dernière à la membrane plasmique, pour stabiliser la conformation de la toxine. D'après (Tessmer 2017)

C- Oligomérisation de la toxine dans les cellules eucaryotes

Le domaine MLD, nécessaire à la localisation membranaire de la toxine, est également impliqué dans l'oligomérisation d'ExoU (Zhang *et al.*, 2017). Selon Zhang *et al.*, des résidus spécifiques de ce domaine, notamment l'Arg-661, précédemment identifié comme pouvant interagir avec le PIP2, pourraient jouer un rôle critique dans la capacité d'ExoU à former des oligomères. En effet, comme cela a déjà été démontré pour d'autres phospholipases, ExoU s'oligomérisé pendant l'intoxication des cellules et la formation de ces complexes induirait des interactions coopératives entre les monomères d'ExoU, qui améliorerait l'activité phospholipase de chacune des toxines monomériques (Ackermann *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2009). Les oligomères d'ExoU, constitués de 6 à 8 molécules, se forment vraisemblablement au niveau de la membrane plasmique puisque le PIP2 est essentiel pour ce processus et corrobore ainsi des résultats similaires observés pour d'autres toxines, où la localisation membranaire est nécessaire à l'induction de l'oligomérisation des protéines (Cheng *et al.*, 2012; Johnson *et al.*, 2016). La formation d'oligomères d'ExoU serait donc la dernière étape dans le mécanisme d'action de la toxine puisqu'elle est facilitée par les changements conformationnels induits grâce à l'interaction entre la toxine et la membrane, notamment via le PIP2.

Un deuxième cofacteur permettant l'activation de la toxine a également été mis en évidence, mais son rôle dans le mécanisme d'action d'ExoU est plus complexe.

D-Interaction d'ExoU avec l'ubiquitine et les protéines ubiquitinylées

Dans un premier temps, la Cu^{2+} , Zn^{2+} -superoxyde dismutase (SOD1) a été identifié comme cofacteur eucaryote, pouvant stimuler l'activité phospholipase d'ExoU (Sato *et al.*, 2006). Anderson *et al.*, ont cependant démontré que c'était la présence d'ubiquitine dans les différentes préparations de SOD1, qui était responsable de l'activation de la toxine. En effet, la co-expression de la monoubiquitine avec ExoU induit la perméabilisation rapide de la membrane bactérienne chez *E.coli* (Anderson *et al.*, 2011, 2015). De plus, l'ajout d'ubiquitine dans des préparations contenant du PIP2, améliore également grandement l'activité phospholipase d'ExoU, révélant que ces deux cofacteurs ont une action synergique, puisque ni l'un ni l'autre n'est capable d'activer seul la toxine aussi fortement (Tyson and Hauser, 2013; Tyson *et al.*, 2015).

Ainsi, l'ubiquitine libre et les protéines ubiquitinylées, provenant de levures ou de cellules de mammifères, comme bSOD1, semblent servir de cofacteurs pour déclencher l'activité phospholipase d'ExoU et cela est proportionnel au nombre de fragments d'ubiquitine sur la protéine. Cette activation est spécifiquement dépendante de l'ubiquitine, puisque des protéines « ubiquitin-like » comme SUMO-1 ou NEDD8, sont incapables d'activer ExoU (Anderson *et al.*, 2011, 2015). Il est important de noter que l'ubiquitinylation d'ExoU ne requière pas les enzymes normalement impliquées dans la fixation covalente de l'ubiquitine sur les protéines. L'équipe de Dara W. Frank a en effet montré que l'ubiquitine interagissait rapidement avec ExoU, suite à son injection, et de manière non covalente (Feix *et al.*, 2019).

Une modélisation informatique semble indiquer que l'association non covalente d'ExoU avec l'ubiquitine, est dépendante du domaine « bridging » d'ExoU, situé entre les acides aminés 480 et 580. En particulier les résidus Thr-519, Thr-522, Val-523 et Val-526, situés sur l'hélice 18, pourraient interagir avec la partie hydrophobe de l'ubiquitine, une région connue pour interférer avec les protéines (**Figure 20**) (Hurley *et al.*, 2006; Dikic *et al.*, 2009; Anderson *et al.*, 2013; Tessmer *et al.*, 2018). La mutation de ces résidus entraîne effectivement une toxicité significativement plus faible, une fois co-exprimée dans *E.coli* avec la mono-ubiquitine, par rapport à la toxine sauvage. De même, ces mutations dans le domaine « bridging » entravent la toxicité d'ExoU dans un modèle cellulaire (Tessmer *et al.*, 2018).

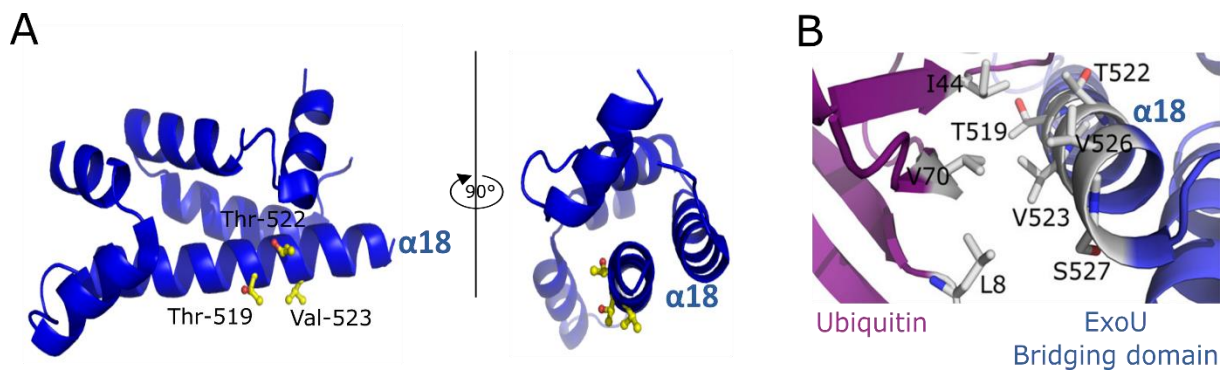


Figure 20: Interaction entre ExoU et l'ubiquitine. **A.** Structure du domaine « bridging » d'ExoU. **B.** Rapprochement des acides aminés du patch hydrophobe de l'ubiquitine (violet) et ceux situés sur l'hélice 18 du domaine « bridging » d'ExoU (bleu). D'après (Tessmer et al., 2018)

Ces effets s'expliquent par le fait que l'association rapide de l'ubiquitine sur ExoU permet un changement conformationnel, rendant la toxine catalytiquement compétente pour induire la rupture de la membrane. Tessmer *et al.*, ont en effet démontré que l'ubiquitine et la bicouche lipidique agissent en synergie pour induire un réarrangement conformationnel dans le domaine C-terminal d'ExoU (Tessmer 2017). Ainsi, la liaison non-covalente de l'ubiquitine sur le domaine « bridging » d'ExoU, conjointement avec l'association membranaire de la toxine et son interaction avec le PIP2, produit des changements structuraux qui aboutissent à l'activation d'ExoU (Feix *et al.*, 2019). Dans ce contexte, l'ubiquitine renforce et stabilise l'association de la toxine avec la membrane plasmique pour provoquer la rupture de cette dernière (**Figure 19**).

Dans un deuxième temps, il a été montré que l'ubiquitine pouvait également se fixer de façon covalente sur ExoU (Stirling *et al.*, 2006; Gendrin *et al.*, 2012; Sato and Frank, 2014). Lors de cette étape plus tardive, les protéines ubiquitinylées servent de donneur d'ubiquitine et permettent d'associer deux molécules d'ubiquitine sur le résidu Lys-178 de la toxine ExoU (Stirling *et al.*, 2006). Ce résidu est en effet, facilement accessible pour ce processus, puisqu'il est situé à la périphérie de la protéine, dans une région qui affiche une grande flexibilité (**Figure 14B**) (Gendrin *et al.*, 2012; Halavaty *et al.*, 2012). Il est possible que l'interaction non covalente entre la partie hydrophobe de l'ubiquitine et le domaine « bridging » d'ExoU, permette de rapprocher la lysine 63 de l'ubiquitine et la lysine 178 d'ExoU, pour favoriser la liaison covalente tardive de ces deux protéines.

En outre, contrairement à ce qui a été démontré pour l'association non-covalente, le mutant ExoU^{K178R}, incapable de lier l'ubiquitine, est toujours localisé au niveau de la membrane plasmique, présente une activité phospholipase similaire à la toxine sauvage et est toujours

toxique dans un modèle cellulaire. (Gendrin *et al.*, 2012; Stirling *et al.*, 2006). Par conséquent, l'ubiquitinylation covalente tardive d'ExoU dans les cellules, n'a pas d'effet sur sa toxicité. En revanche, cette fixation covalente pourrait avoir un rôle dans le trafficking d'ExoU. En effet, le mutant ExoU^{K178R} n'est plus co-localisé avec la protéine EEA1 (« Early Endosome Antigen 1 »), un marqueur des endosomes précoces, contrairement à la toxine sauvage (Gendrin *et al.*, 2012). Ce résultat indique que, soit l'ubiquitinylation covalente d'ExoU se déroule au niveau de la membrane des compartiment endosomaux, soit ce processus permet de diriger la toxine vers ces compartiments.

Pour conclure, bien que l'interaction de la toxine ExoU avec ses cofacteurs eucaryotes ait été considérablement étudié, certains points restent à éclaircir pour comprendre pleinement le mécanisme d'action de la toxine dans les cellules. En particulier le rôle joué par l'ubiquitine dans l'intoxication des cellules et son implication dans les changements conformationnels permettant d'activer la toxine au niveau de la membrane plasmique. De même, les résidus d'ExoU permettant son interaction avec le PIP2 ne sont pas définis et nécessiteraient de nouvelles investigations. Enfin, les modifications structurales du domaine catalytique, qui résultent de l'interaction d'ExoU avec le PIP2 et qui conduisent à une toxine catalytiquement active, sont inconnues.

E- Importance d'ExoU au cours de l'infection

L'ubiquitine et le PIP2 sont des molécules conservées et retrouvées chez tous les eucaryotes, y compris la levure, expliquant la capacité d'ExoU à induire des effets néfastes dans ces différents organismes et non dans les bactéries (Strahl and Thorner, 2007; Finley *et al.*, 2012; Zuin *et al.*, 2014). Entre 300 et 600 molécules d'ExoU sont nécessaires pour induire la mort cellulaire, qui peut survenir dans les 10 min suivant l'injection (Phillips *et al.*, 2003). Cependant, une fois injectée dans les cellules, la toxine active certaines voies de signalisation eucaryote avant d'induire la nécrose des cellules.

1- Induction de la réponse inflammatoire de l'hôte par ExoU

L'inflammation est un processus faisant partie de la réponse immunitaire protectrice de l'hôte, qui vise à recruter des cellules phagocytaires sur le site de l'infection pour éliminer la bactérie (**Introduction - Chapitre 1E**). Cependant, la modulation de la réponse immunitaire provoquée par les toxines, peut permettre aux bactéries d'augmenter leur pouvoir pathogène. En effet, ce

mécanisme peut accentuer la survie bactérienne sur le lieu de l'infection en limitant les cytokines pro-inflammatoires, ou provoquer des dégradations profondes des tissus et ainsi la dissémination des bactéries.

Selon Cuzick *et al.*, l'injection d'ExoU dans des cellules épithéliales respiratoires, augmente la synthèse d'IL-8, via l'activation de la voie MAPK-JNK et la production du facteur de transcription AP-1, composé des protéines c-Fos et c-Jun (**Figure 21**) (Cuzick *et al.*, 2006). Cela concorde avec les résultats antérieurs de McMorran *et al.*, qui ont démontré que l'infection de cellules épithéliales par une souche de *P. aeruginosa* exprimant la toxine ExoU, conduit à l'activation précoce et transitoire du facteur de transcription AP-1 et des gènes qu'il régule (McMorran *et al.*, 2003). Ce mécanisme est dépendant de l'activité phospholipase de la toxine puisque le mutant non catalytique, ExoU^{S142A}, n'augmente pas la synthèse de la cytokine. En revanche, l'activation de cette cascade inflammatoire, conduisant à la production IL-8 par ExoU, est indépendante des effets cytotoxiques causés par la toxine (Cuzick *et al.*, 2006). Le mécanisme conduisant à la phosphorylation et donc l'activation des kinases MEKK4 et JNK par ExoU est néanmoins toujours inconnu.

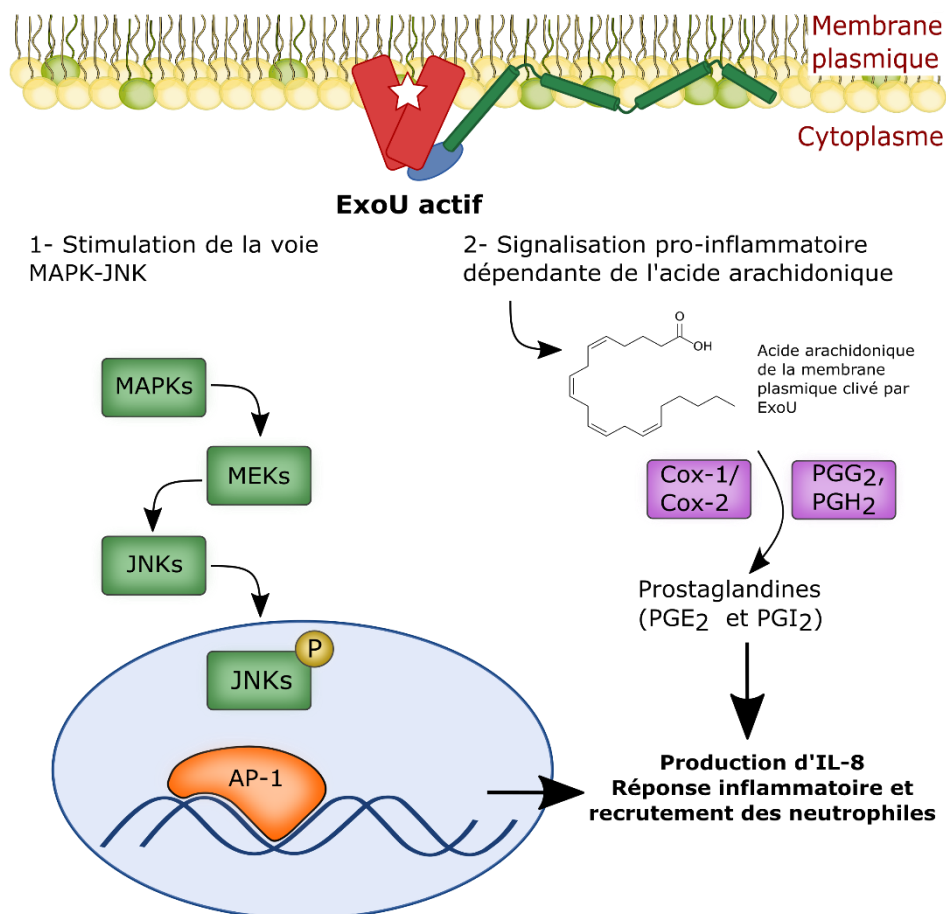


Figure 21: Activation des voies de signalisation eucaryote par ExoU. D'après (Foulkes et al., 2019)

ExoU accentue également la réponse inflammatoire de l'hôte via la biosynthèse d'eicosanoïdes (**Figure 21**) (Saliba *et al.*, 2005). En effet, l'activité lipase de la toxine sur les phospholipides membranaires, conduit au relargage de l'acide arachidonique. L'acide arachidonique est, par la suite, converti par les enzymes cyclooxygénase (COX) en prostaglandines, comme le PGE₂ et le PGI₂, qui sont de puissants médiateurs de l'inflammation, activant entre autres, pour le PGE₂, la production d'IL-6 et -8 et le recrutement de neutrophiles (Cho *et al.*, 2014; Kawahara *et al.*, 2015).

La toxine seule est donc capable d'activer une signalisation pro-inflammatoire conduisant à la production d'IL-8, qui est le principal chimio-attractant des neutrophiles. Cela corrobore les résultats de Pazos *et al.*, démontrant qu'ExoU augmente la migration trans-épithéliale des neutrophiles (Pazos *et al.*, 2017). Cependant, ExoU est capable de réguler et de déjouer cette réponse inflammatoire innée. Tout d'abord, parmi les cellules phagocytaires du poumon, les bactéries ExoU⁺ infectent préférentiellement les neutrophiles et ExoU est capable de lyser rapidement ces cellules ainsi que les macrophages alvéolaires (Diaz *et al.*, 2008; Diaz and Hauser, 2010). De plus, ExoU inhibe la production d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β (Cuzick *et al.*, 2006; Diaz and Hauser, 2010; Saliba *et al.*, 2005; Sutterwala *et al.*, 2007). Par conséquent, la toxine provoque une immunosuppression locale qui permet à *P. aeruginosa* d'éviter la clairance bactérienne et favorise sa persistance sur le lieu de l'infection ainsi que sa dissémination (Diaz *et al.*, 2008).

2- Conséquences de l'intoxication des cellules hôtes par ExoU

La toxicité d'ExoU a été étudiée dans différents types d'organismes tels que la levure, les amibes, les cellules (épithéliales, endothéliales et macrophages), les souris et chez les patients (Finck-Barbançon *et al.*, 1997; Pukatzki *et al.*, 2002; Mattos Saliba *et al.*, 2003; Rabin and Hauser, 2003; Sato *et al.*, 2003; Sutterwala *et al.*, 2007; Diaz and Hauser, 2010; Howell *et al.*, 2013). Dans ces études, l'expression de la toxine a été systématiquement corrélée avec des effets néfastes, notamment une augmentation considérablement de la virulence de *P. aeruginosa*, pouvant conduire à la mort prématurée des cellules et des modèles *in vivo*. En particulier, dans des modèles d'infection pulmonaire aiguë ou chez les patients infectés, les souches ExoU⁺ sont associées à des pathologies sévères, comme des pneumonies ou des bactériémies (Finck-Barbançon *et al.*, 1997; Hauser *et al.*, 1998; Kurahashi *et al.*, 1999; Allewelt *et al.*, 2000; Roy-Burman *et al.*, 2001; Hauser *et al.*, 2002; Schulert *et al.*, 2003; Pankhaniya *et al.*, 2004; Shaver and Hauser, 2004). L'expression de la toxine induit en effet des lésions épithéliales et une mort

cellulaire rapide (Finck-Barbançon *et al.*, 1997; Phillips *et al.*, 2003; Sato and Frank, 2004; Shaver and Hauser, 2004). Ces lésions causées par ExoU compromettent également la barrière épithéliale, permettant la dissémination de la bactérie vers d'autres organes et l'infiltration de cytokines dans la circulation systémique, à l'origine de septicémie (Kurahashi *et al.*, 1999).

La toxicité d'ExoU dans les cellules eucaryotes, est directement liée à son l'activité phospholipase A2 (Phillips *et al.*, 2003). Selon Sato et Frank, l'hydrolyse du PIP2 par ExoU est la première étape de l'effondrement du cytosquelette et de la perte de l'intégrité membranaire (Sato and Frank, 2014). Cette hydrolyse conduit à une perte de l'adhésion focale et une altération des structures cytosquelettiques, notamment une dépolymérisation de l'actine filamenteuse à plusieurs endroits. Le PIP2 étant en effet, un phospholipide essentiel, régissant l'organisation et la dynamique du cytosquelette, en particulier l'adhésion cellule-matrice et cellule-cellule, puisqu'il se lie directement aux molécules d'adhésion focale (**Introduction - Chapitre 3B1**). Ainsi, le clivage du PIP2 disloquent les connexions entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire, aboutissant à l'arrondissement puis le rétrécissement des cellules, qui se détachent alors de leur support (Kaufman *et al.*, 2000; Sato and Frank, 2014). Il est important de signaler que, dans les levures, ExoU est capable de lyser une large gamme de substrats lipidiques, notamment les lipides neutres et les phospholipides comme les phosphatidylcholines, les phosphatidyléthanolamines et l'acide phosphatidique (Sato *et al.*, 2003, 2005). Ainsi la perte de l'intégrité membranaire, observée suite à l'infection des cellules par des souches ExoU⁺, résulte non seulement de l'hydrolyse du PIP2 mais également de l'hydrolyse des autres lipides membranaires voisins, une fois qu'ExoU s'est liée au PIP2.

F- Inhibiteurs d'ExoU

Étant donné le caractère hautement cytotoxique d'ExoU et sa participation indéniable dans l'aggravation des symptômes chez les patients infectés, plusieurs laboratoires se sont penchés sur la recherche d'inhibiteurs d'ExoU. Tout d'abord, la cytotoxicité d'ExoU étant liée à son activité phospholipase, les recherches se sont focalisées sur des molécules pharmacologiques capables de bloquer cette activité. Ainsi en 2003, le groupe de Phillips *et al.*, a démontré que le prétraitement de cellules avec le méthoxy-arachidonyle-fluorophosphonate (MAFP), un inhibiteur de quasiment toutes les hydrolases à sérine, permet de diminuer drastiquement la cytotoxicité de la souche PA103, un isolat clinique de *P. aeruginosa* exprimant la toxine ExoU (**Figure 22**) (Phillips *et al.*, 2003). Cet inhibiteur possède en effet, un groupement phosphate

qui se lie de manière covalente au résidu sérine du site catalytique. Cependant, la concentration élevée d'inhibiteur pour atteindre ce résultat (67,5 μM) implique d'améliorer la structure du composé afin d'avoir une meilleure affinité avec la toxine (Foulkes *et al.*, 2019).

Un crible de 50 000 molécules, susceptibles d'inhiber spécifiquement l'activité d'ExoU sur des cellules CHO, a permis d'identifier la pseudolipasine A (pour « *Pseudomonas* phospholipase inhibitor A ») comme molécule prometteuse (**Figure 22**). Ce composé bloque en effet l'intoxication des cellules de mammifères et des amibes par une souche de *P. aeruginosa* exprimant ExoU, sans inhiber l'injection de l'effecteur par le SST3. Cependant, les concentrations nécessaires pour neutraliser les effets cytotoxiques d'ExoU restent élevées : entre 5 et 10 μM (Lee *et al.*, 2007; Foulkes *et al.*, 2020).

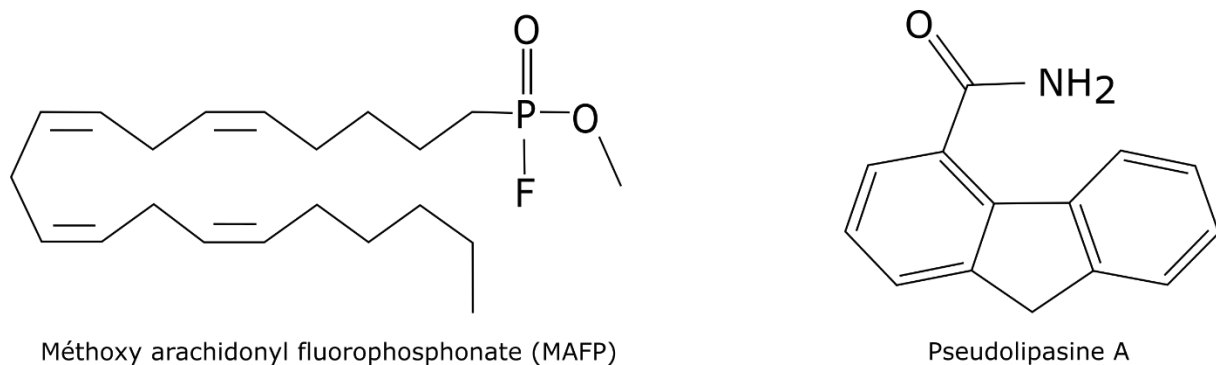


Figure 22: Molécules inhibitrices de l'activité d'ExoU

Un autre crible a été réalisé dans le même but, mais en utilisant cette fois les levures comme modèles. Parmi les petites molécules testées, des dérivés de sulfonamide, notamment l'arylsulfonamide, se sont avérés présenter une activité inhibitrice contre la cytotoxicité d'ExoU, tout en étant non toxique pour *Saccharomyces cerevisiae* et les cellules HEK293T (Kim *et al.*, 2014). Cependant, pour une même concentration, ces composés étaient moins actifs que la pseudolipasine A et par la suite, Foulkes *et al.*, ont démontré que l'arylsulfonamide ne permettait pas de diminuer l'activité toxique d'ExoU *in vitro* et dans les cellules HeLa (Foulkes *et al.*, 2020).

Enfin, deux nouveaux composés, A et B, ont été récemment identifiés comme inhibiteurs d'ExoU (**Figure 23A**). Foulkes *et al.*, ont démontré qu'*in vitro*, 10 μM de l'un ou l'autre de ces composés, permettait de diminuer l'activité phospholipase d'ExoU d'une manière similaire à la pseudolipasine A, ainsi que la quantité de LDH libérée par des cellules HeLa induites pour exprimer ExoU (Foulkes *et al.*, 2020). Ces deux petites molécules améliorent aussi la guérison de cellules cornéennes humaines (HCE-T) infectées par une souche exprimant uniquement la toxine ExoU. De plus, la combinaison de ces molécules avec 2 μM de moxifloxacine, un

antibiotique diminuant la croissance bactérienne mais pas la cytotoxicité d'ExoU, renforce et protège beaucoup mieux les cellules HCE-T de la lyse causée par ExoU, que les deux composés utilisés séparément. Ces deux molécules semblent diminuer la stabilité d'ExoU en se liant de façon non-covalente dans une zone d'ExoU, située près du domaine catalytique (**Figure 23B**). Selon leur étude, les composés A et B pourraient être plus efficaces que la pseudolipasine A pour protéger les cellules cornéennes des effets toxiques d'ExoU à longs termes (Foulkes *et al.*, 2020).

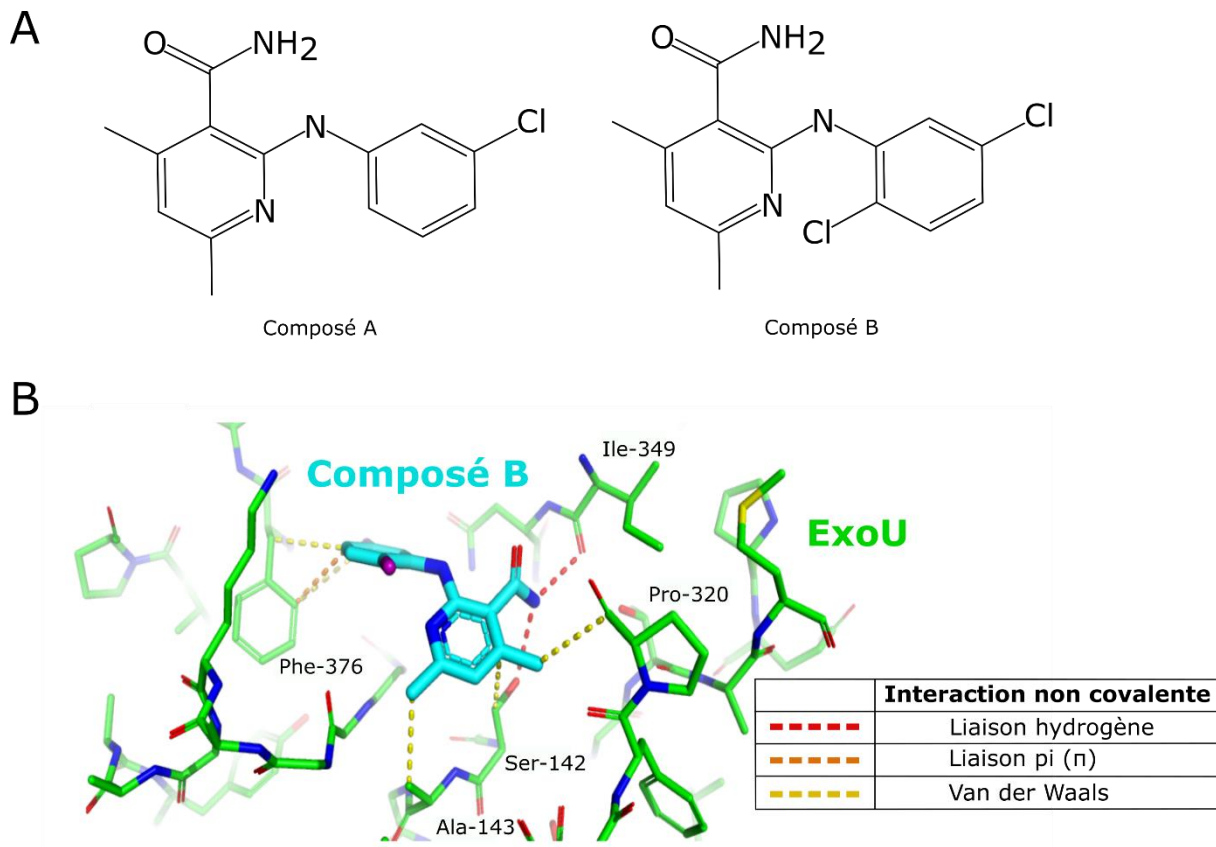


Figure 23: Nouvelles molécules susceptibles d'inhiber la toxicité d'ExoU. **A.** Structures chimiques des composés A et B. **B.** Modèle représentant les interactions possibles entre ExoU et le composé B. D'après (Foulkes *et al.*, 2020)

La diversité des composés identifiés pouvant inhiber l'activité toxique d'ExoU, laisse penser que plusieurs pistes peuvent être envisagées pour élaborer un médicament potentiel. En effet, les structures des molécules citées précédemment, sont complètement différentes et en s'appuyant sur les avantages de chacune, il serait possible de développer un inhibiteur d'ExoU plus puissant et sélectif. Pour cela, il est nécessaire de mieux comprendre la relation structure-activité de chacun de ces composés.

En parallèle, d'autres modes d'inhibition peuvent être envisagés. La liaison d'ExoU avec le PIP2

étant une étape essentielle dans le mécanisme d'action de la toxine, l'utilisation de composés allostériques bloquant cette interaction pourrait être intéressante. Cela a d'ailleurs déjà été démontré pour la phospholipase D2 et son inhibiteur, le composé VU0364739 (Brown *et al.*, 2017). De plus, dans un contexte thérapeutique, il serait également envisageable de combiner les futurs inhibiteurs d'ExoU avec des antibiotiques classiques. Les inhibiteurs serviraient à atténuer la toxicité rapide induite par ExoU, tandis que les antibiotiques permettraient d'éliminer les bactéries et donc de combattre l'infection.

G-Homologues d'ExoU

A partir de la base de données NCBI des génomes bactériens, plusieurs homologues d'ExoU ont été identifiés. Parmi ces homologues, 17 protéines proviennent d'autres espèces de *Pseudomonas* et 8 protéines, d'autres bactéries à Gram négatif comme certaines espèces d'*Aeromonas*, de *Photorhabdus* et de *Paludibacterium* (Sawa *et al.*, 2016). Ces protéines possèdent notamment des domaines phospholipases de type patatine, contenant une dyade catalytique sérine-aspartate, comme ExoU. La recherche d'une séquence en aval, similaire à SpcU, a permis d'affiner cette étude et d'identifier dix bactéries exprimant des homologues d'ExoU, qui semblent être sécrétés par un SST3. Ces homologues présentent entre 45 et 60% d'homologie de séquence avec ExoU. Ils sont retrouvés chez des bactéries provenant de niches écologiques différentes, dont certaines sont pathogènes et d'autres non : *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas lundensis*, *Photorhabdus heterorhabditis*, *Photorhabdus asymbioitica*, *Aeromonas jandaei*, *Aeromonas encheleia*, *Aeromonas diversa*, *Paludibacterium yongneupense*, *Rickettsia prowazekii* et *Achromobacter xylosoxidans* (Sawa *et al.*, 2016; Tessmer *et al.*, 2019).

Les enzymes homologues à la toxine ExoU de *P. aeruginosa*, retrouvées dans ces bactéries, présentent également un mécanisme d'activation ubiquitine-dépendent (Anderson *et al.*, 2015; Tessmer *et al.*, 2019). Cependant, la toxicité de ces différentes enzymes varie selon le type d'hôte infecté (procaryote ou eucaryote). Par exemple, les orthologues AxoU (*A. diversa*), AdiU (*R. prowazekii*) et RP534 (*A. xylosoxidans*), possèdent une activité phospholipase lorsqu'elles sont exprimées chez *E. coli* en présence d'ubiquitine, de façon similaire à ExoU, tandis que dans les cellules HeLa, seuls AxoU et AdiU sont toxiques (Tessmer *et al.*, 2019). Parmi ces homologues, la toxine ExoU de *P. fluorescens* présente une structure quasiment identique à celle de la toxine ExoU de *P. aeruginosa*, en particulier un domaine MLD qui est essentielle pour son interaction avec le PIP2 et sa localisation à la membrane plasmique. Cette

toxine présente également une toxicité similaire à celle de *P. aeruginosa* dans les cellules eucaryotes (Tyson *et al.*, 2015).

Comme ces homologues présentent des domaines similaires à ceux d'ExoU et que certains sont activés par les mêmes cofacteurs, il serait intéressant de vérifier si les inhibiteurs développés contre ExoU, perturbent également leur cytotoxicité, voire sont plus efficaces.

Résultats

Chapitre 1

ExoU exploite le trafic vésiculaire dirigé par DNAJC5 pour se localiser à la membrane plasmique

A-Introduction

Parmi les effecteurs injectés par le SST3 de *P. aeruginosa*, ExoU est hautement cytotoxique, du fait de sa capacité à induire rapidement une nécrose cellulaire. Les souches ExoU⁺ sont associées aux pathologies les plus sévères et à une multirésistance plus élevée aux antibiotiques (Hauser *et al.*, 2002; Subedi *et al.*, 2018). Cependant, bien que le mécanisme d'action d'ExoU chez *P. aeruginosa* ait fait l'objet de plusieurs études, certains aspects de son mode d'action, notamment les sites précis d'interaction avec le PIP2 et les modifications structurales du domaine catalytique, restent à éclaircir. Le mode de transport de la toxine vers la membrane plasmique, une fois injectée dans les cellules hôtes, est également peu connu.

Au cours de ma thèse, j'ai donc utilisé une approche génétique avec le système CRISPR-Cas9 afin d'identifier de nouveaux partenaires eucaryotes, qui pourraient être impliqués dans la toxicité d'ExoU lors d'une infection cellulaire. Pour cela, j'ai utilisé une banque lentivirale contenant des ARN guides (ARNg) pour infecter et inactiver plus de 18 000 gènes humains dans des cellules épithéliales A549. Une infection lentivirale limitée a été réalisée, dans le but d'obtenir un seul gène inactivé par cellule. Ces cellules mutées ont ensuite été soumises à trois cycles d'infection successifs avec une souche ExoU⁺, pour sélectionner les cellules les plus résistantes. Ce criblage a abouti à l'identification du gène codant pour la protéine DNAJC5, une protéine co-chaperonne, également appelée CSP α pour « Cystein-String Protein α », comme partenaire potentiel de la toxine ExoU.

1- Présentation de la protéine DNAJC5

DNAJC5 est une protéine cytoplasmique ubiquitaire, située à la surface des endosomes tardifs (Xu *et al.*, 2018). Cette protéine est impliquée dans le trafic vésiculaire et le repliement de protéines, conjointement avec les chaperonnes Hsc70 et Hsp70 (Burgoyne and Morgan, 2015; Fontaine *et al.*, 2016; Gundersen, 2020). Dans ce contexte, DNAJC5 active les domaines ATPases de ces chaperonnes.

DNAJC5 est également impliquée dans une voie de sécrétion non-conventionnelle, appelée MAPS pour « Misfolded-Associated Protein Secretion », qui a été décrite très récemment (**Figure 24**) (Xu *et al.*, 2018). Dans ce processus, certaines protéines mal repliées présentes dans le cytosol, s'associent à un complexe formé par les protéines USP19 et Hsc70. Ces protéines sont ensuite prises en charge par DNAJC5 à la surface des endosomes tardifs et intégrées dans la lumière des vésicules par un mécanisme qui n'est pas connu. Ces endosomes sont exportés à la membrane plasmique et DNAJC5 est requis pour ce transfert. Deux mutations dans le domaine riche en cystéines de DNAJC5 (voir ci-dessous), L115R et Δ L116, empêchent l'export des vésicules et provoquent une maladie neurodégénérative chez l'adulte appelée, la céréoïde- lipofuscinose neuronale (Greaves *et al.*, 2012). Une fois les vésicules arrivées à la membrane plasmique, deux processus ont été décrits par des équipes différentes : soit la vésicule fusionne avec la membrane et libère les protéines luminales à l'extérieur, soit la vésicule est excrétée par exocytose (Ye, 2018). Il est à noter qu'une partie des molécules de DNAJC5 pourrait également être internalisée dans les vésicules, car la protéine est retrouvée dans le milieu extracellulaire. D'autres cellules peuvent ensuite recapturer ces protéines mal repliées par endocytose et les acheminer dans les lysosomes où elles sont dégradées. Globalement, la voie MAPS est vue comme un processus parallèle à la dégradation des protéines cytosoliques par le protéasome, pour l'élimination de protéines spécifiques (Volkmar *et al.*, 2016). Les principaux effecteurs de la voie MAPS décrits à ce jour sont : la protéine α -synucléine, une protéine cytosolique naturellement mal repliée, impliquée dans la maladie de Parkinson et la protéine de liaison aux microtubules Tau, donc le relargage dans le milieu extracellulaire est associé à la maladie d'Alzheimer (Fontaine *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2018).

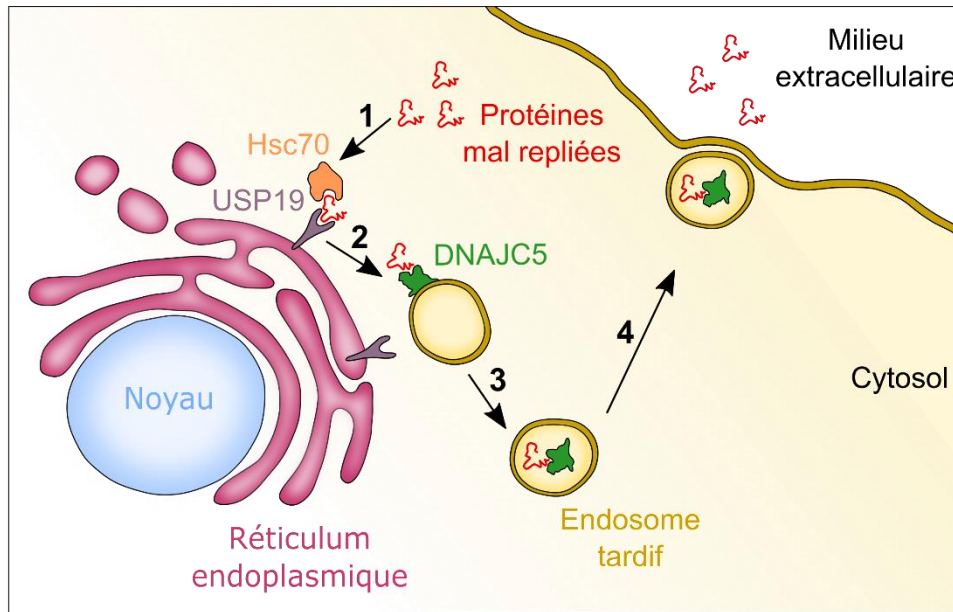


Figure 24: Voie de sécrétion MAPS. Les protéines cytosoliques mal repliées peuvent être sécrétées par cette voie selon les étapes suivantes. **Étape 1** : les protéines mal repliées (en rouge) sont recrutées à la surface du réticulum endoplasmique en se liant à un récepteur possédant une activité chaperonne, telle que USP19. Dans ce cas, la chaperonne Hsc70 participe également au recrutement du substrat par USP19. **Étape 2** : les protéines mal repliées sont ensuite transférées à DNAJC5, une co-chaperonne de Hsc70, qui est localisée sur la membrane des endosomes tardifs. **Étape 3** : le complexe, formé par DNAJC5 et les protéines mal repliées, est transféré dans la lumière de l’endosome tardif. **Étape 4** : cet endosome migre vers la membrane plasmique et la fusion des membranes permet de libérer les protéines mal repliées en dehors de la cellule. D’après (Xu et al., 2018)

DNAJC5 se compose de trois domaines distincts, dont un domaine J très conservé parmi les membre de la famille DNAJ, comportant notamment les résidus HPD, nécessaires pour l’interaction et la stimulation de l’activité ATPase des chaperonnes Hsc70 et Hsp70 (**Figure 25**) (Chamberlain and Burgoyne, 1997; Hennessy *et al.*, 2000).

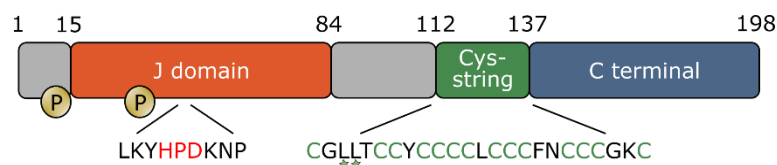


Figure 25: Représentation schématique de la protéine DNAJC5 (CSP α) humaine. Les emplacements suivants sont mis en évidence : les deux sites de phosphorylation (sérine 10 et sérine 34), le motif HPD pour la liaison avec les chaperonnes Hsc70 et Hsp70 et la région riche en cystéine contenant les leucines L115 et L116, mutées chez les patients adultes atteints de céréoïde-lipofuscinose neuronale (étoiles)

Ce domaine est suivi d'un domaine comportant 14 cysteines, appelé « Cysteine-String domain » pouvant être palmitoylées. La palmitoylation de ces cystéines joue un rôle essentiel pour le ciblage initial de DNAJC5 vers les membranes (Chamberlain and Burgoyne, 1998). Enfin le domaine C-terminal, moins conservé parmi les isoformes de la protéine retrouvés chez l'homme, joue un rôle encore énigmatique dans l'activité de DNAJC5 (Arnold *et al.*, 2004). Certaines publications suggèrent cependant que ce domaine pourrait être impliqué dans l'exocytose et la régulation de certains processus. Par exemple, la partie C-terminale de DNAJC5 interagit avec la protéine VAMP2, une protéine membranaire associée aux vésicules, importante pour la fusion des membranes, notamment grâce à son interaction avec la protéine SNAP25 localisée à la membrane plasmique (**Figure 26**) (Boal *et al.*, 2004; Burgoyne and Morgan, 2015).

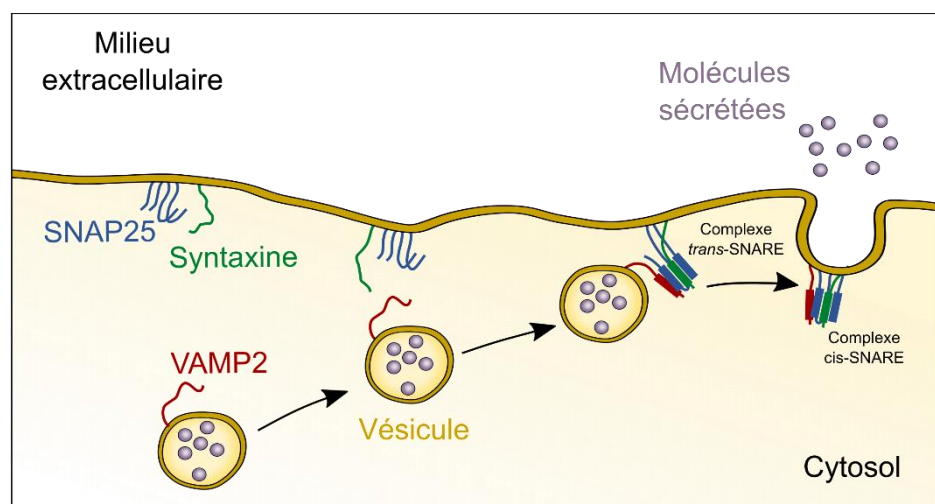


Figure 26 : Exocytose de molécules contenues dans une vésicule, par le complexe VAMP2/SNAP25. La vésicule de transport, contenant des molécules à libérer dans le milieu extracellulaire, exprime la protéine VAMP2 (v-SNARE), tandis que deux autres protéines SNARE sont exprimées sur la membrane plasmique, la syntaxine et la SNAP25 (t-SNARE). La reconnaissance mutuelle des v-SNARE et t-SNARE, lors du rapprochement de la vésicule, permet l'enroulement de leurs domaines hélicoïdaux, formant ainsi le complexe trans-SNARE. Ce complexe permet l'amarrage de la vésicule de transport sur la membrane plasmique. Lors de la fusion membranaire, le complexe trans-SNARE devient le complexe cis-SNARE.

2- Rôle de DNAJC5 dans l'activité d'ExoU

Tout d'abord, nous avons démontré, dans des modèles cellulaires et chez la drosophile, que DNAJC5 était spécifiquement requise pour l'activité toxique d'ExoU. En effet, la présence de la co-chaperonne n'est pas nécessaire pour l'activité toxique d'ExlA et d'ExoS, deux autres

toxines majeures de *P. aeruginosa*. Cependant, cette co-chaperonne ne participe pas directement à l'activité phospholipase d'ExoU, car cette dernière n'est pas augmentée, dans un essai de l'activité PLA2, en présence de DNAJC5. A l'aide d'approches par mutagenèse et par microscopie, nous démontrons que la mutation de certains résidus dans le domaine « Cysteine-String », connus pour être essentiels au trafic des vésicules DNAJC5⁺ et impliqués dans la céréoïde-lipofuscinose neuronale de l'adulte, empêche également le transport d'ExoU vers la membrane plasmique. La toxine mutée reste bloquée dans le cytoplasme des cellules et n'est plus toxique. Ainsi le trafic vésiculaire, médié par DNAJC5, est essentiel pour l'activité nécrosante d'ExoU, ce qui suggère que la co-chaperone escorte ExoU vers la membrane plasmique. En revanche, les protéines Hsc70 et Hsp70, normalement capitales pour les deux activités connues de DNAJC5 : le trafic vésiculaire et le repliement de protéines, ne sont pas impliquées dans ce mécanisme.

Cette découverte vient donc compléter nos connaissances sur le trafic d'ExoU dans la cellule hôte, et plus généralement, sur le rôle joué par certaines protéines de l'hôte dans l'activation des toxines bactériennes. Ce travail est soumis pour publication dans un journal scientifique.

B- Publication

Dans cette étude, j'ai produit l'ensemble des résultats présentés, à l'exception des images de microscopie et de l'infection des drosophiles, qui ont été réalisées par Stéphanie Bouillot et le fractionnement cellulaire, qui a été réalisé par Philippe Huber.

The bacterial toxin ExoU requires a host trafficking chaperone for transportation and to induce necrosis

Vincent Deruelle¹, Stéphanie Bouillot¹, Viviana Job¹, Emmanuel Taillebourg², Marie-Odile Fauvarque², Ina Attrée¹ and Philippe Huber^{1*}

¹Université Grenoble-Alpes, CEA, INSERM, CNRS, Unité de Biologie Cellulaire et Infection, Grenoble, France.

²Université Grenoble-Alpes, CEA, INSERM, CNRS, Unité de Biologie à Grande Echelle, Grenoble, France.

*Corresponding author: phuber@cea.fr

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a causative agent in nosocomial infections, notably in ventilated or cystic fibrosis patients. *P. aeruginosa* isolates expressing the phospholipase ExoU, an effector of the type III secretion system, are the most pathogenic in clinics. Here, using a genome-wide screen, we discovered that ExoU toxicity requires DNAJC5, a host chaperone, to exert its necrotic activity. DNAJC5 is involved in an unconventional secretory pathway for misfolded proteins involving anterograde vesicular trafficking. DNAJC5-deficient human cells or *Drosophila* flies knocked-down for the DNAJC5 orthologue were largely resistant to ExoU virulence. ExoU colocalized with DNAJC5-positive vesicles in the host cytoplasm. DNAJC5 mutations preventing vesicle trafficking - identified in adult neuronal ceroid lipofuscinosis, a human congenital disease - inhibited ExoU-dependent cell lysis. These results suggest that, once injected into the host cytoplasm, ExoU docks to DNAJC5-positive secretory vesicles to reach the plasma membrane, where its phospholipase activity is triggered by binding to PI(4,5)P2.

Introduction

In most instances, bacterial toxins require one or more host factors to exert their toxicity. These factors can be receptors, binding partners inducing structural modifications or even entire host cellular pathways that are hijacked for bacterial toxicity purposes. The requirement for host-cell mechanisms protects bacteria from self-toxicity and takes advantage of efficient molecular mechanisms developed by eukaryotic cells to alter cellular functions. This rule applies to the toxins secreted by *Pseudomonas aeruginosa*, a Gram-negative opportunistic pathogen.

P. aeruginosa is a leading cause of severe nosocomial infections. It is a causative agent of pneumonia, urinary tract infections, bacteraemia, abscesses, as well as burn and eye infections. *P. aeruginosa* infections are frequent in ventilated and cystic fibrosis patients, and have a particularly high fatality rate following infection in these conditions¹⁻³. The high mortality rate recorded is also due to acquired resistance to antibiotics, which is a major issue in the clinical management of *P. aeruginosa* infections⁴⁻⁶.

P. aeruginosa uses a multi-target strategy to infect host cells, employing a combination of virulence factors. One of these factors is the type 3 secretion system (T3SS), the effectors of which are known to be the most potent toxins in acute *P. aeruginosa* infections^{2,7}. The T3SS

consists of a syringe-like apparatus which injects toxins into the cytosol of host cells. Four effectors have been identified: ExoU, ExoS, ExoT and ExoY, having their cognate co-activation host factors: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate [PI(4,5)P2] and ubiquitin for ExoU, 14-3-3 adaptor protein for ExoS and ExoT, and filamentous actin for ExoY⁸⁻¹⁴.

ExoU and ExoS are mutually exclusively expressed in bacterial strains². ExoU-positive bacteria represent 28-48% of *P. aeruginosa* clinical isolates, and are found in the most severe pathological cases and produce the most dramatic lesions^{2,7,15}. Furthermore, ExoU-positive strains have been associated with increased multidrug resistance in several clinical studies¹⁶⁻¹⁹.

ExoU is a phospholipase A2 (PLA2) inducing plasma membrane rupture and rapid cell necrosis^{20,21}. Its activity is enhanced by binding to ubiquitin and to the lipid PI(4,5)P2, a lipid present in the inner leaflet of the plasma membrane¹⁰⁻¹⁴. However, several aspects of ExoU activation and trafficking in host cells remain elusive. Here, we searched for other host factors required for full ExoU toxicity using a genome-wide screening approach and we identified DNAJC5 as a necessary cofactor for its trafficking in host cells.

Results

ExoU requires DNAJC5 for host cell lysis

To identify host genes involved in ExoU cytotoxicity, we performed a genetic screen using CRISPR-cas9 technology. A549 pneumocytic cells were transduced with a lentiviral library of guide-RNAs (gRNAs), targeting 18,053 genes (four gRNAs per gene). The cells were subjected to three rounds of infection with the *P. aeruginosa* strain PA14, known to induce cell necrosis via ExoU secretion (**Figure 1a**). Each infection round was stopped by adding antibiotics after 90 min of infection, and each round of infection resulted in approximately 70% of cell death. This experimental design aimed at selecting resistant cells to ExoU-induced necrosis putatively carrying a mutated human gene required for ExoU necrotizing activity. The gRNA sequences in surviving A549 cells were identified by next-generation sequencing and the number of reads for each gRNA was compared to the number in the library of uninfected library. Three independent replicates were performed and a statistical analysis revealed a significant enrichment for gRNAs targeting only one gene: the gene encoding DNAJC5 (also known as cysteine string protein α ; CSP α) (**Figure 1b**).

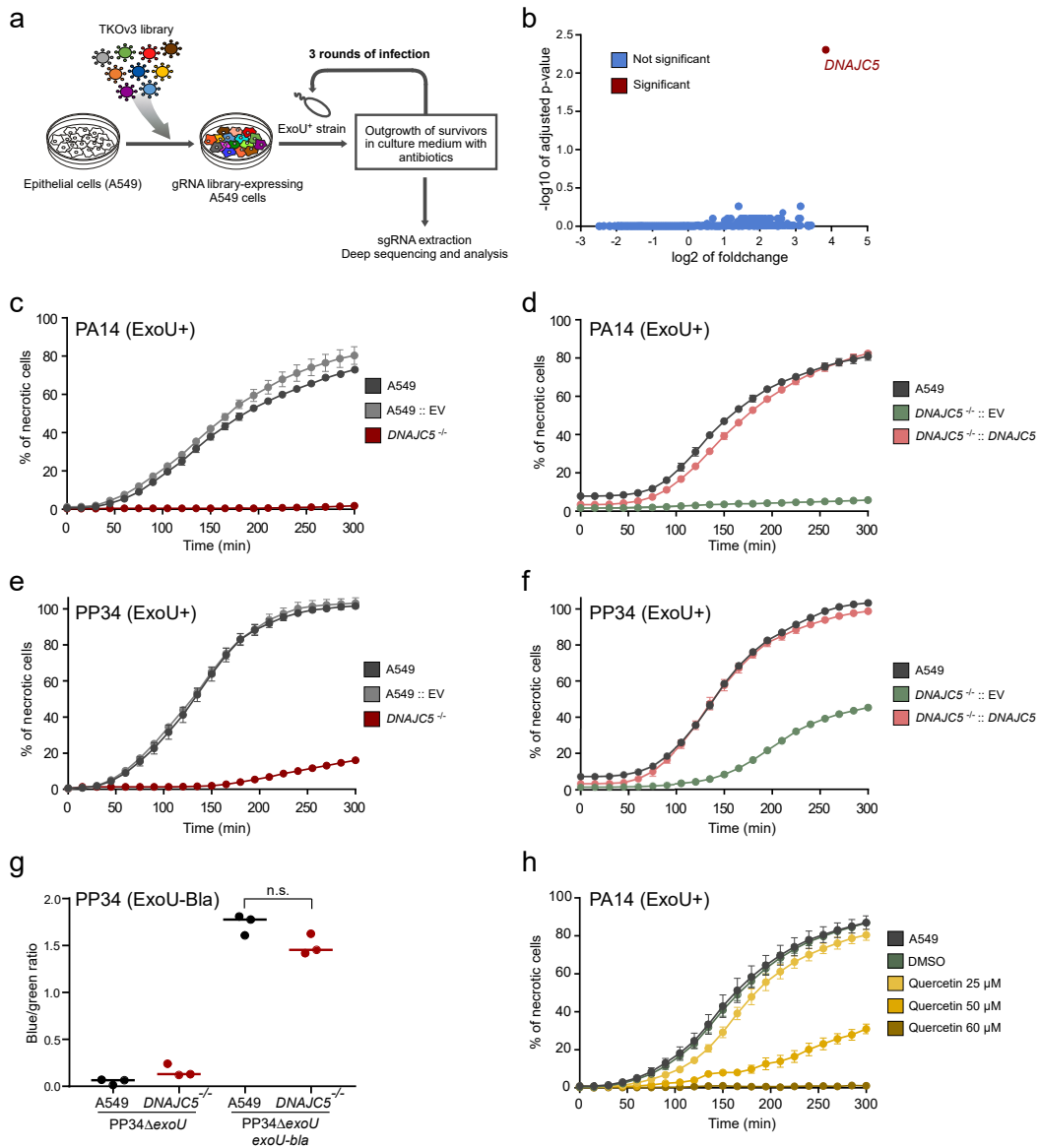


Figure 1: DNAJC5 is required for ExoU cytotoxicity.

a. Screening process to identify host genes required for ExoU toxicity. A gRNA library (TKOv3, four gRNAs per gene) was constructed for A549 human epithelial cells. Cells were subjected to three 90-min rounds of infection with the ExoU⁺ PA14 strain in triplicates. Infection was stopped by washing and adding antibiotics. gRNAs were then amplified by PCR and submitted to deep sequencing. **b.** Analysis of sequencing data. Statistical analysis of gRNA amplification in infected vs uninfected conditions. gRNAs targeting the DNAJC5 gene were the only ones significantly enriched in the screen. **c.** Cytotoxicity assay. A clonal population of DNAJC5^{-/-} A549 cells, native A549 cells or cells transfected with an empty vector (EV) were infected in 6-plicates with PA14 and necrosis was monitored by propidium iodide incorporation, recorded by time-lapse microscopy. Results are represented as the mean percentage (+/- SD) of necrotic cells. **d.** Cytotoxicity assay with A549 native cells. A549 DNAJC5^{-/-} cells complemented with DNAJC5 (DNAJC5^{-/-}::DNAJC5), or the mock-complemented control, were infected with PA14. **e, f.** Cytotoxicity assays similar to c,d, but cells were infected with the ExoU⁺ PP34 strain. **g.** T3SS-dependent injection of ExoU in A549 cells. A549 cells or DNAJC5^{-/-} A549 cells were infected with PP34ΔexoU bacteria complemented with exoU fused to the β-lactamase gene (*bla*) or infected with uncomplemented PP34ΔexoU. Cells were loaded with CCF2, a Bla fluorescent substrate which shifts from green to blue fluorescence upon processing by the enzyme. Fluorescence was measured at 4 hpi on both channels and results are expressed as a blue/green ratio. **h.** Cytotoxicity assay. Increasing concentrations of quercetin were added to A549 cells in the presence of PA14 (ExoU⁺) at an MOI of 20. Necrosis was monitored by PI incorporation and recorded by time-lapse microscopy.

DNAJC5 is a ubiquitous cytoplasmic protein located at the surface of late endosomes (LEs). It functions as a co-chaperone in association with Hsc70 or Hsp70, which play a central role in protein homeostasis²²⁻²⁴. DNAJC5 is also required for an unconventional protein secretion pathway^{25,26}, recently described as Misfolded-Associated Protein Secretion (MAPS)²⁷. In this process, misfolded cytosolic proteins are translocated into DNAJC5+ LEs near the endoplasmic reticulum, which are then transported to the plasma membrane^{28,29}. Eventually, fusion of the vesicles with the plasma membrane allows the elimination of misfolded proteins directly into the extracellular milieu²⁷. Alternatively, the vesicles can produce exosomes containing the misfolded proteins in the extracellular milieu³⁰. This secretion process has been widely described in neurons, where alteration of MAPS in neurons has been linked to several neurological disorders^{26,31-35}.

To confirm the role of DNAJC5 in ExoU-dependent cytotoxicity, we generated independent DNAJC5^{-/-} A549 cells using CRISPR-cas9 technology and one of the gRNA targeting *DNAJC5* in the library (**Supplementary Figure 1a**). A clonal population was selected, lacking four bases from the coding sequence of both *DNAJC5* alleles. The DNAJC5^{-/-} cells were subjected to a cytotoxic test, after infection with PA14 in the presence of propidium iodide (PI) to detect necrotic cells. PI incorporation was monitored by automated time-lapse microscopy (**Figure 1c**). The proportion of native A549 cells exhibiting a necrotic phenotype increased with time and reached > 75% at 5 h post-infection (pi); in contrast, DNAJC5^{-/-} cells exhibited no PI incorporation. PA14 lytic capacity was restored when *DNAJC5* expression was rescued in DNAJC5^{-/-} cells (DNAJC5^{-/-}::DNAJC5) (**Figure 1d**). Similar experiments were performed with the clinical strain PP34, isolated from bacteraemia and secreting high amounts of ExoU. In these experiments, some necrosis (18%) was observed at late time points in DNAJC5^{-/-} cells, while 100% of A549 cells were necrotic (**Figure 1e**). As with PA14, PP34 infection of DNAJC5^{-/-}::DNAJC5 cells restored a full ExoU cytotoxicity (**Figure 1f**).

To determine whether DNAJC5 contributes directly to toxin activity, or is required for T3SS-dependent injection, we infected cells with bacteria secreting ExoU fused to β -lactamase (ExoU-Bla). This reporter system was previously used to monitor ExoU delivery into cells³⁶. Host cells were pre-loaded with a fluorescence resonance energy transfer (FRET) substrate of Bla (CCF2). Uncleaved CCF2 produces a green fluorescence, whereas the cleaved CCF2 emits a blue fluorescence. Infection of A549 or DNAJC5^{-/-} cells with ExoU-Bla-secreting

bacteria produced similar ratios of blue/green fluorescence (**Figure 1g**), indicating that the absence of DNAJC5 did not alter T3SS injection *per se*.

As a complementary demonstration that DNAJC5 is required for ExoU toxicity, we used a DNAJC5 inhibitor. Quercetin is a natural product inducing DNAJC5 dimerization at high concentrations, leading to its inactivation³⁷. Upon application of quercetin to cell cultures, a dose-dependent inhibition of ExoU-induced A549 cell lysis was observed (**Figure 1h**), confirming the essential role of DNAJC5 in ExoU intoxication.

We next examined whether DNAJC5 also contributes to the activity of other toxins delivered by *P. aeruginosa*. To do so, we first performed a cytotoxicity assay using bacteria (CHAΔ*exoT*) secreting ExoS (and not ExoU or ExoT) through the T3SS. The toxic activity of ExoS results in dismantling of the actin cytoskeleton, hence provoking cell rounding². The similar kinetic profiles recorded for the two cell lines (**Supplementary Figure 2a,b**), indicate that the action of ExoS in host cells does not require DNAJC5. This result also further confirmed that T3SS injection is unaffected in DNAJC5^{-/-} cells.

We subsequently assayed how DNAJC5 deficiency affected toxicity of the pore-forming toxin ExlA, secreted by *P. aeruginosa* strains lacking T3SS³⁸. Like ExoU, ExlA is a necrotizing toxin. Identical intoxication curves were recorded for A549 and DNAJC5^{-/-} cells (**Supplementary Figure 2c**), indicating that DNAJC5 is not involved in ExlA-dependent cell lysis. Likewise, DNAJC5 seems to be specifically required for ExoU necrotizing activity in host cells.

Taken together, these results demonstrate that DNAJC5 is specifically required for ExoU toxicity in host cells.

Lack of DNAJC5 decreases the virulence of ExoU-positive *P. aeruginosa*'s strains in vivo

DNAJC5 is an evolutionary conserved protein. Animals in which the *DNAJC5* orthologue gene was inactivated (mice, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*) all rapidly died after birth from neurological disorders³⁹⁻⁴¹³⁹⁻⁴¹. These models are consequently unsuitable for use in infection assays. To overcome this lack of in vivo model, we generated *Drosophila* in which the *DNAJC5* orthologue *Cystein string protein (Csp)* was conditionally knocked-down (KD) by expressing a silencing long double-strand RNA (dsRNA) or a short hairpin RNA (shRNA) in two independent fly lines (generation of the *Csp*-KD flies is shown in **Supplementary Figure 3a,b**). Flies were infected by pricking the thorax with a thin needle previously dipped into a bacterial suspension⁴² (**Figure 2a**). This infection model can be used to measure the impact of

ExoU on fly death, as shown by the difference in survival curves following infection with a wild-type strain of *P. aeruginosa* expressing high levels of ExoU (PP34) and its isogenic mutant (PP34 Δ exoU) (Supplementary Figure 3c). Survival curves for control and *Csp*-KD *Drosophila* infected with PP34 were strikingly different (Figure 2b,c), whereas the survival curves for *Csp*-KD and *Drosophila* mock-infected with PBS were not statistically different. These data indicate that DNAJC5/CSP is required for full ExoU-dependent *P. aeruginosa* virulence in vivo.

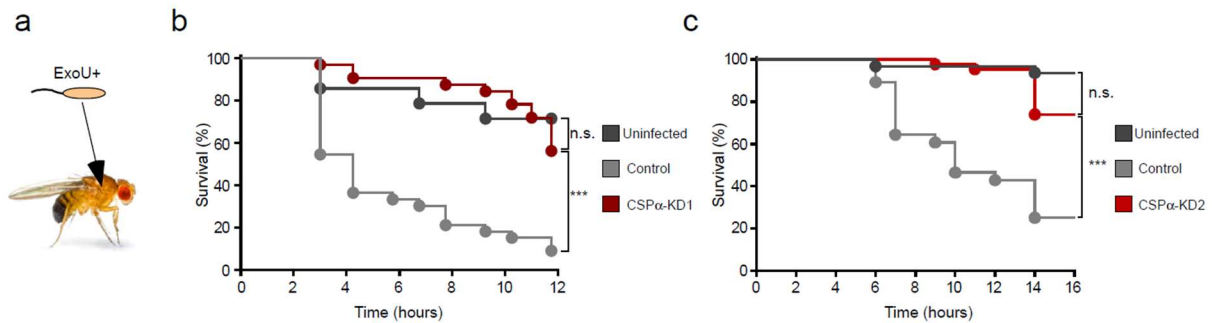


Figure 2: ExoU toxicity in *Drosophila* requires CSP (DNAJC5 orthologue).

a. *Drosophila* were infected with PP34 (ExoU+) by pricking the thorax with a thin dipped in bacterial suspension. **b, c.** Flies expressing RNAi transgenes targeting either the firefly *luciferase* gene (Control) or the *Csp* gene (*Csp*-KD1 and *Csp*-KD2). Mock-infected *Csp*-KD1 (n = 40) or *Csp*-KD2 (n = 51) flies with PBS were included as negative control (uninfected; n = 30 and 47, respectively). Fly survival was recorded over 12 hours and data are represented as Kaplan-Meier curves. Statistical differences were established using the Log-Rank test. n.s., not significant; ***, p < 0.001.

ExoU partly localizes in DNAJC5-positive vesicles

To determine the localization of ExoU in infected cells, we used a *P. aeruginosa* strain (CHA Δ exoSexoT::exoU^{S142A}, hereafter CHA-exoU^{S142A}) that secretes a catalytically-inactive non-lytic mutant, ExoU^{S142A} 43. Cells were infected with this strain and soluble and membrane fractions were prepared from lysates of A549 infected cells. ExoU was mainly detected in the membrane fractions, with only trace amounts present in soluble fractions (Figure 3a). This distribution indicates that following injection, ExoU binds to membranes rather than remaining free in the cytosol. Equivalent amounts of ExoU were detected in DNAJC5^{-/-} and DNAJC5^{-/-}::DNAJC5 membrane fractions, demonstrating that DNAJC5 is not required for ExoU docking to membranes. To gain further insight into the subcellular localization of ExoU, we performed immunofluorescence experiments and observed cells by confocal microscopy. In infected A549 and DNAJC5^{-/-} cells, ExoU displayed similar particulate labelling in the cytoplasm

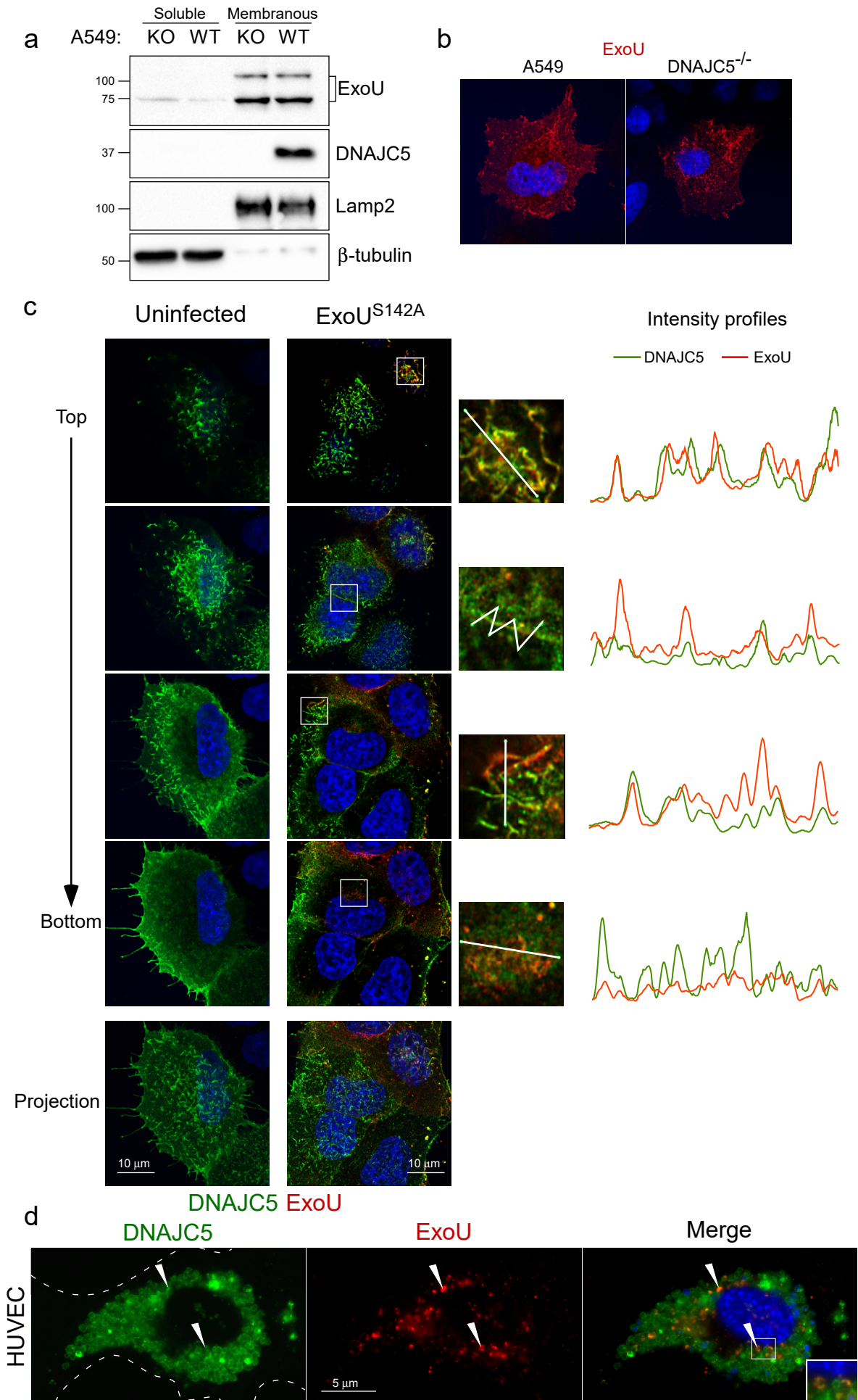


Fig. 3

of both cell types (**Figure 3b**). Thus, once ExoU is injected into cells, it binds to specific cytoplasmic structures in a DNAJC5-independent manner.

To determine whether ExoU colocalizes with DNAJC5 in these intracellular structures, ExoU and DNAJC5-Flag were labelled in DNAJC5^{-/-}::DNAJC5 cells infected with CHA-*exoU*^{S142A}. Most DNAJC5-FLAG labelling was observed at the cellular periphery, associated with elongated vesicles, and at cell-cell junctions (**Figure 3c**). Round DNAJC5⁺ vesicles were also present in the perinuclear region. These perinuclear DNAJC5⁺ LEs were also positive for the lysosome/late endosome marker Lamp2 (**Supplementary Figure 4**), as previously reported for Cos7 cells²⁸. ExoU was associated with DNAJC5 in both elongated and round vesicles, as well as at cell-cell junctions, in the top and middle parts of the cell. However, in the lower part of the cell, where the two labels were dissociated (**Figure 3c**). Interestingly, the presence of ExoU had no impact on the subcellular localization of DNAJC5⁺ vesicles.

To allow a more detailed examination of DNAJC5/ExoU colocalization, we performed a similar experiment with endothelial cells (HUVECs), which have larger, mostly perinuclear, DNAJC5⁺ LEs. In these cells, both DNAJC5-GFP and ExoU were localized at the vesicle's limiting membrane and were not intraluminal (**Figure 3d**), confirming that ExoU is membrane-associated.

Hsp70 and Hsc70 chaperones are dispensable for ExoU toxicity

As the T3SS does not accommodate folded proteins⁴⁴, ExoU is probably delivered unfolded into host cells. Therefore, we reasoned that ExoU might need the chaperone activity of the DNAJC5-Hsc70/Hsp70 complex to recover its catalytic activity. Three domains have been

Figure 3: ExoU partly localizes in DNAJC5-positive vesicles.

a. Fractionation of DNAJC5^{-/-} (KO) and DNAJC5^{-/-}::DNAJC5 (WT) cells infected with a *P. aeruginosa*'s strain (CHA-*exoU*^{S142A}) secreting a catalytically inactive ExoU mutant through its T3SS. Cells were harvested at 4 hpi and their soluble and membrane fractions were prepared. Western blots were performed on fractions using anti-ExoU, DNAJC5, Lamp2 (a late endosome -lysosome marker) and β -tubulin (a cytosolic marker) antibodies. The higher molecular weight bands revealed by the ExoU antibody represent the ubiquitinated form of ExoU66. **b.** ExoU immunofluorescence staining of A549 and DNAJC5^{-/-} cells infected with CHA-*exoU*^{S142A}. A single representative z-section is shown. **c left.** DNAJC5-FLAG immunofluorescence signals (green) in uninfected DNAJC5^{-/-}::DNAJC5 cells. Four z-sections obtained by confocal microscopy are shown from top to bottom. A z-projection is also shown below. Nuclei were counterstained in blue. **c right.** DNAJC5-FLAG (green) and ExoU (red) immunofluorescence signals in DNAJC5^{-/-}::DNAJC5 cells infected with CHA-*exoU*^{S142A}. As for uninfected cells, four z-sections and a z-projection are shown. For each section, a region was enlarged and a bar was drawn (represented on the right) to establish an intensity profile for both green and red fluorescences, as shown. **d.** DNAJC5-GFP and ExoU localizations in transfected HUVEC infected with CHA-*exoU*^{S142A} on a wide-field microscopy image. Arrowheads show colocalization of both markers. The insert is an enlargement of the merged image, showing DNAJC5 and ExoU localization at the vesicle's membrane.

identified in DNAJC5 (**Figure 4a**). A J domain, present in all DNAJ proteins, a cysteine string domain containing 14 cysteines and a C-terminal domain³². The J domain interacts with Hsc70/Hsp70 and enhances the ATPase activity of these chaperones⁴⁵. Palmitoylation of cysteines in the central domain allows initial DNAJC5 anchoring at the surface of endosomes⁴⁶. The C-terminal domain has been shown to associate with various proteins, including the vesicle-associated membrane protein (VAMP), a SNARE protein involved in the fusion of vesicles with the plasma membrane^{47,48}.

To determine whether the co-chaperoning role of DNAJC5 is linked to ExoU toxicity, we produced cells carrying several mutations to disrupt interactions between DNAJC5 and Hsp70/Hsc70, and infected them with ExoU+ *P. aeruginosa*. First, we complemented DNAJC5^{-/-} cells with DNAJC5^{H43Q}, as this mutation was previously shown to disrupt DNAJC5-Hsc70/Hsp70 interaction⁴⁹. DNAJC5^{-/-::DNAJC5^{H43Q}} cells displayed higher sensitivity to *P. aeruginosa*-induced cell lysis than DNAJC5^{-/-::DNAJC5} (**Figure 4b**), indicating that DNAJC5 interaction with Hsc70/Hsp70 is not required for ExoU activation, and instead delays ExoU-dependent cell lysis.

Shirafuji et al have reported that phosphorylation of two serines (S10 and S34) enhanced the co-chaperone activity of DNAJC5⁵⁰. Furthermore, they showed that replacing the two serines by alanines (DNAJC5^{S10A-S34A}) reduced DNAJC5 interaction with Hsp70. Therefore, we used DNAJC5^{-/-} cells complemented with DNAJC5 carrying both mutations in a cytotoxicity assay. ExoU displayed similar toxicity in DNAJC5^{-/-::DNAJC5} and DNAJC5^{-/-::DNAJC5^{S10A-S34A}} cells (**Figure 4b**), providing further evidence that DNAJC5's co-chaperone activity is not required for ExoU activation. Interestingly, the H43Q and S10A-S34A mutations had no effect on subcellular localization of DNAJC5, nor on its colocalization with ExoU and Lamp2 (**Figure 4c** and **Supplementary Figures 4** and **5**).

To definitively investigate the role played by Hsp70/Hsc70 in ExoU toxicity, we knocked-down each of these two proteins in A549 cells using siRNAs (**Figure 4d**). Both KD cell lines were sensitive to PA14-induced lysis with a similar profile to native cells (**Figure 4e**).

Based on these results, and despite the proven role of Hsc70/Hsp70 in protein exocytosis in MAPS²⁶, these chaperones appear not to be required for ExoU intoxication.

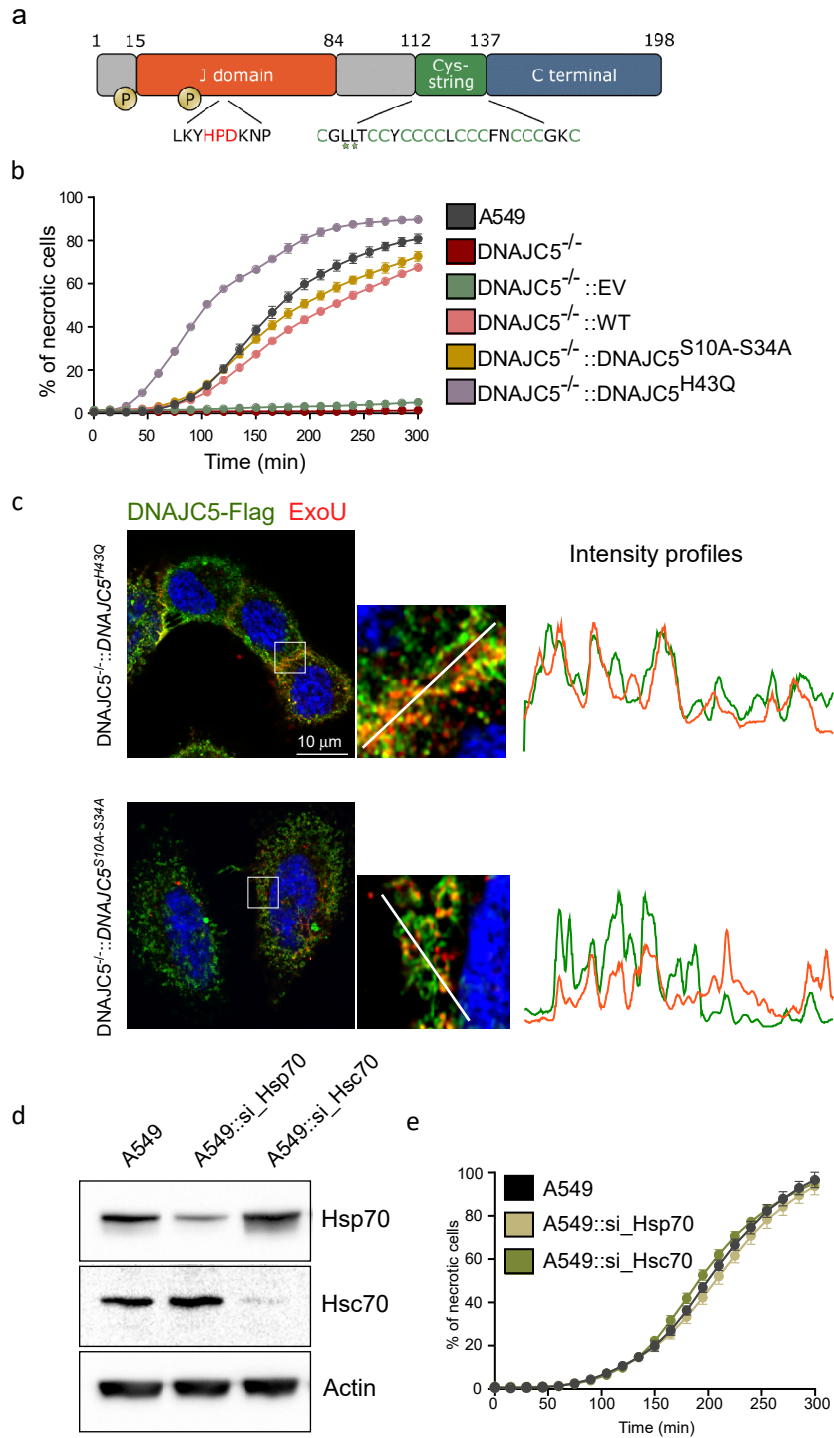


Figure 4: DNAJC5 co-chaperone activity is dispensable for ExoU toxicity.

a. Domain organization of the human DNAJC5 protein. The following locations are highlighted: the two phosphorylation sites (serine 10 and serine 34), the HPD motif for Hsc70/Hsp70 binding, and the cysteine-rich region containing the leucines L115 and L116, mutated in adult neuronal ceroid lipofuscinosis patients (stars). **b.** Effect of DNAJC5 mutations, H43Q and S10A-S34A, DNAJC5 mutations on ExoU toxicity. A549 cells, as well as DNAJC5^{-/-} cells complemented with either DNAJC5, DNAJC5^{H43Q}, DNAJC5^{S10A-S34A} or the empty vector (EV) were subjected to an infection assay with PA14. N = 6 fields per condition. **c.** DNAJC5-FLAG (green) and ExoU (red) immunofluorescence signals for DNAJC5^{-/-}::DNAJC5^{H43Q} and DNAJC5^{-/-}::DNAJC5^{S10A-S34A} cells infected with CHA-exoU^{S142A} strain, which secretes a catalytically-inactive ExoU mutant. One z-section is shown. For each section, a region was enlarged and a bar was drawn (represented on the right) to establish the intensity profiles for both green and red fluorescence. **d, e.** Effect of decreased Hsc70 and Hsp70 expression on ExoU toxicity. A549 cells were transfected with siRNAs for Hsp70 (si_Hsp70) or Hsc70 (si_Hsc70) to knock down their expression. Knock-down was monitored by Western blot (**d**). KD cells were subjected to an infection assay (**e**), in the same conditions as in (**b**).

DNAJC5 escort of ExoU to the plasma membrane is required for toxicity

Having eliminated its co-chaperone role, we next investigated whether the trafficking activity of DNAJC5 was required for ExoU-dependent necrosis.

Adult neuronal ceroid lipofuscinosis is a neurodegenerative disease caused by mutations in *DNAJC5*^{31,34,35}. Two mutations have been reported in patients: L115R and Δ L116 (stars in **Figure 4a**). These mutations form protein oligomers^{51,52} that impair the trafficking of DNAJC5+ vesicles towards the plasma membrane, causing the accumulation of misfolded proteins in cells, and leading to progressive neuronal dysfunction⁵¹. When expressed in *DNAJC5*^{-/-} cells, *DNAJC5*^{L115R} and *DNAJC5* ^{Δ L116} localized in perinuclear vesicles, but not in vesicles at the cellular periphery (**Supplementary Figure 5**), a feature previously reported in PC12 neuroblastic cells⁵¹. Furthermore, these DNAJC5+ vesicles were not labelled with Lamp2, which is associated with other perinuclear vesicles (**Supplementary Figure 4**). In both *DNAJC5*^{-/-}::*DNAJC5*^{L115R} and *DNAJC5*^{-/-}::*DNAJC5* ^{Δ L116}, ExoU colocalized with DNAJC5-FLAG (**Figure 5a,b**). However, ExoU toxicity was severely diminished, recovering only minimally with *DNAJC5*^{L115R} or moderately with *DNAJC5* ^{Δ L116} in these complemented cell lines (**Figure 5c**).

To confirm these results, we produced another DNAJC5 mutant lacking the J domain, also forming protein oligomers⁵², which has been hypothesized to alter DNAJC5 transportation function. *DNAJC5* ^{Δ Jdomain} similarly lead to restricted DNAJC5 localization in the perinuclear region, with some enlarged vesicles (**Supplementary Figures 4 and 5**), possibly due to protein accumulation in the lumen, where ExoU and Lamp2 colocalized (**Figure 5d**). As with the pathological mutations L115R and Δ L116, ExoU toxicity was dramatically reduced in *DNAJC5*^{-/-}::*DNAJC5* ^{Δ Jdomain} cells (**Figure 5e**).

Based on these results, we concluded that DNAJC5 mutations affecting vesicle trafficking to the plasma membrane block ExoU-driven cell necrosis.

ExoU phospholipase activity is independent of DNAJC5

To assess whether DNAJC5 contributes to the activation of ExoU enzymatic activity *per se*, we expressed and purified recombinant ExoU and examined its catalytic activity in a PLA2 assay, in the presence of membrane or soluble fractions prepared from uninfected *DNAJC5*^{-/-} or *DNAJC5*^{-/-}::*DNAJC5* cells. Only the membrane fractions enhanced ExoU phospholipase activity (**Figure 6**), suggesting that a membranous component, probably PI(4,5)P2, activates ExoU catalytic activity, as previously reported¹⁴. Importantly, no significant difference was detected

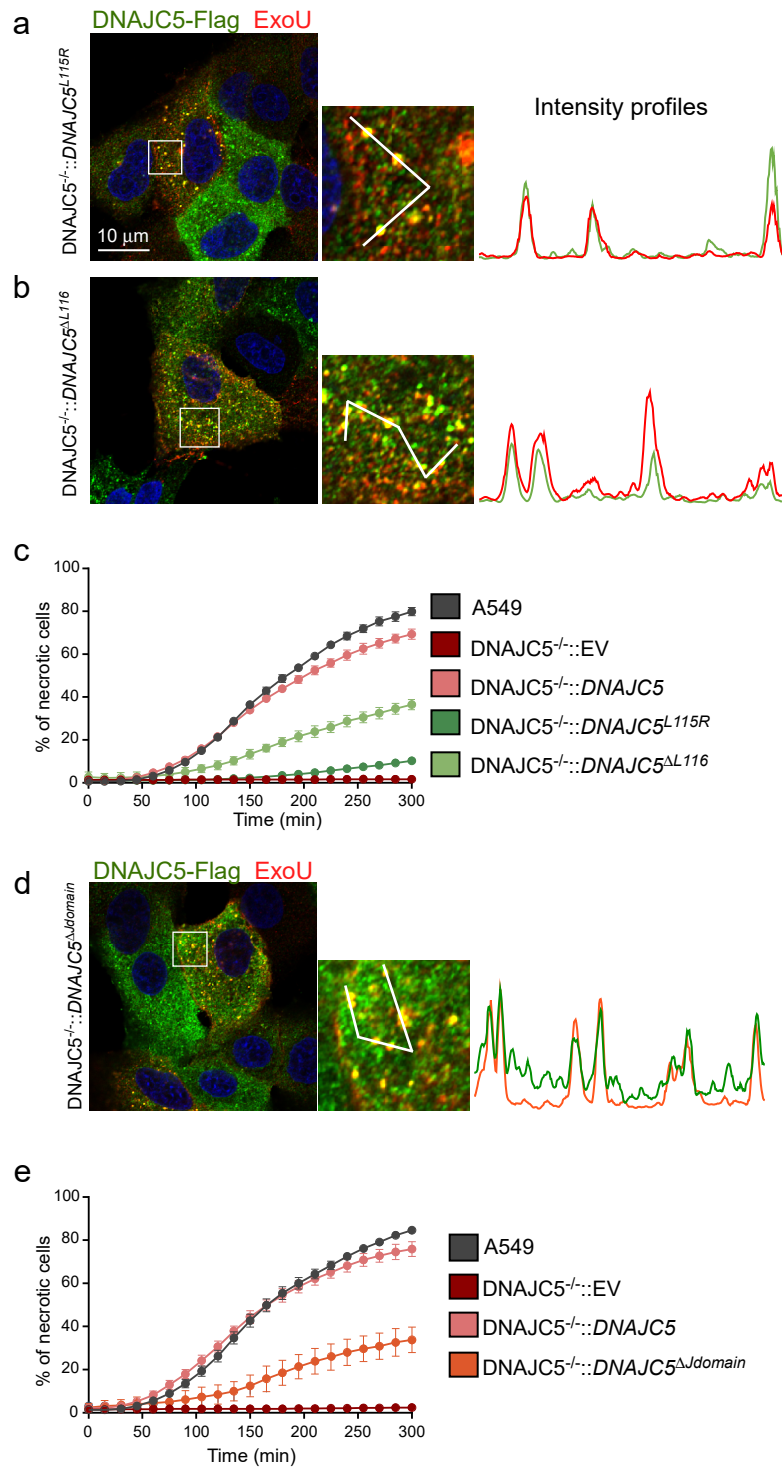


Figure 5. DNAJC5 escort of ExoU to the plasma membrane is required for toxicity.

a. Localizations by immunofluorescence of ExoU (red) and DNAJC5-FLAG (green) in DNAJC5^{-/-}::DNAJC5^{L115R} cells infected with CHA-*exoU*^{S142A} on a z-section. A selected area was enlarged and a bar was drawn, to establish the intensity profiles for both signals. **b.** Immunofluorescence localizations of ExoU (red) and DNAJC5-FLAG (green) in DNAJC5^{-/-}::DNAJC5^{ΔL116} cells infected with CHA-*exoU*^{S142A}. Intensity profiles were obtained as above. **c.** Cytotoxicity assay with DNAJC5^{-/-}::DNAJC5^{L115R} and DNAJC5^{-/-}::DNAJC5^{ΔL116} cells, alongside controls, infected with PA14. N = 6 fields per condition. **d.** Immunofluorescence localizations of ExoU (red) and DNAJC5 (green) in DNAJC5^{-/-}::DNAJC5^{ΔJdomain} cells infected with CHA-*exoU*^{S142A}. Intensity profiles were obtained as above. **e.** Effect of J domain deletion. Control cells and DNAJC5^{-/-} cells complemented with full-length DNAJC5, DNAJC5^{ΔJdomain} or EV were infected with PA14, and cytotoxicity was recorded. (n = 6).

when ExoU was incubated with membrane fractions from either DNAJC5^{-/-} or DNAJC5^{-/-}::DNAJC5 cells, showing that DNAJC5 is not directly involved in ExoU phospholipase activity.

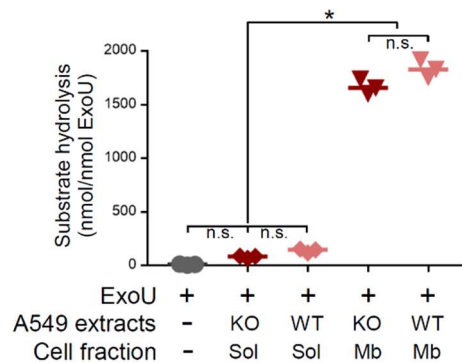


Figure 6. ExoU phospholipase activity is independent of DNAJC5.

Phospholipase activity of purified ExoU (65 pmols) was measured in the presence of soluble (Sol) or membrane (Mb) fractions from uninfected DNAJC5^{-/-} (KO) or DNAJC5^{-/-}::DNAJC5 (WT) cells. Experiments were performed in triplicates and incubated for 24 h. Data are expressed in nmoles of substrate hydrolyzed per nmoles of ExoU. Statistical differences were established by ANOVA ($p < 0.0001$), followed by Tukey's test (*, $p < 0.0001$).

Discussion

The aim of this study was to identify host factors required for full ExoU toxicity using a genome-wide screening approach. Our results demonstrate that the host chaperone DNAJC5 is required for the toxic activity of ExoU. In the bacterial cytoplasm, ExoU forms a complex with its cognate chaperone, SpcU, from which it dissociates prior to travel, probably unfolded, through the injectisome⁵³. Once injected into the host cell, ExoU partly colocalizes with DNAJC5+ vesicles in the perinuclear zone (i.e., LEs) and at the cellular periphery. DNAJC5 and Lamp2 only colocalized in perinuclear vesicles, and Lamp2 labelling was lost when DNAJC5+ vesicles were exported to the cellular periphery (**Supplementary Figure 4**). Similar patterns were reported in Cos7 cells with Lamp1, another late endosome/lysosome marker²⁹, indicating that peripheral DNAJC5+ vesicles cannot be considered strictly "late endosomes". DNAJC5 has been linked to an unconventional secretion system (MAPS), both for the translocation of misfolded cytosolic proteins into the vesicle's lumen and for the transport of these vesicles to the plasma membrane. DNAJC5-dependent protein exocytosis uses one of the two processes: either the vesicle fuses to the plasma membrane, allowing the release of the vesicle's intraluminal content into the extracellular milieu²⁷, or exosomes are produced³⁰.

Unlike classical MAPS cargos, ExoU localized to the vesicle's limiting membrane (**Figure 3d**), it is therefore probably not translocated into the vesicle's lumen, and remains at the external side. This position would allow ExoU to target the inner leaflet of the plasma membrane once the vesicle reaches the cell's periphery (**Supplementary Figure 6**). Moreover, MAPS cargos need Hsp70/Hsc70 chaperones for secretion through this pathway²⁶, while ExoU transport is Hsp70/Hsc70-independent (**Figure 4**). This lack of chaperone-dependence is probably linked to its position on the external side of the vesicle membrane.

ExoU toxicity was altered by mutations known to alter DNAJC5 function in vesicle trafficking, i.e., L115R and Δ L116^{31,34,35,51}, as well as J domain deletion. These results confirm that ExoU, once delivered into the host's cytoplasm, uses the DNAJC5-associated secretion machinery for transport to the plasma membrane. This result also suggests that patients with adult neuronal ceroid lipofuscinosis might be more resistant to ExoU intoxication.

Although ExoU and DNAJC5 colocalized at the vesicle's limiting membrane, our attempts to identify a physical association between ExoU and DNAJC5 were unsuccessful. Furthermore, lack of DNAJC5 did not prevent ExoU from associating with membranes (**Figure 3a,b**), confirming that ExoU binding to intracellular vesicles is DNAJC5-independent. Therefore, although DNAJC5 is an essential component of the ExoU transportation pathway, it is not the receptor for ExoU at the vesicle's surface. Consequently, further studies will be required to identify the receptors allowing ExoU to dock to vesicle membranes.

The importance of ubiquitin binding to ExoU to stabilize the ExoU-membrane association and enhance its catalytic activity was demonstrated in previous studies^{10,11,54,55}. It will now be interesting to examine whether ubiquitin binding also facilitates or strengthens the association between ExoU and DNAJC5+ vesicles, as it does at the plasma membrane.

Several bacterial toxins exploit vesicle trafficking for retrograde transport⁵⁶, including T3SS cytotoxins^{57,58}. In particular, *P. aeruginosa*'s ExoS toxin moves to the perinuclear region in a microtubule- and dynamin-dependent process, suggesting involvement of the endocytic pathway⁵⁹. Interestingly, ExoU was observed to associate with DNAJC5- vesicles, particularly in the lower part of the cell (**Figure 3c**). We previously showed that ExoU partially colocalized in cytoplasmic vesicles with EEA1⁴³, a protein marker of early endosomes. It is thus possible that ExoU reaches the perinuclear region by an endocytic pathway like that exploited by ExoS, because vesicle transport is faster than free diffusion in the cytosol.

According to Deng et al.⁵⁹, ExoS recycles to the plasma membrane by an unknown process. Our results showing full ExoS toxicity in *DNAJC5*^{-/-} cells (**Supplementary Figure 2a,b**) demonstrate that ExoS and ExoU use distinct pathways to reach the plasma membrane.

As reported previously, only PI(4,5)P₂, localized at the plasma membrane, can induce a conformational change in ExoU structure, leading to ExoU oligomerization and activating its catalytic activity^{12,14,60}. In agreement with this specific activation mechanism, our results show that *DNAJC5*-dependent plasma membrane targeting is required for ExoU in cytoplasmic vesicles to induce membrane disruption (**Figure 1c**).

In conclusion, we have elucidated a favored transportation system targeting ExoU to the only cellular location where it is active, i.e., the plasma membrane. Importantly, our initial screen for factors involved in this targeting identified only *DNAJC5*, suggesting that the protein it produces may be the Achilles' heel for this highly potent toxin. Inhibitors of *DNAJC5* (with a better efficiency than quercetin) or the MAPS pathway could be of considerable interest for adjunct therapy to treat infections with ExoU+ *P. aeruginosa* strains.

Materials and Methods

Lentiviral production using TKOv3 library and MOI determination

Toronto human knockout pooled library (TKOv3) was a gift from Jason Moffat and obtained from Addgene (#90294). It is a one-component library with guide-RNAs inserted in lentiCRISPRv2 backbone as well as the *cas9* gene. This library contains four gRNAs targeting each of the 18,053 protein coding genes and control gRNAs targeting EGFP, LacZ and luciferase (71,090 total gRNAs). The gRNA library-expressing lentiviruses were produced as described in Moffat's lab protocol (REV.20170404). The library was amplified in Lucigen Endura electrocompetent cells (#60242) to reach at least 200x colonies per guide-RNA and the library plasmid pool was purified using NucleoBond Xtra-Maxi Kit (Macherey-Nagel, #740414.50). Then, lentiviruses were produced by transfection of HEK293T cells with the library plasmid pool. In brief, X-tremeGENE 9 DNA Transfection reagent (Roche, #06365787001) was diluted in Opti-MEM serum-free media. Following 5 min of incubation at room temperature, an appropriate mixture of plasmids was added in a 3:1 ratio of Transfection Reagent: DNA complex. This mixture of plasmids was composed of the library plasmid pool and the lentiviral packaging and envelope plasmids (psPAX2 and pMD2.G) at a 1:1:1 molar ratio (8 µg:4.8 µg:3.2 µg, respectively). The solution was then mixed and incubated at room temperature for 30 min.

Thereafter, the transfection mix was added to 70-80% confluence HEK293T cells in a drop-wise manner and cells were incubated for 24 h. Following this incubation time, media were replaced by fresh DMEM, containing 6% of bovine serum albumin (BSA). The next day, the lentiviruses-containing media were harvested, centrifuged to pellet any packaging cells, and supernatants were stored at -80°C. The lentiviral concentration was established by serial dilutions on A549 cells, as described below, treated or not treated with 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ puromycin. The virus volume that gave 30% survival with puromycin selection vs without puromycin was chosen for library construction, in order to limit the number of lentiviruses per cell.

Construction of CRISPR-Cas9 library in A549 cells and ExoU screen

The gRNA library-expressing A549 cells (hereinafter named A549-CRISPR cells) were constructed as described in Moffat's lab protocol. Briefly, $5\cdot 10^7$ trypsinized A549 cells (calculated for 200-fold TKOv3 library coverage) were prepared in DMEM containing 10% FBS, supplemented with 8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ polybrene to enhance lentiviral infection. Cells were incubated with lentiviral particles at MOI of 0.3. After 24 hours of incubation, media were replaced with DMEM containing 10% FBS supplemented with 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ puromycin and cells were additionally incubated for 48 h to select transfected cells. The library was frozen at -80°C before the screen.

For the screen, $15\cdot 10^6$ A549-CRISPR cells were plated on a 15-cm dish and infected with PA14 for 90 min at MOI of 10 to reach 20-30% of surviving cells. To stop the infection, cells were trypsinized after washing and reseeded in DMEM supplemented with 10% FBS and 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ polymyxin B. The surviving population was expanded and evaluated daily to monitor the recovery of cells. The day after the seeding, 90 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ gentamicin was also added in the medium to prevent proliferation of polymyxin-resistant bacteria. When surviving cells reached 70-80% confluence, they were subjected to a second and a third round of infection with PA14, allowing the repetition of the procedure with the same library coverage. The screen on A549-CRISPR cells was done in biological triplicates.

Genomic DNA extraction, sequencing and analysis

After three rounds of infection, the surviving populations were expanded to obtain $2\cdot 10^7$ cells. Uninfected A549-CRISPR cells were expanded similarly. Each cell population was subjected to genomic DNA (gDNA) extraction with a QIAamp DNA Blood Maxi kit (Qiagen, #51194) by

following the manufacturer's protocol. Then, a one-step PCR was carried out to enrich and amplify gRNAs from the genome of selected cell populations with Illumina TruSeq adapters (i5 and i7 indices). Moreover, a unique barcode of two 8-bp index required for Illumina sequencing was added during the one-step PCR to each pool of amplified gRNAs. The PCR conditions for 50 μ L were 25 μ l of GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix (#M7423, Promega), 0.5 μ M of each primer (Supplementary Table 3) and 2.5 μ g of gDNA. Three PCR reactions were performed simultaneously per sample to obtain sufficient quantities of amplified products. The PCR program was: denaturation at 95°C for 2 min, followed by 26 cycles at 95°C for 30 s, 55°C for 30 s and 65°C for 30 s, and a final elongation step at 65°C for 5 min. After PCR amplification, each 50- μ L reaction from the same sample were pooled, electrophoresed and the 200-bp bands were excised from agarose gel slice using Monarch DNA Gel extraction Kit (NEB, #T1020S). Then, each sequencing library was quantified on both NanoDrop and Qubit and a quality control of DNA was performed on Agilent Bioanalyzer system. Finally, a high throughput sequencing was performed on the pool of amplicons using a NextSeq 500 device (Illumina) at the CNRS platform of Orsay (Institut de Biologie Intégrative de la Cellule) and raw data were processed and analysed using a web-based analysis platform named CRISPR-AnalyzeR. The adjusted p-values were analysed according to MAGeCK method to identify overrepresented genes targeted by gRNAs in output compared to input.

Cytotoxicity assay

For infection assays, 1.5×10^4 A549 cells or derivatives were seeded per well in a 96-well plate 48 h before infection in DMEM supplemented with 10% FBS and 200 μ g.mL⁻¹ neomycin for transfectants. Thirty minutes before infection, Syto24 was added to the medium at 0.5 μ M to label cell nuclei. Then, medium was removed and replaced by DMEM supplemented with PI at 1 μ M. Cells were subsequently infected at MOI 20 with bacteria (OD1) unless indicated. The kinetics of PI incorporation was followed using an IncuCyte live-Cell microscope (Sartorius). Acquisitions were done every 15 min for 5 h using a 10X objective. Images from bright field (phase), green channel (acquisition time 200 ms) and red channel (acquisition time 400 ms) were collected. The percentage of necrotic cells was calculated by dividing the number of PI-positive cells by the number of Syto24-positive cells.

For the cell retraction assay, cells were labelled with the CellTracker Red CMTPX (1 μ M). Images were treated with ImageJ software. Briefly, images of CellTracker staining were binarized and total cell surface was calculated for 6 images at each time point.

Immunofluorescence microscopy

For ExoU, DNAJC5, FLAG and Lamp2 stainings, 5×10^5 A549 cells or derivatives were seeded in each well of a 24-well plate 48 h before fixation. For the co-staining with ExoU, cells were previously infected with CHA-ExoU^{S142A} or CHA-ExoU^{S142A Δ domain} for 4 h at MOI of 10. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min at room temperature and permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS containing 4% PFA for 5 min. Cells were then stained using standard procedure with appropriate primary and secondary antibodies. Then, cells were counterstained with Hoechst. Images were collected on a Zeiss LSM880 confocal equipped with a Zeiss Plan-APO x63 numerical aperture 1.4 oil immersion objective. Successive planes in 3D stacks were taken every 0.2 μ m. Images of z-sections were analysed using the Intensity profile module from Icy software.

***Drosophila* mutant engineering and infection assay**

To silence the *Csp* gene in *Drosophila melanogaster*, RNA interference was used. In brief, two different transgenic fly lines *Csp*-KD1 (Stock #34168 from the Vienna *Drosophila* Resource Center) and *Csp*-KD2 (Stock #33645 from the Bloomington *Drosophila* Stock Center) expressing a shRNA or a long dsRNA targeting *Csp*, respectively, under the control of GAL4-responsive elements were used. These flies were crossed with transgenic flies expressing the *Gal4* gene under the control of a temperature-inducible promoter (hs-Gal4, stock #2077 from the Bloomington *Drosophila* Stock Center). Flies expressing a siRNA targeting the firefly *Luciferase* gene (Stock #31603 from the Bloomington *Drosophila* Stock Center) were also crossed with the heat shock-Gal4 line and used as control. The progeny was reared until the flies were 7 to 10-day old and the *Gal4* gene expression was induced by three heat shocks of 1 h at 37°C, each performed during three consecutive days, in order to silence the *Csp* gene. Flies were then infected with a stationary phase culture of PP34 strain (or PP34 Δ exoU strain), diluted at OD 1, by thoracic needle pricking, as previously described⁴², and their survival rates were monitored. To confirm the knockdown of CSP, 20 flies per condition were homogenized in RIPA lysis buffer with a Precellys 24 (Bertin instruments) using CK14 tubes

containing ceramic beads at 5,000 rpm for four cycles of 30 s. Lysates were analysed by Western blot using the anti-*Drosophila* CSP antibody.

Statistics

Statistics on genomic screening data are described above.

GraphPad 7.04 software was used for all other statistical analyses. For cytotoxicity studies or cell retraction assay, no statistical test was used. For Bla activity assay, a Student's t-test was used between conditions using ExoU-bla. For PLA2 activity test, a one-way ANOVA was employed, followed by Tukey's post-hoc test for data comparison. For the two latter assays, data distribution was normal according to Shapiros-Wilk's test. For fly infection, a Log-Rank test was used. Data were considered significantly different when $p < 0.01$.

Data availability

The sequencing data have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) and are accessible through GEO accession number GSE154751.

References

- 1 Gellatly, S. L. & Hancock, R. E. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis* **67**, 159-173, doi:10.1111/2049-632X.12033 (2013).
- 2 Hauser, A. R. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* **7**, 654-665, doi:10.1038/nrmicro2199 (2009).
- 3 Williams, B. J., Dehnbostel, J. & Blackwell, T. S. *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. *Respirology* **15**, 1037-1056, doi:10.1111/j.1440-1843.2010.01819.x (2010).
- 4 Botelho, J., Grosso, F. & Peixe, L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* - Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist Updat* **44**, 100640, doi:10.1016/j.drug.2019.07.002 (2019).
- 5 Horcajada, J. P. *et al.* Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clin Microbiol Rev* **32**, doi:10.1128/CMR.00031-19 (2019).

- 6 Pachori, P., Gothwal, R. & Gandhi, P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes Dis* **6**, 109-119, doi:10.1016/j.gendis.2019.04.001 (2019).
- 7 Juan, C., Pena, C. & Oliver, A. Host and Pathogen Biomarkers for Severe *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *The Journal of infectious diseases* **215**, S44-S51, doi:10.1093/infdis/jiw299 (2017).
- 8 Belyy, A. *et al.* Actin activates *Pseudomonas aeruginosa* ExoY nucleotidyl cyclase toxin and ExoY-like effector domains from MARTX toxins. *Nat Commun* **7**, 13582, doi:10.1038/ncomms13582 (2016).
- 9 Karlberg, T. *et al.* 14-3-3 proteins activate *Pseudomonas* exotoxins-S and -T by chaperoning a hydrophobic surface. *Nat Commun* **9**, 3785, doi:10.1038/s41467-018-06194-1 (2018).
- 10 Anderson, D. M. *et al.* Identification of the major ubiquitin-binding domain of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU A2 phospholipase. *J Biol Chem* **288**, 26741-26752, doi:10.1074/jbc.M113.478529 (2013).
- 11 Anderson, D. M. *et al.* Ubiquitin and ubiquitin-modified proteins activate the *Pseudomonas aeruginosa* T3SS cytotoxin, ExoU. *Molecular microbiology* **82**, 1454-1467, doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07904.x (2011).
- 12 Springer, T. I., Reid, T. E., Gies, S. L. & Feix, J. B. Interactions of the effector ExoU from *Pseudomonas aeruginosa* with short-chain phosphatidylinositides provide insights into ExoU targeting to host membranes. *J Biol Chem* **294**, 19012-19021, doi:10.1074/jbc.RA119.010278 (2019).
- 13 Tyson, G. H. *et al.* A novel phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding domain mediates plasma membrane localization of ExoU and other patatin-like phospholipases. *J Biol Chem* **290**, 2919-2937, doi:10.1074/jbc.M114.611251 (2015).
- 14 Tyson, G. H. & Hauser, A. R. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is a novel coactivator of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU. *Infect Immun* **81**, 2873-2881, doi:10.1128/IAI.00414-13 (2013).
- 15 Garey, K. W., Vo, Q. P., Larocco, M. T., Gentry, L. O. & Tam, V. H. Prevalence of type III secretion protein exoenzymes and antimicrobial susceptibility patterns from bloodstream isolates of patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *J Chemother* **20**, 714-720, doi:10.1179/joc.2008.20.6.714 (2008).

- 16 Horna, G., Amaro, C., Palacios, A., Guerra, H. & Ruiz, J. High frequency of the exoU+/exoS+ genotype associated with multidrug-resistant "high-risk clones" of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Peruvian hospitals. *Sci Rep* **9**, 10874, doi:10.1038/s41598-019-47303-4 (2019).
- 17 Recio, R. *et al.* Predictors of Mortality in Bloodstream Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa* and Impact of Antimicrobial Resistance and Bacterial Virulence. *Antimicrob Agents Chemother* **64**, doi:10.1128/AAC.01759-19 (2020).
- 18 Subedi, D., Vijay, A. K., Kohli, G. S., Rice, S. A. & Willcox, M. Association between possession of ExoU and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **13**, e0204936, doi:10.1371/journal.pone.0204936 (2018).
- 19 Takata, I., Yamagishi, Y. & Mikamo, H. Association of the exoU genotype with a multidrug non-susceptible phenotype and mRNA expressions of resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Chemother* **24**, 45-52, doi:10.1016/j.jiac.2017.08.018 (2018).
- 20 Phillips, R. M., Six, D. A., Dennis, E. A. & Ghosh, P. In vivo phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU and protection of mammalian cells with phospholipase A2 inhibitors. *J Biol Chem* **278**, 41326-41332, doi:10.1074/jbc.M302472200 (2003).
- 21 Sato, H. *et al.* The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J* **22**, 2959-2969, doi:10.1093/emboj/cdg290 (2003).
- 22 Chamberlain, L. H. & Burgoyne, R. D. Cysteine-string protein: the chaperone at the synapse. *J Neurochem* **74**, 1781-1789, doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0741781.x (2000).
- 23 Donnelier, J. & Braun, J. E. CSPalpha-chaperoning presynaptic proteins. *Front Cell Neurosci* **8**, 116, doi:10.3389/fncel.2014.00116 (2014).
- 24 Gundersen, C. B. Cysteine string proteins. *Prog Neurobiol* **188**, 101758, doi:10.1016/j.pneurobio.2020.101758 (2020).
- 25 Evans, G. J., Morgan, A. & Burgoyne, R. D. Tying everything together: the multiple roles of cysteine string protein (CSP) in regulated exocytosis. *Traffic* **4**, 653-659, doi:10.1034/j.1600-0854.2003.00127.x (2003).

- 26 Fontaine, S. N. *et al.* DnaJ/Hsc70 chaperone complexes control the extracellular release of neurodegenerative-associated proteins. *EMBO J* **35**, 1537-1549, doi:10.15252/embj.201593489 (2016).
- 27 Ye, Y. Regulation of protein homeostasis by unconventional protein secretion in mammalian cells. *Semin Cell Dev Biol* **83**, 29-35, doi:10.1016/j.semcdb.2018.03.006 (2018).
- 28 Lee, J. *et al.* Secretion of misfolded cytosolic proteins from mammalian cells is independent of chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem* **293**, 14359-14370, doi:10.1074/jbc.RA118.003660 (2018).
- 29 Xu, Y. *et al.* DNAJC5 facilitates USP19-dependent unconventional secretion of misfolded cytosolic proteins. *Cell Discov* **4**, 11, doi:10.1038/s41421-018-0012-7 (2018).
- 30 Deng, J. *et al.* Neurons Export Extracellular Vesicles Enriched in Cysteine String Protein and Misfolded Protein Cargo. *Sci Rep* **7**, 956, doi:10.1038/s41598-017-01115-6 (2017).
- 31 Benitez, B. A. *et al.* Exome-sequencing confirms DNAJC5 mutations as cause of adult neuronal ceroid-lipofuscinosis. *PLoS One* **6**, e26741, doi:10.1371/journal.pone.0026741 (2011).
- 32 Burgoyne, R. D. & Morgan, A. Cysteine string protein (CSP) and its role in preventing neurodegeneration. *Semin Cell Dev Biol* **40**, 153-159, doi:10.1016/j.semcdb.2015.03.008 (2015).
- 33 Lee, J. G., Takahama, S., Zhang, G., Tomarev, S. I. & Ye, Y. Unconventional secretion of misfolded proteins promotes adaptation to proteasome dysfunction in mammalian cells. *Nat Cell Biol* **18**, 765-776, doi:10.1038/ncb3372 (2016).
- 34 Noskova, L. *et al.* Mutations in DNAJC5, encoding cysteine-string protein alpha, cause autosomal-dominant adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis. *Am J Hum Genet* **89**, 241-252, doi:10.1016/j.ajhg.2011.07.003 (2011).
- 35 Velinov, M. *et al.* Mutations in the gene DNAJC5 cause autosomal dominant Kufs disease in a proportion of cases: study of the Parry family and 8 other families. *PLoS One* **7**, e29729, doi:10.1371/journal.pone.0029729 (2012).
- 36 Diaz, M. H. & Hauser, A. R. *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU is injected into phagocytic cells during acute pneumonia. *Infect Immun* **78**, 1447-1456, doi:10.1128/IAI.01134-09 (2010).

- 37 Xu, F. *et al.* Quercetin targets cysteine string protein (CSP α) and impairs synaptic transmission. *PLoS One* **5**, e11045, doi:10.1371/journal.pone.0011045 (2010).
- 38 Elsen, S. *et al.* A type III secretion negative clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* employs a two-partner secreted exolysin to induce hemorrhagic pneumonia. *Cell Host Microbe* **15**, 164-176, doi:10.1016/j.chom.2014.01.003 (2014).
- 39 Fernandez-Chacon, R. *et al.* The synaptic vesicle protein CSP α prevents presynaptic degeneration. *Neuron* **42**, 237-251, doi:10.1016/s0896-6273(04)00190-4 (2004).
- 40 Kashyap, S. S. *et al.* *Caenorhabditis elegans* dnj-14, the orthologue of the DNAJC5 gene mutated in adult onset neuronal ceroid lipofuscinosis, provides a new platform for neuroprotective drug screening and identifies a SIR-2.1-independent action of resveratrol. *Hum Mol Genet* **23**, 5916-5927, doi:10.1093/hmg/ddu316 (2014).
- 41 Zinsmaier, K. E., Eberle, K. K., Buchner, E., Walter, N. & Benzer, S. Paralysis and early death in cysteine string protein mutants of *Drosophila*. *Science* **263**, 977-980, doi:10.1126/science.8310297 (1994).
- 42 Fauvarque, M. O. *et al.* Role and activation of type III secretion system genes in *Pseudomonas aeruginosa*-induced *Drosophila* killing. *Microb Pathog* **32**, 287-295, doi:10.1006/mpat.2002.0504 (2002).
- 43 Gendrin, C. *et al.* Structural basis of cytotoxicity mediated by the type III secretion toxin ExoU from *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS pathogens* **8**, e1002637, doi:10.1371/journal.ppat.1002637 (2012).
- 44 Akeda, Y. & Galan, J. E. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**, 911-915, doi:10.1038/nature03992 (2005).
- 45 Chamberlain, L. H. & Burgoyne, R. D. Activation of the ATPase activity of heat-shock proteins Hsc70/Hsp70 by cysteine-string protein. *Biochem J* **322** (Pt 3), 853-858, doi:10.1042/bj3220853 (1997).
- 46 Greaves, J., Salaun, C., Fukata, Y., Fukata, M. & Chamberlain, L. H. Palmitoylation and membrane interactions of the neuroprotective chaperone cysteine-string protein. *J Biol Chem* **283**, 25014-25026, doi:10.1074/jbc.M802140200 (2008).
- 47 Boal, F., Zhang, H., Tessier, C., Scotti, P. & Lang, J. The variable C-terminus of cysteine string proteins modulates exocytosis and protein-protein interactions. *Biochemistry* **43**, 16212-16223, doi:10.1021/bi048612+ (2004).

- 48 Leveque, C. *et al.* Interaction of cysteine string proteins with the alpha1A subunit of the P/Q-type calcium channel. *J Biol Chem* **273**, 13488-13492, doi:10.1074/jbc.273.22.13488 (1998).
- 49 Chamberlain, L. H. & Burgoyne, R. D. The molecular chaperone function of the secretory vesicle cysteine string proteins. *J Biol Chem* **272**, 31420-31426, doi:10.1074/jbc.272.50.31420 (1997).
- 50 Shirafuji, T. *et al.* The Role of Cysteine String Protein alpha Phosphorylation at Serine 10 and 34 by Protein Kinase Cgamma for Presynaptic Maintenance. *J Neurosci* **38**, 278-290, doi:10.1523/JNEUROSCI.1649-17.2017 (2018).
- 51 Greaves, J. *et al.* Palmitoylation-induced aggregation of cysteine-string protein mutants that cause neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Biol Chem* **287**, 37330-37339, doi:10.1074/jbc.M112.389098 (2012).
- 52 Zhang, Y. Q. & Chandra, S. S. Oligomerization of Cysteine String Protein alpha mutants causing adult neuronal ceroid lipofuscinosis. *Biochim Biophys Acta* **1842**, 2136-2146, doi:10.1016/j.bbadis.2014.07.009 (2014).
- 53 Finck-Barbancon, V., Yahr, T. L. & Frank, D. W. Identification and characterization of SpcU, a chaperone required for efficient secretion of the ExoU cytotoxin. *J Bacteriol* **180**, 6224-6231 (1998).
- 54 Tessmer, M. H. *et al.* Identification of a ubiquitin-binding interface using Rosetta and DEER. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 525-530, doi:10.1073/pnas.1716861115 (2018).
- 55 Tessmer, M. H., Anderson, D. M., Buchaklian, A., Frank, D. W. & Feix, J. B. Cooperative Substrate-Cofactor Interactions and Membrane Localization of the Bacterial Phospholipase A2 (PLA2) Enzyme, ExoU. *J Biol Chem* **292**, 3411-3419, doi:10.1074/jbc.M116.760074 (2017).
- 56 Asrat, S., de Jesus, D. A., Hempstead, A. D., Ramabhadran, V. & Isberg, R. R. Bacterial pathogen manipulation of host membrane trafficking. *Annu Rev Cell Dev Biol* **30**, 79-109, doi:10.1146/annurev-cellbio-100913-013439 (2014).
- 57 Krall, R., Zhang, Y. & Barbieri, J. T. Intracellular membrane localization of pseudomonas ExoS and Yersinia YopE in mammalian cells. *J Biol Chem* **279**, 2747-2753, doi:10.1074/jbc.M301963200 (2004).

- 58 Skrzypek, E., Cowan, C. & Straley, S. C. Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. *Molecular microbiology* **30**, 1051-1065, doi:10.1046/j.1365-2958.1998.01135.x (1998).
- 59 Deng, Q., Zhang, Y. & Barbieri, J. T. Intracellular trafficking of *Pseudomonas* ExoS, a type III cytotoxin. *Traffic* **8**, 1331-1345, doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00626.x (2007).
- 60 Zhang, A., Veessenmeyer, J. L. & Hauser, A. R. Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate-Dependent Oligomerization of the *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxin ExoU. *Infect Immun* **86**, doi:10.1128/IAI.00402-17 (2018).

Acknowledgments

We are grateful to Luke Chamberlain for the gift of the EGFP-DNAJC5 expression plasmids, to Simona Barzu for the ExoU antibody, Michel Ragno for ExoU purification. Confocal microscopy was performed at the μ Life platform and automated microscopy at the CMBA platform. International Health Management Association (IHMA, USA) kindly provided the *P. aeruginosa* IHMA879472 strain. We thank Laurence Aubry and Agnès Journet for helpful discussions.

Author contribution

V.D. and S.B. performed most experiments and analyzed data. P.H. and V.J. performed some experiments. E.T. and M-O.F conceptualized the *Drosophila* experiments and managed the fly facility. I.A. provided the bacterial models. P.H. conceptualized the project and wrote the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Supplementary information

Supplementary methods, figures and tables, and additional references, are provided as supplementary information.

Supplementary Information

The bacterial toxin ExoU requires a host trafficking chaperone for transportation and to induce necrosis

Vincent Deruelle¹, Stéphanie Bouillot¹, Viviana Job¹, Emmanuel Taillebourg², Marie-Odile
Fauvarque², Ina Attrée¹ and Philippe Huber^{1*}

*Corresponding author: phuber@cea.fr

Supplementary Methods

Bacterial strains and plasmids

The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Supplementary Table 1. Bacterial strains were grown in Luria-Bertani (LB) medium at 37°C with vigorous shaking (300 rpm). When mentioned, antibiotics were added at the following concentrations: 100 µg.mL⁻¹ ampicillin and 300 µg.mL⁻¹ carbenicillin. For infection assays, overnight cultures were diluted to optical density (OD₆₀₀) of 0.1 and grown under agitation to reach OD₆₀₀ of 1.

For construction of PP34Δ*exoU*, the internal nucleotide sequence of *exoU* from PP34 isolate⁶¹ was amplified by PCR and cloned into pEX100T⁶². The gentamycin cassette was extracted from pUC-Gm and inserted into the unique *EcoRI* site of *exoU*. Then, the *exoU*-Gm fragment was introduced into the genome of *P. aeruginosa* PP34 by allelic exchange following standard triparental mating and *sacB* selection technique. The mutant was verified by PCR using primers ExoU-Gm_Fw and ExoU-Gm_Rev (Supplementary Table 2) and resequencing.

For *exoU*-*bla* fusion, the DNA fragment encompassing the *exoU* promoter and coding sequence was amplified by primers ExoU-BamHI and ExoU-XbaI (Supplementary Table 2) using pIA*exoU*^{S142A}*spcU* as template⁴³. The PCR fragment was then transferred into *Bam*HI- and *Xba*I-digested pIA*exoS*-*bla* plasmids, where *exoS* was excised. The expression and secretion of ExoU-Bla was verified by immuno-blotting using anti-ExoU antibodies. The plasmids were introduced into PP34Δ*exoU* by transformation⁶³.

Purification of His6-ExoU

The *exoU* gene amplified from the PP34 isolate (GESPA collection⁶¹) was cloned in pET15b. The obtained plasmid pET15b-*exoU* was introduced into *E. coli* BL21 (DE3) Star (Invitrogen). The induction was obtained by adding IPTG at 1mM concentration during 3 h. The bacterial pellet, resuspended in 25 mM Tris-HCl, pH8, 500 mM NaCl and 10 mM imidazole, was disrupted using a Microfluidizer. Purification of His₆-ExoU was performed on AKTA purifier using a HiTrap HP 5-ml column (GE HealthCare) with a step gradient of imidazole. Fractions, eluted with 200 mM imidazole and containing the ExoU protein, were loaded onto HiLoad SD200 16/60 prep column for a second step of purification.

Antibodies and reagents

The rabbit polyclonal antibody targeting human CSPα (DNAJC5) was purchased from ThermoFisher (#PA1-776). The mouse polyclonal antibodies against β-actin (#A1978), β-tubulin (#T0198) and FLAG (#F1804) were purchased from Sigma-Aldrich. Specific antisera for ExoU were obtained in rabbits with 50 µg of purified full length recombinant ExoU. The specific antibodies were affinity-purified on His₆-ExoU. The mouse monoclonal antibody targeting CSP in *Drosophila melanogaster* (named DCSP-1) was purchased from DSHB (#ab49). DCSP-1 (ab49) was deposited to the DSHB by Buchner, E. / Hofbauer, A. The monoclonal mouse Hsc70 (HSPA8) and Hsp70 (HSPA1A) antibodies were purchased from R&D Systems (#MAB4148 and #MAB1663-SP, respectively). The anti-Lamp2 antibody was from BD Transduction Laboratories (#555803). Neomycin (#10131-035), Syto24 (#S7572) and propidium iodide (PI)(#P3566) were purchased from GIBCO, ThermoFisher and Invitrogen, respectively. The CellTracker Red CMTPX (#C34552) and CCF2-AM (K1032) were from ThermoFisher. Quercetin (#Q4951) and probenecid (#P8761) were from Sigma-Aldrich. siRNAs against Hsp70 (HSPA1, #s6968) and Hsc70 (HSPA8, #s6985) were purchased from

ThermoFisher. The Complete inhibitor cocktail was from Roche (#04693159001) and the Micro-BCA Protein Assay Kit from ThermoFisher (#23235). The Lipofectamine RNAiMax kit was from Invitrogen (#13778-075).

Eukaryotic cell lines and growth conditions

The human embryonic kidney (HEK) 293T and A549 cells and their derivatives were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS). Cells were grown at 37°C with 5% CO₂ and routinely passaged when reaching 70 to 80% confluence. Transfected cells with pLVX-*IRES-neo* vector, containing the wild-type or mutated *DNAJC5-FLAG* gene, were maintained by addition of 200 µg.mL⁻¹ neomycin to the supplemented medium.

Knockout of *DNAJC5* gene

A pair of oligonucleotides corresponding to the enriched gRNA targeting *DNAJC5* gene (Supplementary Table 4) were annealed and cloned into the *BsmBI*-digested pLentiCRISPRv2 vector. Then, as previously described for TKOv3 library, lentiviral particles containing the recombinant plasmid pLentiCRISPRv2-gRNA-*DNAJC5* were created using the HEK293T cells and the psPAX2 and pMD2.G plasmids. Lentiviruses containing the pLentiCRISPRv2 vector without gRNA were also produced and referred to as empty vector (EV). A549 cells were then infected with these lentiviruses using 2 mL of lentiviral particles per 10-cm dish with cells at 50% confluence. Transfected cells were selected with 2 µg.mL⁻¹ puromycin for 48 h and clones were isolated by limiting dilution. Clones were selected for their absence of *DNAJC5* expression by Western blot and immunofluorescence. One clone was selected for further experiments.

Complementation of deficient cells with *DNAJC5-FLAG* gene and its derivatives *DNAJC5*^{H43Q} and *DNAJC5*^{S10A-S34A}

The *DNAJC5* wild-type gene was synthesized by the Genewiz company and cloned into pUC57 plasmid. Some modifications have been introduced, without changing the amino acid sequence, to prevent the Cas9 endonuclease from cleaving the gene when inserted into the genome of deficient cells. Moreover, the 3X-FLAG tag was designed upstream of the gene and *EcoRI* and *BamHI* restriction sites were added upstream and downstream of the *DNAJC5-FLAG* gene respectively (Supplementary Table 5). The gene was inserted into pLVX-IRES-neo vector in *BamHI* and *EcoRI* sites. Lentiviral particles containing the empty vector pLVX or the pLVX-*DNAJC5-FLAG* plasmid were produced as previously described. Thereafter, 2.6x10⁶ *DNAJC5*^{-/-} cells were seeded per 10-cm dish the day before and were infected with 2 mL of lentivirus for 24 h. Then, media were replaced and transfected cells were cultured in DMEM containing 10% FBS and supplemented with 800 µg.mL⁻¹ neomycin for at least 8 days before decreasing the antibiotic concentration to 200 µg.mL⁻¹. In the same way, H43Q and S10A-S34A mutations on *DNAJC5-FLAG* gene were introduced by synthesizing the mutated genes (Supplementary Table 5) and by infecting the deficient cells with lentiviral particles containing the mutated genes cloned into the pLVX vector. In each case, clones were isolated by limiting dilution and tested for *DNAJC5* expression by Western blot and immunofluorescence.

Site-directed mutagenesis of *DNAJC5*

The QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, #200523) was used to perform mutations on *DNAJC5-FLAG* gene. Briefly, oligonucleotide primers containing the desired

mutations flanked by unmodified nucleotide sequence were synthesized as recommended by the manufacturer guidelines (Supplementary Table 6). For mutagenesis, 125 ng of each of the two complementary oligonucleotides were used in a reaction volume of 50 μL containing 30 ng of pUC57-*DNAJC5*-FLAG plasmid, 1 μL of dNTP mix and 5 μL of 10X reaction buffer. Then 1 μL of *PfuTurbo* DNA polymerase at 2.5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ was added and the mixture was PCR amplified using the following cycling parameters: 95°C for 30 s followed by 25 cycles at 95°C for 30 s, 55°C for 1 min and 68°C for 3 min, and a final elongation step at 68°C for 5 min. Thereafter, the nonmutated plasmid was digested by adding 1 μL of DpnI at 10 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ directly to amplification reaction followed by an incubation at 37°C for 1 h. The remaining plasmid containing the desired mutation was transformed into Quick Change XL1-Blue Supercompetent cells. Mutants were checked by DNA sequencing. Then, as previously described, the mutated *DNAJC5* gene was digested and cloned into the pLVX-IRES-neo vector and deficient cells were complemented with the mutated gene. Clones were isolated by limiting dilution and selected as above.

Phospholipase activity assay of ExoU

The phospholipase activity of ExoU was performed, as reported previously¹³, using the Cayman Chemical cPLA₂ kit (#765021). Briefly, 5 μL of purified 6His-ExoU protein at 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (65 pmols) were used per well of a 96-well plate containing 5 μL of Assay Buffer and 5 μL of cytosolic or membrane fractions (normalized by A₂₈₀) from *DNAJC5*^{-/-} cells and *DNAJC5*^{-/-}::*DNAJC5* cells. Then, reactions were initiated by adding 200 μL of substrate solution containing 1.5 mM arachidonyl thiophosphatidylcholine and by shaking the plate for 30 s followed by an incubation for 1 h at room temperature. Absorbance was monitored at 24 h at 405 nm with an automated plate reader (Spark 10M by TECAN) after addition of 10 μL of a solution containing 25 mM 5,5-dithiobis (2-dinitrobenzoic acid) (DTNB). The PLA₂ activity of ExoU was also monitored in wells without extracts called “Blank wells”. Experiments were performed in triplicate. The PLA₂ activity of ExoU was calculated with the following formula where 10 is the extinction coefficient for DTNB.

$$\text{Substrate hydrolysis} = \frac{[\text{Mean of Abs (sample)} - \text{Mean of Abs (blank)}]}{10 \times 65 \cdot 10^{-3} (\text{nmol of ExoU})}$$

ExoU injection assay

A549 or *DNAJC5*^{-/-} cells were seeded in 96-well plates 2 days before infection at 1.5×10^4 cells per well. Cells were infected at MOI of 10 for 4 h with the PP34 Δ *exoU* strain producing ExoU^{S142A}-Bla toxin, as reported previously³⁶. Then, cells were washed with PBS containing 2.5 mM probenecid, and incubated with freshly prepared CCF2-AM solution (2 μM) for 90 min in the dark at room temperature. The CCF2-AM cleavage by ExoU^{S142A}-Bla translocation was measured by comparing the emitted fluorescence at 447 nm (green, uncleaved) and 530 nm (blue, cleaved) upon excitation at 405 nm.

DNAJC5 sequence analysis in *DNAJC5*^{-/-} cells

Genomic DNA was isolated from A549 and *DNAJC5*^{-/-} cells (10^7 cells) using the QIAamp DNA Blood Maxi kit (Qiagen, #51194) and by following manufacturer’s protocol. To amplify the *DNAJC5* gene, PCR reactions were carried out with 2.5 μg of gDNA in GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix (Promega, #M7423) containing 0.5 μM of primers *DNAJC5*-Fw and *DNAJC5*-Rev (see Supplementary Table 2). PCR conditions were: 2 min at 95°C, followed by 30 s at 95°C, 30 s at 56°C and 1 min at 72°C (26x), and 5 min at 72°C. The PCR products were Sanger-sequenced.

Western blot analysis

Cells were washed twice with cold PBS and lysed with lysis buffer containing 1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, Roche protease inhibitor cocktail as well as vanadate (1 mM) and okadaic acid (50 nM). The lysates were centrifuged at 18,400 g for 10 min at 4°C and protein concentration in the supernatant was measured with the Micro-BCA Protein Assay Kit. Supernatants were then denatured using Laemmli buffer containing β -mercaptoethanol at 95°C for 5 min. For gel electrophoresis, proteins were run using 10% or 4-12% polyacrylamide gels (BioRad, #3450123). Proteins were then transferred onto a PVDF membrane, using the BioRad semi-dry transfer apparatus, and incubated for 1 h with 5% non-fat dairy milk followed by overnight incubation at 4°C with primary antibodies. Membranes were then probed with secondary HRP-antibodies for 90 min at room temperature. After washings, signals were detected using the Immobilon Western blot Substrate and the ChemiDoc MP Imaging System.

siRNA transfection

A549 cells were seeded at 1.5×10^5 cells per well in a 6-well plate (for cell lysate preparation) or at 1.5×10^4 cells per well in a 96-well plate (for cytotoxicity assay) 24 h prior to transfection. Transfection was carried out with the 3 pmols siRNAs per well of 96-well plate or 30 pmols per well of 6-well plates, using the Lipofectamine RNAiMax kit according to the manufacturer's protocol. After 24 h of incubation, the media were replaced by DMEM containing 10% FBS. Experiments were performed at 48 h post-transfection.

Quercetin assays

For infection assays, A549 cells were seeded as previously described in 96-well plate, 48 h before. Quercetin was freshly prepared at 100 mM in DMSO. The day of infection, Syto24 was added to the medium at 0.5 μ M 2 h before infection, the medium was removed and replaced by DMEM supplemented with PI and quercetin at the indicated concentrations. Cells were then infected with bacteria at OD 1 and at MOI 10. The kinetics of PI incorporation was followed as previously described using an automatized microscope IncuCyte.

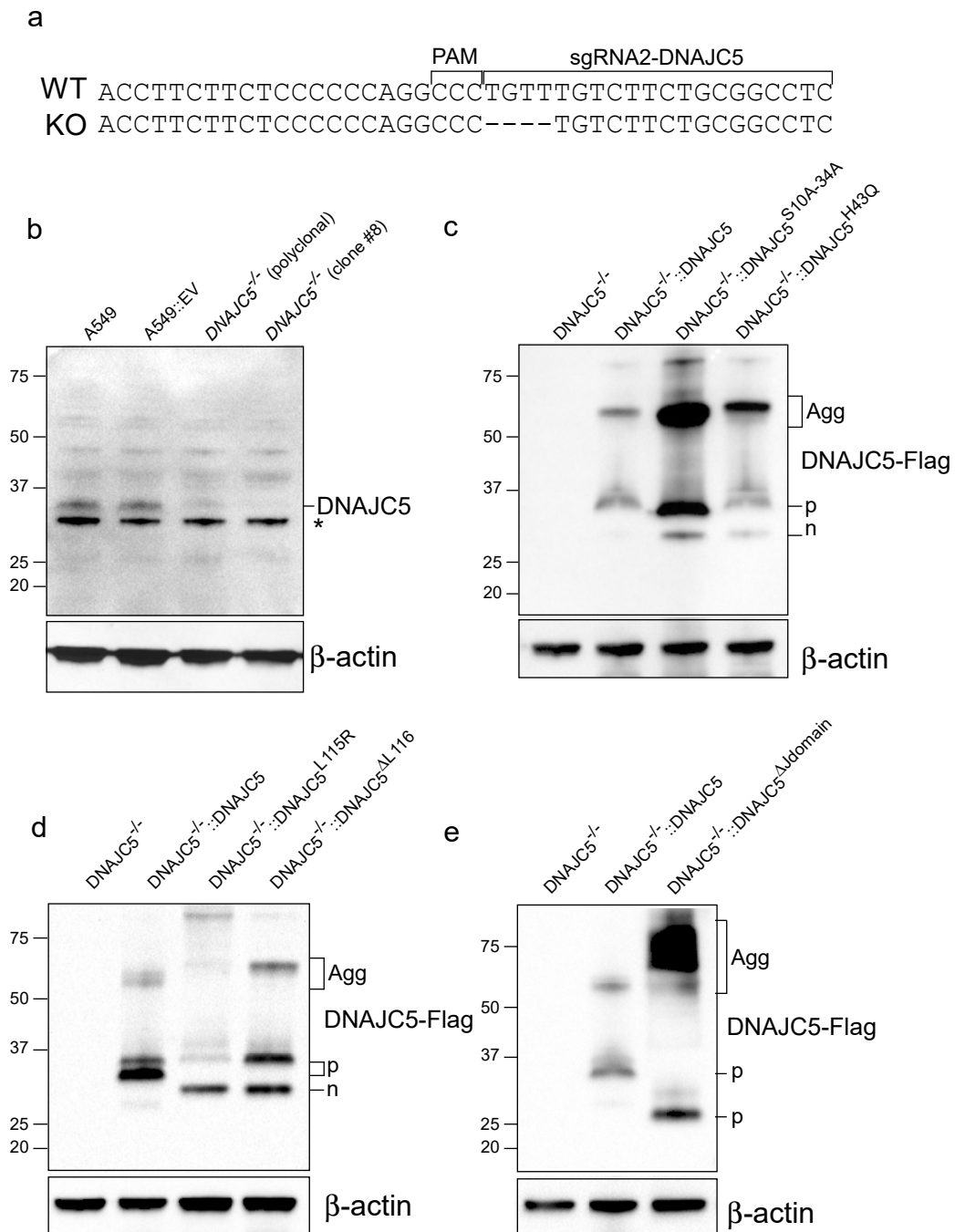
Cellular fractionation

Cellular fractionation was performed as previously described²⁹, with some modifications. Briefly, infected or uninfected cells ($2 \cdot 10^7$) were washed with ice-cold PBS and scraped in 800 μ L of buffer A (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM KCl, 2 mM MgCl, 1 mM DTT, with protease inhibitor cocktail). The cellular suspension was supplemented to 250 mM sucrose to prevent subcellular organelle damage. Cells were fragmented by passing 20 times through a ball bearing homogenizer (8.020-mm bore, EMBL, Heidelberg, Germany) with an 8.006-mm ball bearing. The cellular homogenate was centrifuged at $1,000 \times g$ for 10 min to remove nuclei and unbroken cells. The supernatant was then ultracentrifuged at $100,000 \times g$ for 30 min to sediment total microsome membranes. The pellet was resuspended in buffer A with sucrose, and was conserved at -20°C, as well as the soluble fraction. Samples were normalized with OD₂₈₀.

Expression of DNAJC5-EGFP in HUVECs

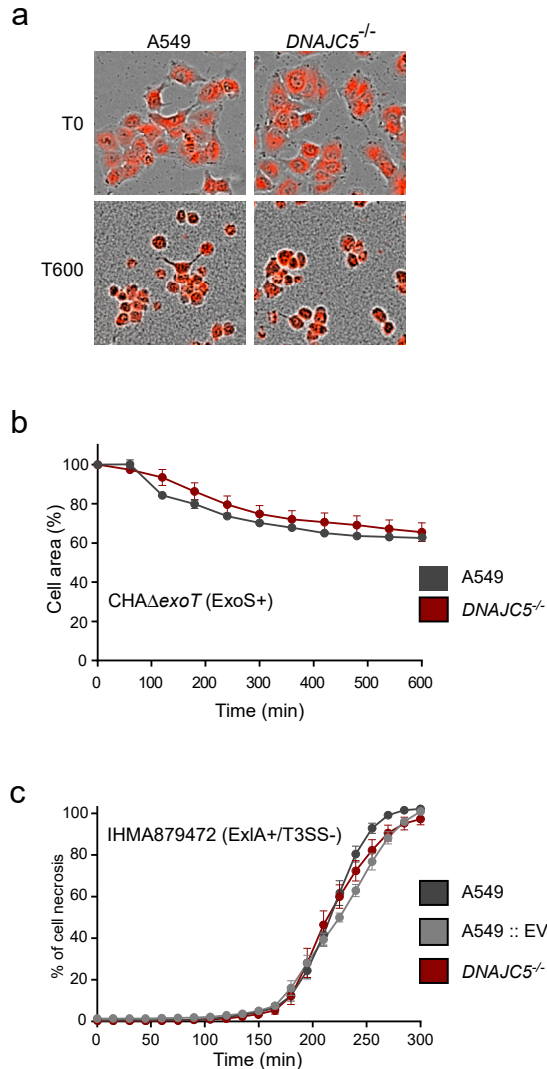
Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated according to previously described protocols⁶⁴. Cells were cultured in endothelial-basal medium 2 (EBM-2; Lonza)

supplemented as recommended by the manufacturer. HUVECs were transfected using nucleofection (Amaxa, Lonza) according to the manufacturer's protocol. Briefly, the day before transfection, cells were seeded at a density of 30,000 cells/cm² in EBM-2 medium supplemented with EGM-2 SingleQuots. Cells (2×10^6) were pelleted by centrifugation (6 min at 1,000 rpm) prior to being resuspended in 100 μ L of Nucleofector[®] solution, mixed with 2.5 μ g DNAJC5-EGFP plasmid⁵¹. The cells were nucleofected by using the program A-034. DNAJC5-EGFP-transfected cells were used at 24 h post-transfection.



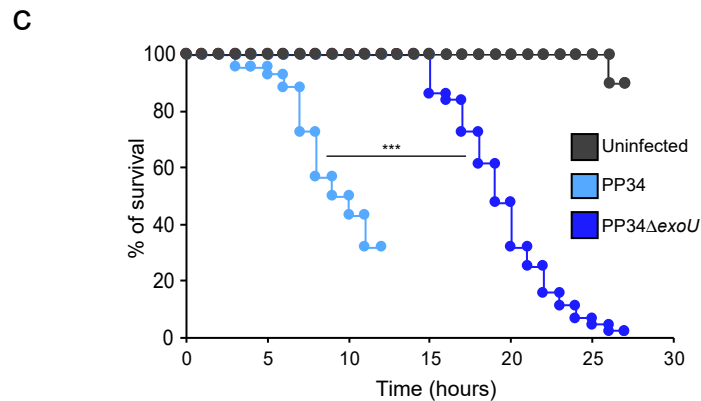
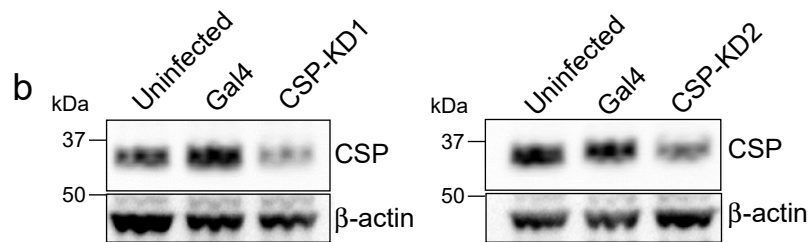
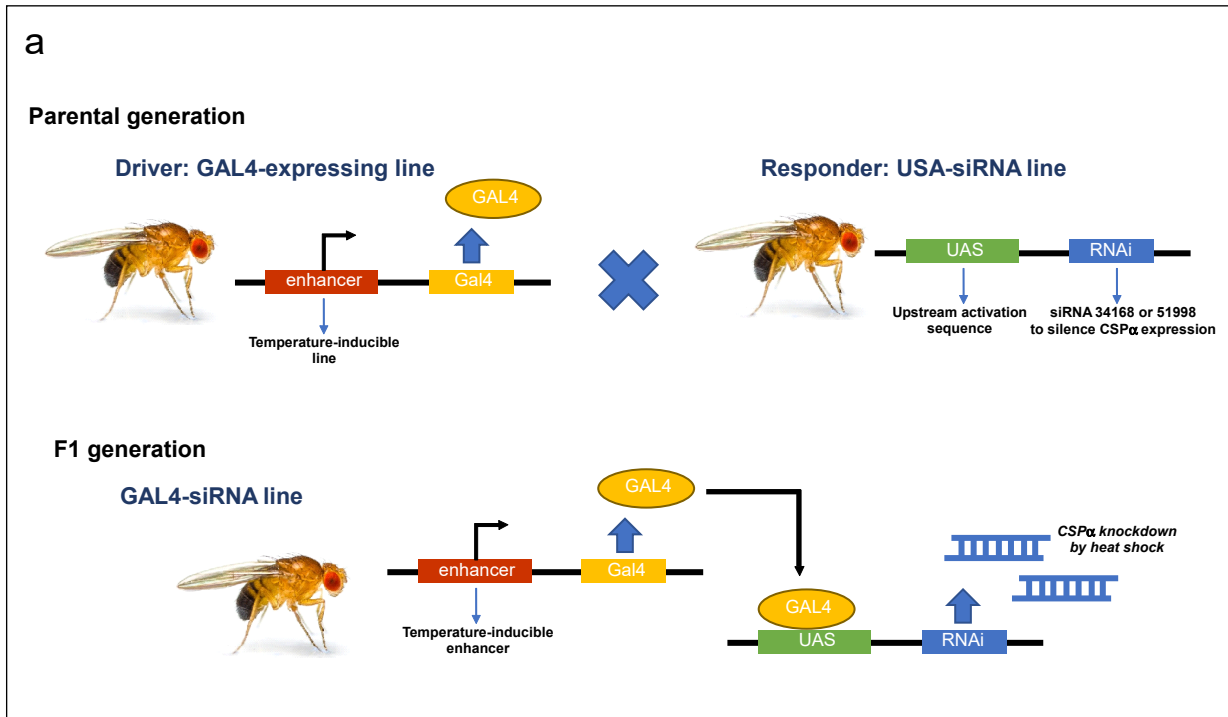
Supplementary Fig. 1. Sequence of DNAJC5- gene clone #8 and expression of wild-type and mutant DNAJC5.

a. Part of the native DNAJC5 sequence (WT), aligned with the mutated sequence present in the selected DNAJC5^{-/-} cells clone #8. The four missing nucleotides are indicated. The same deletion was present on both alleles. The PAM sequence and the sequence of the gRNA used for inactivation are shown. **b.** Western blot with cellular extracts from A549, A549::EV and DNAJC5^{-/-} (polyclonal population and clone#8) cells, revealed with DNAJC5 antibodies. β -actin was used as loading control. **c.** Western blot showing DNAJC5-FLAG expression in DNAJC5^{-/-}::DNAJC5, DNAJC5^{-/-}::DNAJC5^{H43Q} and DNAJC5^{-/-}::DNAJC5^{S10A-S34A} cells, revealed with the FLAG antibodies. **d.** Western blot showing DNAJC5-FLAG expression in DNAJC5^{-/-}::DNAJC5, DNAJC5^{-/-}::DNAJC5^{L115R} and DNAJC5^{-/-}::DNAJC5^{AL116} cells, revealed with the FLAG antibodies. **e.** Western blot showing DNAJC5-FLAG expression in DNAJC5^{-/-}::DNAJC5, DNAJC5^{-/-}::DNAJC5 ^{Δ domain} cells, revealed with FLAG antibodies. Abbreviations: (n) native and (p) palmitoylated forms of DNAJC5; Agg: aggregates. (*) represents a non-specific band only visible in highly exposed images.



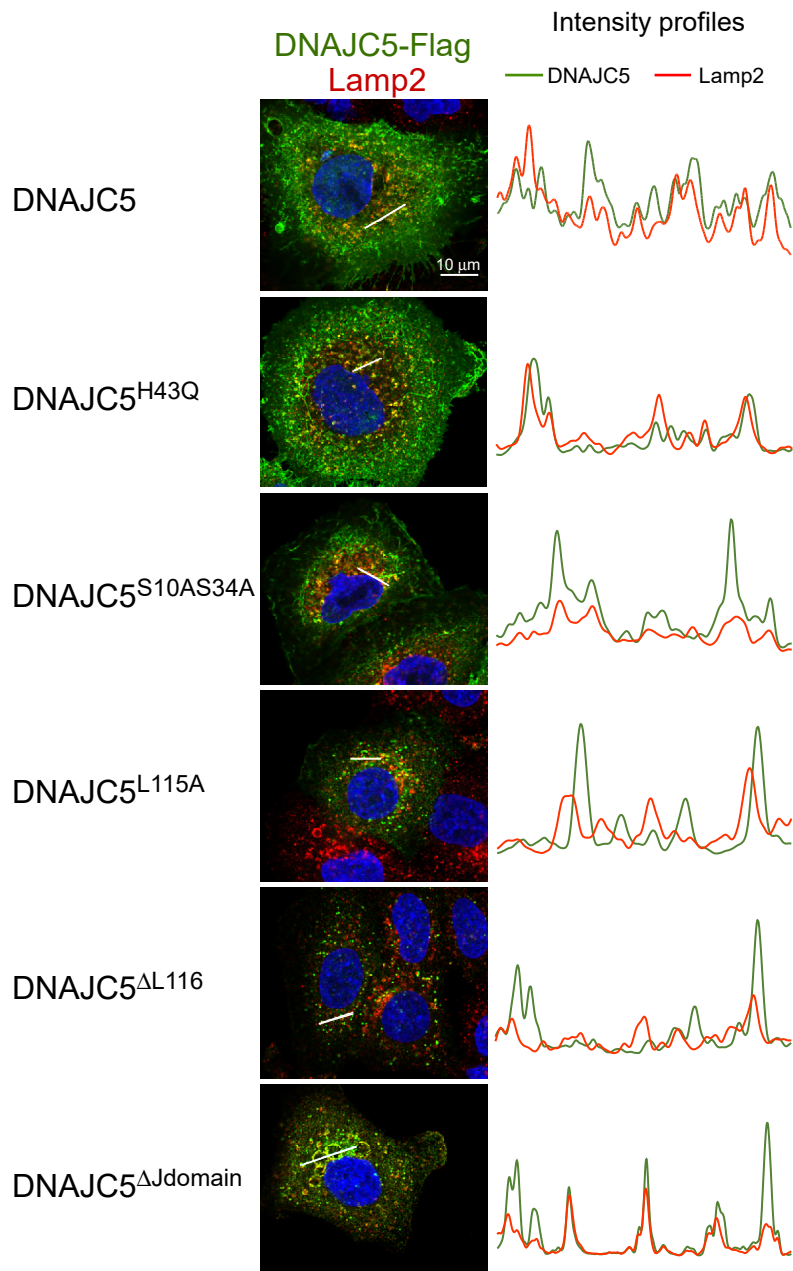
Supplementary Fig. 2. DNAJC5 is not required for ExoS or ExIA toxicity.

a. Intoxication with ExoS. A549 cells or DNAJC5^{-/-} cells loaded with CellTracker Red CMTPIX were infected with the CHAΔexoT strain expressing ExoS. Intoxication was followed by time-lapse microscopy (n = 6). Images show merged acquisitions of phase contrast and CellTracker fluorescence at the beginning (T0) and at 10 hpi (T600). Both cell types displayed ExoS-dependent cell rounding. **b.** Quantification of ExoS-induced cell rounding using ImageJ software. **c.** A549, A549 ::EV and DNAJC5^{-/-} cells were infected with the ExIA+ IHMA879472 strain, and cell necrosis was monitored based on PI incorporation (n = 6). EV, empty vector.



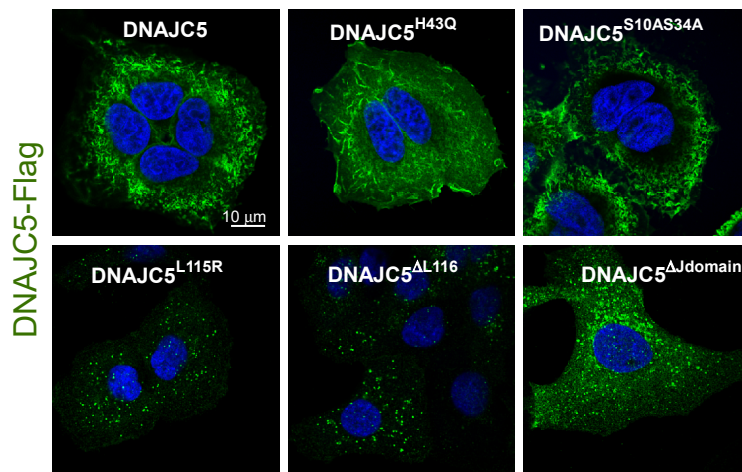
Supplementary Fig. 3. Production of Csp knockdown in Drosophila and intoxication assay.

a. Mating scheme to generate *Csp*-KD flies. **b.** Western blots showing CSP levels in flies using two different RNAi transgenes (*Csp*-KD1 and *Csp*-KD2). β -actin was used as loading control. **c.** Post-infection survival assay. Flies were infected by pricking the thorax with a needle dipped in suspensions of either PP34 (ExoU+; $n = 50$) or PP34 Δ exoU ($n = 50$) strains. Data for mock-infected flies, pricked with PBS (uninfected; $n = 10$), are also shown. Statistical differences were determined using the Log-Rank test. ***: $p < 0.001$.

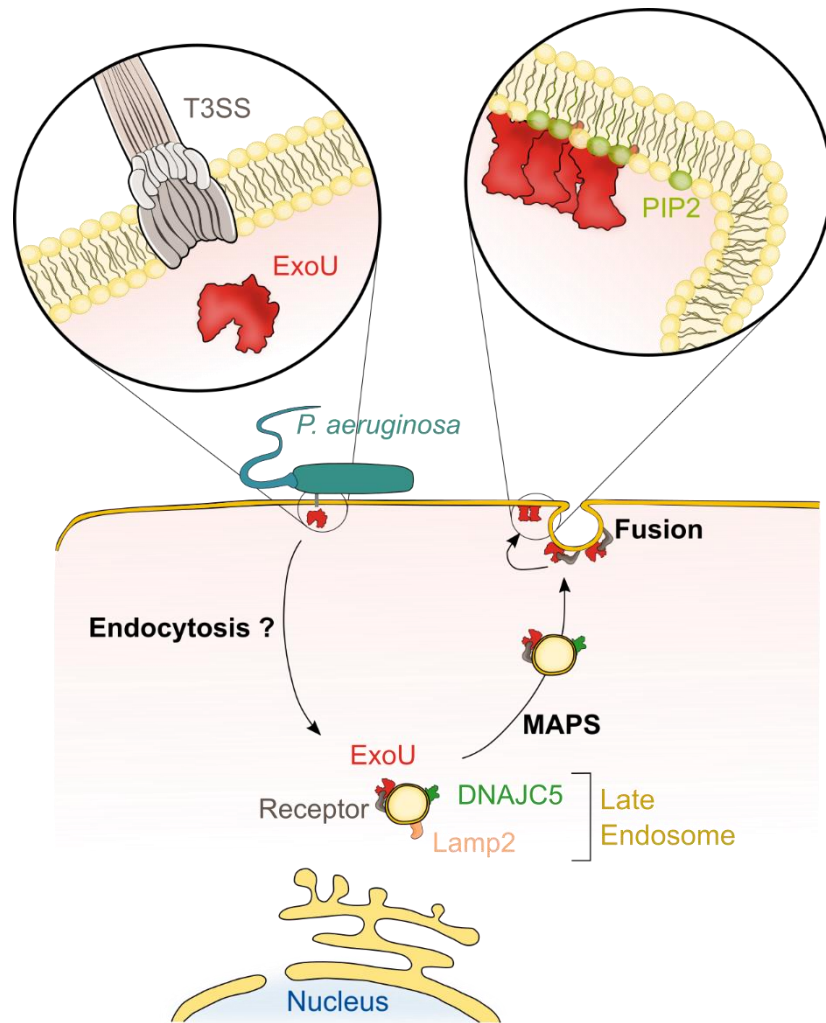


Supplementary Fig. 4. Partial colocalization of DNAJC5 (wild type or mutants) with Lamp2.

Immunostaining to reveal colocalization of DNAJC5 (green) and Lamp2 (red) in DNAJC5^{-/-} cells complemented with DNAJC5-FLAG or a mutated form of DNAJC5, as indicated. Bars indicate where the intensity profiles for both labels were measured. Intensity profiles are shown on the right.



Supplementary Fig. 5. Expression and localization of DNAJC5 mutants. DNAJC5 and derivatives, fused to a FLAG tag, were expressed in DNAJC5^{-/-} cells. Cells were fixed and labelled with an anti-FLAG antibody. One z-section image is shown for each cell line.



Supplementary Fig. 6: Model of ExoU trafficking in host cells. Upon delivery into the host cytoplasm by the T3SS, the toxin uses an endocytic pathway to reach the perinuclear region, as suggested by ExoU/EEA1 colabeling. Then, ExoU binds to the late endosome's limiting membrane (decorated by Lamp2 and DNAJC5), thanks to the interaction of ExoU with an as yet unidentified specific receptor at the vesicle's surface. ExoU remains at the external side of the vesicle's membrane and coopts the DNAJC5-dependent MAPS pathway to achieve anterograde transport toward the cellular periphery (where vesicles lose Lamp2), and eventually the plasma membrane (PM). Fusion of vesicles with the PM brings ExoU close to PM's inner leaflet, where its membrane localization domain binds to PI(4,5)P2. PI(4,5)P2 binding triggers conformational changes in ExoU, leading to toxin oligomerization and activation of its phospholipase activity, which eventually induces PM rupture.

Supplementary Table 1: Strains and plasmids

Names	Relevant characteristics	Reference/Source
<i>E. coli</i> strains		
One Shot™ TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>araI</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, C404003
NEB® 5-alpha Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)	<i>fhuA2</i> Δ(<i>argF-lacZ</i>)U169 <i>phoA glnV44</i> Φ80 Δ(<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	NEB, C2987H
Lucigen Endura electrocompetent cells	<i>recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(StrR) xyl-5 λ- leu mtl-1 F- mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-)</i>	Biosearch Technologies, 60242
Quick Change XL1-Blue Supercompetent cells	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10]</i>	Agilent, 200519-4
Stbl3™ Chemically Competent <i>E. coli</i>	F- <i>mcrB mrrhsdS20(rB-, mB-)</i> <i>recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(StrR) xyl-5 λ-leu mtl-1</i>	Invitrogen, C737303
<i>P. aeruginosa</i> strains		
PA14	Contains <i>exoU</i>	2
PP34	Contains <i>exoU</i>	3
IHMA879472	T3SS ⁻ and contains ExlB-ExlA two-partner system	4
PP34Δ <i>exoU</i>	ExoU ⁻	This study
PP34Δ <i>exoU::exoU-bla</i>	PP34Δ <i>exoU</i> strain expressing ExoU ^{S142A} -Bla toxin	This study
CHAΔ <i>exoSexoT</i>	ExoS ⁻ and ExoT ⁻	5
CHAΔ <i>exoSexoT::exoU^{S142A}</i> ^{2A} (CHA- <i>exoU^{S142A}</i>)	ExoS ⁻ and ExoT ⁻ and ExoU ⁺ catalytically inactivated; Cb ^R	6
CHAΔ <i>exoT</i>	ExoS ⁻ and ExoT ⁻ and ExoS ⁺	5
Bacterial vectors		
pIA <i>exoS-bla</i>	Contains <i>exoS</i> gene downstream of the β-lactamase gene ; Cb ^R	7
pIA <i>exoU^{S142A}-bla</i>	pIA <i>exoS-bla</i> plasmid where <i>exoS</i> gene is excised and replaced by <i>exoU^{S142A}</i> ; Cb ^R	This study
pUCPE <i>exoU^{S142A}spcU</i>	Contains <i>exoU</i> gene which is catalytically inactivated and <i>spcU</i> gene ; Cb ^R	6

pUC57- <i>DNAJC5</i> -FLAG	Contains <i>DNAJC5</i> gene with N-terminal FLAG-tag; Amp ^R	This study
pUC57- <i>DNAJC5</i> ^{S10A-S34A} -FLAG	Contains FLAG-tagged <i>DNAJC5</i> gene mutated on phosphorylation sites ; Amp ^R	This study
pUC57- <i>DNAJC5</i> ^{H43Q} -FLAG	Contains FLAG-tagged <i>DNAJC5</i> gene mutated on the Hsc70/Hsp70 binding site; Amp ^R	This study
pUC57- <i>DNAJC5</i> ^{L115R} -FLAG	Contains FLAG-tagged <i>DNAJC5</i> gene with L115R mutation in the cysteine-string domain ; Amp ^R	This study
pUC57- <i>DNAJC5</i> ^{ΔL116} -FLAG	Contains FLAG-tagged <i>DNAJC5</i> gene with the deletion of L116 in the cysteine-string domain ; Amp ^R	This study
pUC57- <i>DNAJC5</i> ^{ΔJdomain} -FLAG	Contains FLAG-tagged <i>DNAJC5</i> gene with the deletion of the J-domain ; Amp ^R	This study

Mammalian vectors

psPAX2	Lentiviral packaging plasmid	Addgene, 12260
pMD2.G	VSV-G envelope expressing plasmid	Addgene, 12259
pLentiCRISPRv2	Lentiviral vector containing <i>Cas9</i> nuclease gene, Puro ^R	
pLVX- <i>IRES-neo</i>	Lentiviral vector for bicistronic expression of a gene together with a neomycin-resistance marker	Clontech, 632181
pLentiCRISPRv2-gRNA- <i>DNAJC5</i>	pLentiCRISPRv2 with the gRNA targeting <i>DNAJC5</i> gene; Puro ^r	This study
pLVX- <i>DNAJC5</i> -FLAG	pLVX- <i>IRES-neo</i> vector which contains FLAG-tagged <i>DNAJC5</i> gene; Neo ^R	This study
pLVX- <i>DNAJC5</i> ^{S10A-S34A} -FLAG	pLVX- <i>IRES-neo</i> vector which contains FLAG-tagged <i>DNAJC5</i> gene mutated on phosphorylation sites; Neo ^R	This study
pLVX- <i>DNAJC5</i> ^{H43Q} -FLAG	pLVX- <i>IRES-neo</i> vector which contains FLAG-tagged <i>DNAJC5</i> gene mutated on Hsc70/Hsp70 binding site; Neo ^R	This study
pLVX- <i>DNAJC5</i> ^{L115R} -FLAG	pLVX- <i>IRES-neo</i> vector which contains FLAG-tagged <i>DNAJC5</i> gene with L115R mutation in the cysteine-string domain; Neo ^R	This study
pLVX- <i>DNAJC5</i> ^{ΔL116} -FLAG	pLVX- <i>IRES-neo</i> vector which contains FLAG-tagged <i>DNAJC5</i> gene with the deletion of L116 in the cysteine-string domain; Neo ^R	This study

pLVX-DNAJC5 ^{ΔJdomain} -FLAG	pLVX-IRES-neo vector which contains FLAG-tagged DNAJC5 gene with the deletion of the J-domain; Neo ^R	This study
DNAJC5-GFP	Mammalian expression plasmid for DNAJC5 with N-terminal GFP tag	8

Supplementary Table 2: Oligonucleotides for PCR amplification

Names	Primers (5' → 3')
ExoU-Gm_Fw	GTCCGGCTCCGGAGTCAC
ExoU-Gm_Rev	GCTGCAGCATTTCGCGCG
ExoU-BamHI	CCGGATCCCAAGGCGCTTGATCAGTGG
ExoU-XbaI	GGTCTAGATGTGAACTCCTTATTCCGCCAAG
DNAJC5-Fw	GGAGTGCTGGGATGACAGG
DNAJC5-Rev	CAGTCCCTGGGATCTACGG

Supplementary Table 3: List of primers used to amplify and sequence the gRNA-containing cassettes of each sample after the ExoU screen

Names	Primers (5' → 3')*
Uninfected_Fw	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATAGAGGCACACTCTTTCCC TACACGACGCTCTTCCGATCTTTGTGGAAAGGACGAAACACCG
Uninfected_Rev	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTCCGGAGTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTTCCGATCTACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC
ExoU-infected-1_Fw	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTTCCGATCTTTGTGGAAAGGACGAAACACCG
ExoU-infected-1_Rev	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTCTGAATGTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTTCCGATCTACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC
ExoU-infected-2_Fw	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTTCCGATCTTTGTGGAAAGGACGAAACACCG
ExoU-infected-2_Rev	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACGAATTCGTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTTCCGATCTACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC
ExoU-infected-3_Fw	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTTCCGATCTTTGTGGAAAGGACGAAACACCG
ExoU-infected-3_Rev	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGCTTCAGGTGACTGGAGTTCAGA CGTGTGCTCTTCCGATCTACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC

*Red sequences denote i5 or i7 index. Blue sequences denote annealing sequence on TKOv3 vector

Supplementary Table 4: Oligonucleotides to knock-out the DNAJC5 gene

Names	Primers (5' → 3')*
gRNA-DNAJC5_Fw	CACCG GAGGCCGCAGAAGACAAACA
gRNA-DNAJC5_Rev	AAACT GTTTGTCTTCTGCGCCTCC

* Bold letters represent overhangs for cloning in BsmBI-digested plentiCRISPRv2

Supplementary Table 5: Synthetic DNAJC5-FLAG gene sequence and its derivatives

Names	Sequence (5' → 3')*
-------	---------------------

<i>DNAJC5-FLAG</i>	<p>GAATTCATGGACTACAAAGACCATGACGGCGATTATAAAGATCATGACA TCGATTACAAGGATGACGATGACAAGGCAGACCAGAGACAGCGCTCAC TGTCTACCTCTGGGGAGTCATTGTACCACGTCCTTGGGTTGGACAAGAA CGCAACCTCAGATGACATTA AAAAGTCCTATCGGAAGCTTGCCTTGAAT ATCACCCCGACAAGAACCCCGACAACCCGGAGGCCGCGGACAAGTTTAA GGAGATCAACAACGCGCACGCCATCCTCACGGACGCCACAAAAGGAA CATCTACGACAAGTACGGCTCGCTGGGTCTCTACGTGGCCGAGCAGTTT GGGGAAGAGAACGTGAACACCTACTTCGTGCTGTCCAGCTGGTGGGC AAGGCTCTGTTCTGTTTTGCGGCCTCCTCACGTGCTGCTACTGCTGCTG CTGTCTGTGCTGCTGCTTCAACTGCTGCTGCGGGAAGTGTAAAGCCCAAG GCGCCTGAAGGCGAGGAGACGGAGTTCTACGTGTCCCCGAGGATCTG GAGGCACAGCTGCAGTCTGACGAGAGGGAGGCCACAGACACGCCGATC GTCATACAGCCGGCATCCGCCACCGAGACCACCCAGCTCACAGCCGACT CCCACCCAGCTACCACACTGACGGGTTCAACTAAGGATCC</p>
<i>DNAJC5-FLAG^{S10A-S34A}</i>	<p>GAATTCATGGACTACAAAGACCATGACGGCGATTATAAAGATCATGACA TCGATTACAAGGATGACGATGACAAGGCAGACCAGAGACAGCGCTCAC TGCTACCTCTGGGGAGTCATTGTACCACGTCCTTGGGTTGGACAAGAA CGCAACCTCAGATGACATTA AAAAGCCTATCGGAAGCTTGCCTTGA TATCACCCCGACAAGAACCCCGACAACCCGGAGGCCGCGGACAAGTTA AGGAGATCAACAACGCGCACGCCATCCTCACGGACGCCACAAAAGGA ACATCTACGACAAGTACGGCTCGCTGGGTCTCTACGTGGCCGAGCAGTT TGGGGAAGAGAACGTGAACACCTACTTCGTGCTGTCCAGCTGGTGGGC CAAGGCTCTGTTCTGTTTTGCGGCCTCCTCACGTGCTGCTACTGCTGCT GCTGTCTGTGCTGCTGCTTCAACTGCTGCTGCGGGAAGTGTAAAGCCCA GGCGCCTGAAGGCGAGGAGACGGAGTTCTACGTGTCCCCGAGGATCT GGAGGCACAGCTGCAGTCTGACGAGAGGGAGGCCACAGACACGCCGAT CGTCATACAGCCGGCATCCGCCACCGAGACCACCCAGCTCACAGCCGAC TCCACCCAGCTACCACACTGACGGGTTCAACTAAGGATCC</p>
<i>DNAJC5-FLAG^{H43Q}</i>	<p>GAATTCATGGACTACAAAGACCATGACGGCGATTATAAAGATCATGACA TCGATTACAAGGATGACGATGACAAGGCAGACCAGAGACAGCGCTCAC TGTCTACCTCTGGGGAGTCATTGTACCACGTCCTTGGGTTGGACAAGAA CGCAACCTCAGATGACATTA AAAAGTCCTATCGGAAGCTTGCCTTGA ATCAGCCCGACAAGAACCCCGACAACCCGGAGGCCGCGGACAAGTTA AGGAGATCAACAACGCGCACGCCATCCTCACGGACGCCACAAAAGGA ACATCTACGACAAGTACGGCTCGCTGGGTCTCTACGTGGCCGAGCAGTT TGGGGAAGAGAACGTGAACACCTACTTCGTGCTGTCCAGCTGGTGGGC CAAGGCTCTGTTCTGTTTTGCGGCCTCCTCACGTGCTGCTACTGCTGCT GCTGTCTGTGCTGCTGCTTCAACTGCTGCTGCGGGAAGTGTAAAGCCCA GGCGCCTGAAGGCGAGGAGACGGAGTTCTACGTGTCCCCGAGGATCT GGAGGCACAGCTGCAGTCTGACGAGAGGGAGGCCACAGACACGCCGAT CGTCATACAGCCGGCATCCGCCACCGAGACCACCCAGCTCACAGCCGAC TCCACCCAGCTACCACACTGACGGGTTCAACTAAGGATCC</p>

* Bold letters represent the mutations to prevent the Cas9 endonuclease from cleaving the gene. Red letters represent the S10A, S34A and H43Q mutations. Green letters are *EcoRI* and *BamHI* restriction sites. Yellow letters denote the 3X-FLAG sequence.

Supplementary Table 6: Oligonucleotides for site-directed mutagenesis

Names	Primers (5' → 3')*
DNAJC5_L115R_F	CTGTTTCGTGTTTTGCGGC CCG CCTCACGTGCTGCTACTGC
DNAJC5_L115R_R	GCAGTAGCAGCACGTGAG GCG GCCGCAAAACACGAACAG
DNAJC5_ΔL116_F	CTGTTTCGTGTTTTGCGGCCTCACGTGCTGCTACTGCTGCTGC
DNAJC5_ΔL116_R	GCAGCAGCAGTAGCAGCACGTGAGGCCGCAAAACACGAACAG
DNAJC5_ΔJdomain_ F	CCAGAGACAGCGCTCACTGTCTACCGGTCTCTACGTGGCCGAGCAGTTTG G
DNAJC5_ΔJdomain_ R	CCAAACTGCTCGGCCACGTAGAGACCGGTAGACAGTGAGCGCTGTCTCT GG

* Red letters represent the mutated or inserted nucleotides

References

- 1 Stirling, F. R., Cuzick, A., Kelly, S. M., Oxley, D. & Evans, T. J. Eukaryotic localization, activation and ubiquitinylation of a bacterial type III secreted toxin. *Cell Microbiol* **8**, 1294-1309, doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00710.x (2006).
- 2 Rahme, L. G. *et al.* Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13245-13250, doi:10.1073/pnas.94.24.13245 (1997).
- 3 Berthelot, P. *et al.* Genotypic and phenotypic analysis of type III secretion system in a cohort of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia isolates: evidence for a possible association between O serotypes and exo genes. *The Journal of infectious diseases* **188**, 512-518, doi:10.1086/377000 (2003).
- 4 Kos, V. N. *et al.* The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* **59**, 427-436, doi:10.1128/AAC.03954-14 (2015).
- 5 Quenee, L., Lamotte, D. & Polack, B. Combined sacB-based negative selection and cre-lox antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *pseudomonas aeruginosa*. *BioTechniques* **38**, 63-67, doi:10.2144/05381ST01 (2005).
- 6 Gendrin, C. *et al.* Structural basis of cytotoxicity mediated by the type III secretion toxin ExoU from *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS pathogens* **8**, e1002637, doi:10.1371/journal.ppat.1002637 (2012).
- 7 Verove, J. *et al.* Injection of *Pseudomonas aeruginosa* Exo toxins into host cells can be modulated by host factors at the level of translocon assembly and/or activity. *PLoS One* **7**, e30488, doi:10.1371/journal.pone.0030488 (2012).
- 8 Greaves, J. *et al.* Palmitoylation-induced aggregation of cysteine-string protein mutants that cause neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Biol Chem* **287**, 37330-37339, doi:10.1074/jbc.M112.389098 (2012).

C- Résultats complémentaires

Dans cet article, nous décrivons un nouveau partenaire eucaryote essentiel pour l'activité cytotoxique d'ExoU. Etant donné que DNAJC5 et ExoU sont co-localisées dans les cellules infectées, nous avons recherché si les deux protéines interagissaient physiquement.

1- Interaction entre ExoU et DNAJC5

Pour mettre en évidence une association physique entre les deux protéines, des expériences de biochimie ont été réalisées : co-immunoprécipitation de DNAJC5 et d'ExoU dans les cellules infectées, visualisation par la technique HTRF (« Homogeneous Time Resolved Technology ») et deux méthodes pour mettre en évidence l'interaction des protéines recombinantes purifiées. Enfin, les structures tridimensionnelles d'ExoU et du domaine J de DNAJC5 étant connues, une modélisation de l'interaction a été réalisée et certains acides aminés de DNAJC5, potentiellement impliqués dans l'interaction, ont été mutés pour évaluer leur rôle dans la toxicité d'ExoU.

i- Co-immunoprécipitation entre les deux protéines

Pour ces expériences, un tag différent a été ajouté sur les deux protéines afin de pouvoir réaliser la co-immunoprécipitation dans les deux sens, par l'utilisation d'anticorps anti-tag. Comme décrit dans le Matériels et Méthodes de la publication, le gène *dnajC5* a été synthétisé avec un tag FLAG en N-terminal puis transfecté dans les cellules *DNAJC5*^{-/-}. Pour ExoU (non-montré dans la publication), un tag HA a été ajouté en amont du gène dans le plasmide pUCP-*exoU*^{S142A}-*spcU*, puis les bactéries CHAΔST, ont été transformées avec ce plasmide (**Matériels & Méthodes – Chapitre 1A**). La **Figure 27** révèle que d'une part la protéine ExoU^{S142A}-HA est bien synthétisée par les bactéries et que d'autre part, cette protéine est bien sécrétée par le SST3.

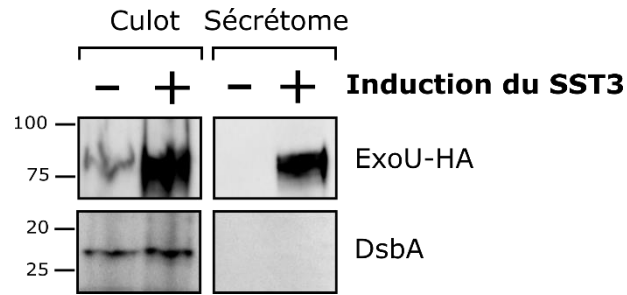


Figure 27 : Sécrétion d'ExoU-HA par le mutant CHAΔST contenant le plasmide pUCP-exoU^{S142A}-HA. DsbA est utilisé comme contrôle négatif car la protéine n'est pas sécrétée par le SST3

Dans les expériences de co-immunoprécipitation, les cellules déficientes ou complémentées avec DNAJC5-FLAG, ont été infectées pendant quatre heures avec la souche sécrétant la toxine ExoU^{S142A}-HA, puis lysées. Les lysats ont été mis en contact avec des billes magnétiques préalablement couplées avec un anticorps anti-FLAG ou anti-HA afin que la protéine correspondante soit immunoprécipitée (**Matériels & Méthodes – Chapitre 1C**). Après les lavages, la protéine a été éluée à l'aide d'un tampon non réducteur, puis les surnageants ont été analysés par western-blot avec les anticorps correspondants (**Figure 28**). Dans les deux cas, l'immunoprécipitation d'ExoU ou de DNAJC5 ne permet pas de co-immunoprécipiter l'autre protéine.

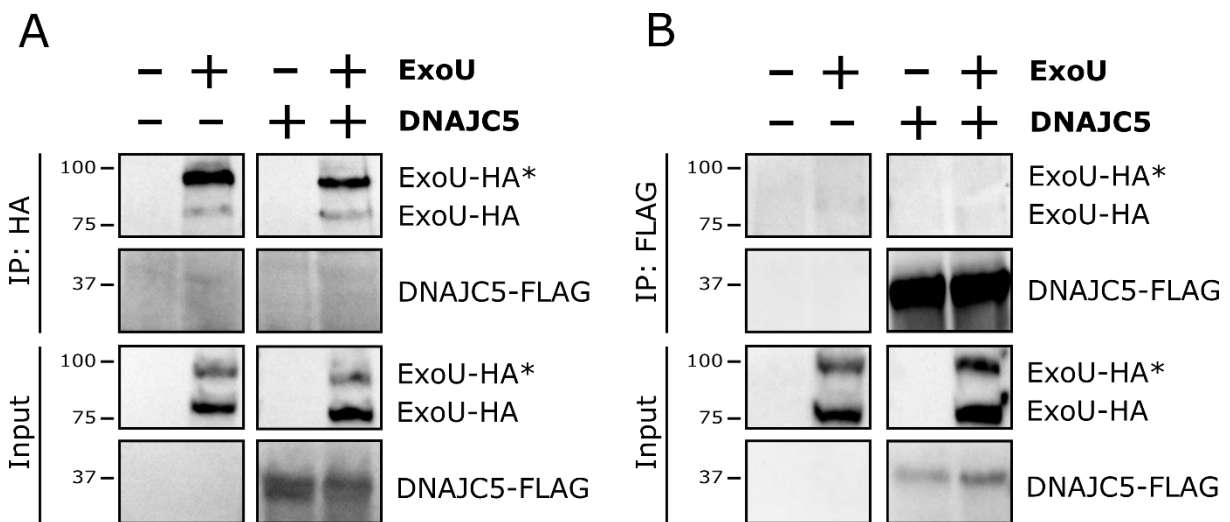


Figure 28 : Co-immunoprécipitation d'ExoU et de DNAJC5. **A.** Immunoprécipitation avec l'anticorps anti-HA des cellules déficientes en DNAJC5 (-) ou complémentées (+). Les cellules sont infectées avec CHAΔST (-) ou la souche CHAΔST :: pUCP-exoU^{S142A}-HA (+) à MOI=15 pendant 4 heures. **B.** Test similaire mais immunoprécipitation avec l'anticorps anti-FLAG. * représente la forme ubiquitinylée d'ExoU

Il est à noter que pour l'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-HA (**Figure 28A**), c'est principalement la forme ubiquitinylée d'ExoU qui est capturée par l'anticorps, alors que cette forme est minoritaire dans les lysats (input). Cela peut s'expliquer par le fait que la liaison à l'ubiquitine favorise une structure de la toxine qui devient alors plus facilement accessible par l'anticorps, contrairement à sa forme native.

Dans l'éventualité où l'interaction entre DNAJC5 et ExoU serait précoce et transitoire, et donc non observable après 4 heures d'infection, de nouvelles expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées avec des temps d'infection plus précoces (**Figure 29**). Cependant, comme précédemment, aucune association physique entre ces deux protéines n'a pu être révélée, après immunoprécipitation avec l'anticorps anti-FLAG, entre 2h et 3h30 post-infection.

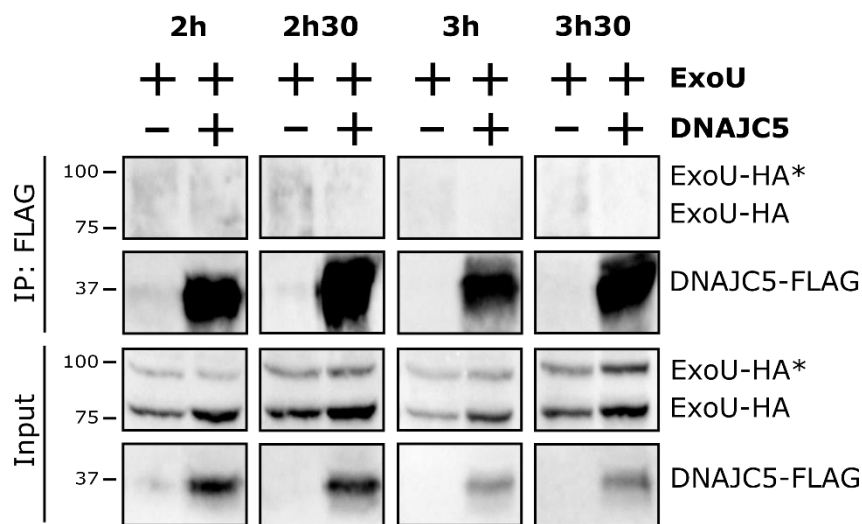


Figure 29 : Co-immunoprécipitation d'ExoU-HA par DNAJC5-FLAG après différents temps d'infection. Les cellules déficientes en DNAJC5 (-) ou complémentées (+) ont été infectées avec la souche CHAΔST :: pUCP-exoU^{S142A}-HA (+) à MOI=15 pendant les temps indiqués. * représente la forme ubiquitinylée d'ExoU

ii- Visualisation par la technique HTRF

Dans ce procédé, des anticorps reconnaissant les deux protéines, sont couplés à des fluorophores distincts. Si les deux protéines interagissent ensemble et sont donc proches, alors l'excitation du fluorophore donneur porté par l'anticorps 1, permet un transfert d'énergie par résonance de fluorescence vers le fluorophore accepteur, porté par l'anticorps 2. A son tour, celui-ci émet une fluorescence à une longueur d'onde spécifique qui peut être mesurée. L'intensité du signal émis est proportionnelle au nombre de complexes formés. Ce procédé est très sensible pour détecter des interactions protéine-protéine. Comme ExoU et DNAJC5 sont

déjà fusionnées avec un tag spécifique, respectivement HA et FLAG, l'HTRF a été réalisée en utilisant des anticorps couplés à un fluorophore, qui reconnaissent ces peptides (**Figure 30A**). Pour cette expérience, les cellules déficientes ou complémentées avec DNAJC5-FLAG ont été infectées par la souche CHAΔST exprimant la toxine ExoU^{S142A}-HA pendant 4 heures puis lysées et analysée par HTRF à l'aide d'un spectrofluorimètre, en collaboration avec Agnès Journet de l'équipe Gene & Chem (**Matériels & Méthodes – Chapitre 1H**). Les résultats sont présentés sur la **Figure 30B**.

Les résultats confirment qu'après 4 heures d'infection, DNAJC5 et ExoU ne sont pas géographiquement proches et n'interagissent donc pas ensemble (**Figure 30**). Il serait néanmoins important d'utiliser des lysats cellulaires provenant de différents temps d'infection, comme pour la **Figure 29**, pour confirmer que même dans des temps d'infection précoces, les deux molécules sont dissociées.

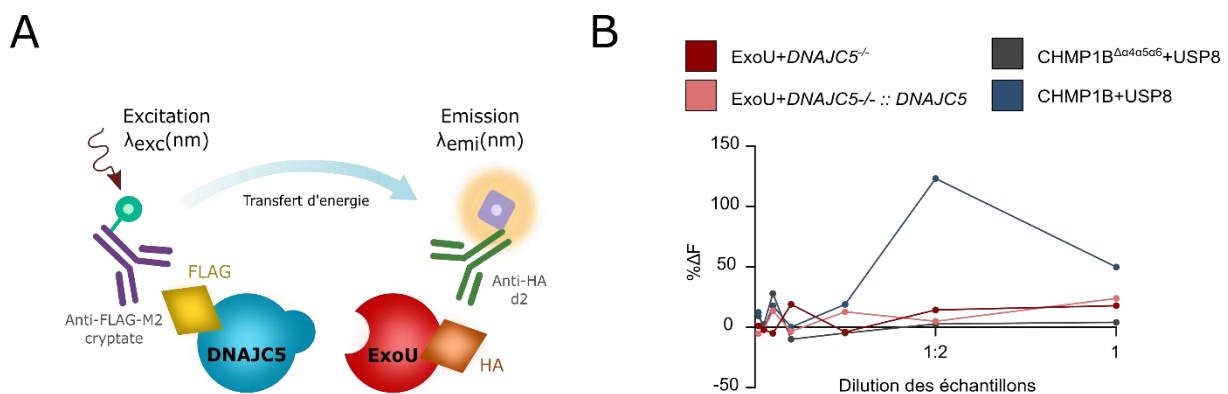


Figure 30 : Détection d'une interaction entre DNAJC5 et ExoU par HTRF. **A**. Illustration schématique du principe du test HTRF avec les protéines d'intérêt. **B**. Résultat du test HTRF. Détection de la fluorescence émise par le fluorophore accepteur (HA-d2) après excitation du fluorophore donneur (FLAG-M2 cryptate), en fonction de la quantité de lysat. ExoU et CHMP1B sont marquées HA tandis que DNAJC5 et USP8 sont marquées FLAG. Les protéines CHMP1B et USP8 servent de contrôles positifs puisque leur interaction a déjà été démontrée.

L'inconvénient de la co-immunoprécipitation et de l'HTRF est qu'ils nécessitent l'utilisation de détergent (Triton X-100) dans le tampon de lyse, afin de solubiliser les protéines membranaires, comme DNAJC5, qui possèdent un domaine hydrophobe. Même si ce réactif n'altère généralement pas la structure des protéines, il est probable que la liaison de DNAJC5 avec les membranes vésiculaires favorise une certaine conformation de la protéine qui pourrait être essentielle à son interaction avec ExoU. Dans cette hypothèse, l'utilisation de détergent

rendrait donc impossible la formation de ce complexe.

iii- Docking possible entre DNAJC5_{Nter} et ExoU

Pour étudier l'interaction de DNAJC5 et ExoU dans des conditions plus « physiologiques », nous avons examiné la structure de DNAJC5 afin d'identifier des résidus qui pourraient être impliqués dans la liaison avec ExoU, dont la structure tridimensionnelle est également connue (Gendrin *et al.*, 2012). Cependant seule la structure de la partie N-terminale de la chaperonne (résidus 1 à 100) a été publiée (Patel *et al.*, 2016). Nous nous sommes donc focalisés sur ce domaine.

Vivana Job a identifié *in silico* que, grâce à sa forme en tête d'épingle, la partie N-terminale de DNAJC5 (notée DNAJC5_{Nter}) pouvait s'emboîter dans une cavité d'ExoU, différente de celle où se fixe SpcU. (**Figure 31**). Cette insertion favoriserait alors le rapprochement entre certains acides aminés chargés négativement de DNAJC5_{Nter}, situés latéralement et à la pointe de la protéine, avec des résidus basiques d'ExoU possédant une charge opposée. Pour vérifier cette hypothèse, deux séries de mutations ont été introduites dans le gène *DNAJC5*, modifiant la charge de ces résidus. Ces mutations sont dénommées Mut1 et Mut2 et correspondent respectivement aux substitutions Asp-48-Ala et Asp-52-Ala pour Mut1 et Glu-55-Ala, Asp-58-Ala et Glu-62-Ala pour Mut2. Les cellules *DNAJC5*^{-/-} ont ensuite été transfectées avec les plasmides comportant ces mutations avant d'être infectées par la souche PA14, une souche ExoU⁺.

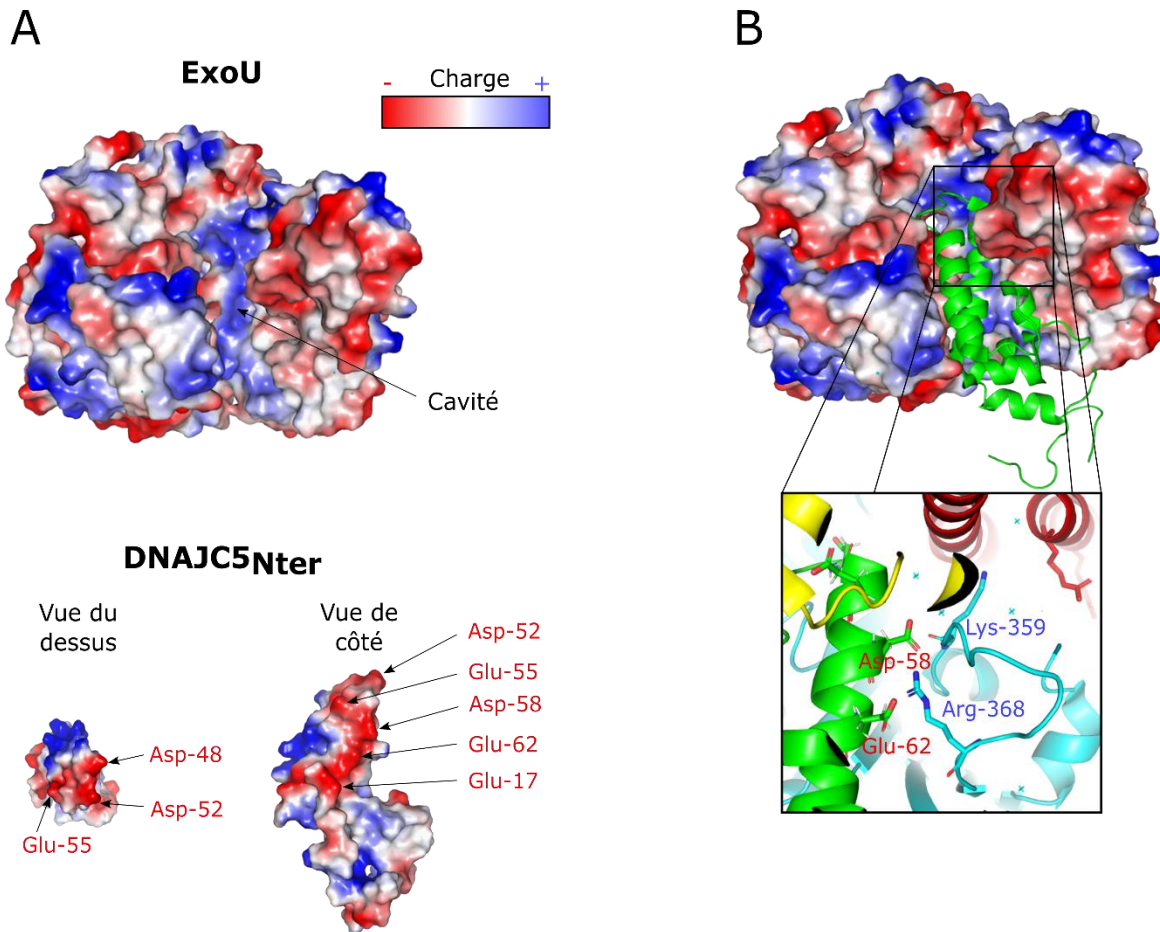


Figure 31 : Modèle d'interaction directe entre ExoU et DNAJC5_{Nter}. **A.** Représentation de surface de la toxine ExoU sans sa chaperonne (haut) et de la protéine DNAJC5_{Nter} (bas). **B.** Docking possible entre ExoU et DNAJC5_{Nter}. Les couleurs sur les graphiques représentent les charges de surface de la structure 3D des protéines : Bleu = positive et rouge = négative

Les cellules comportant ces versions mutées de DNAJC5, présentent une sensibilité identique à l'action d'ExoU, voire sont plus sensibles, comparées aux cellules complémentées avec la version native de la protéine. Par conséquent, s'il y a une interaction directe entre les deux protéines, celle-ci est indépendante de ces résidus (**Figure 32**).

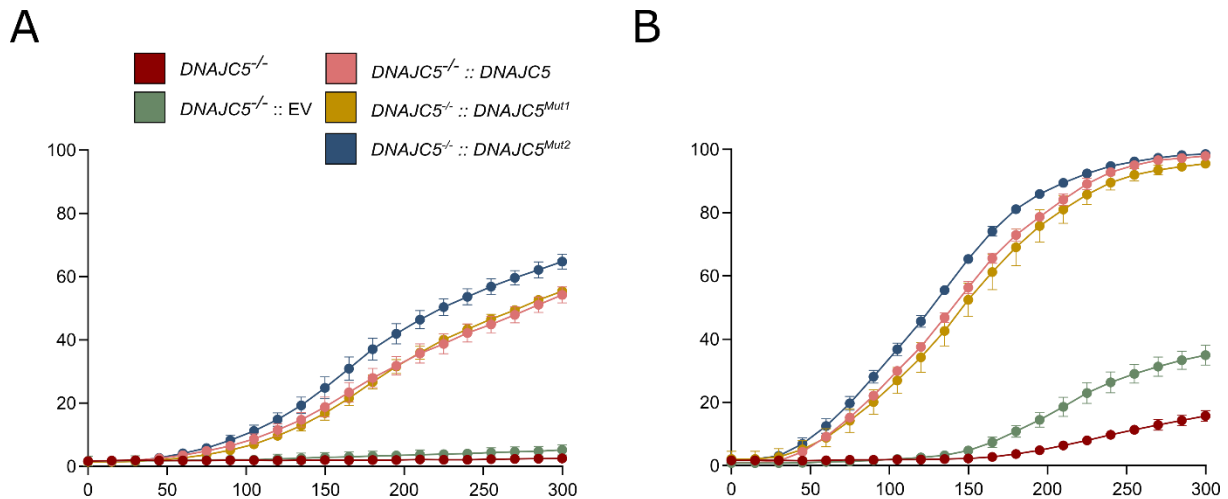


Figure 32 : Évaluation du modèle de docking entre ExoU et DNAJC5 **A.** Infection des cellules à MOI = 20 avec la souche PA14 (ExoU⁺). **B.** Infection similaire avec la souche PP34 (ExoU⁺) à MOI = 2. Mut-1 représente les mutations sur les deux résidus situés à la pointe de DNAJC5, Asp-48 et Asp-52, mutés en alanine. Mut-2 représente les mutations des trois résidus latéraux (Glu-55, Asp-58 et Glu-62) en alanine.

iv- Gel filtration et « pull-down » avec DNAJC5 et ExoU

Dans une dernière tentative pour mettre en évidence l'interaction entre ExoU et DNAJC5, nous avons réalisé des tests d'interaction sur protéines purifiées. Viviana Job a ainsi produit et purifié les deux protéines avec un tag différent pour permettre leur purification (**Figure 33**). Cependant, le domaine riche en cystéines de DNAJC5 cause l'agrégation de la protéine, ce qui empêche sa production et sa purification sous forme monomérique (Swayne *et al.*, 2003). Nous avons donc fait le choix de produire deux versions tronquées de DNAJC5, l'une comprenant la partie N-terminale (résidus 1 à 100) et l'autre comprenant la partie C-terminale (résidus 137 à 198), comme cela a déjà été fait auparavant (Swayne *et al.*, 2003; Patel *et al.*, 2016). Ces deux versions excluent donc le domaine riche en cystéines, noté « Cys-string » (**Matériels & Méthodes – Chapitre 1D**).

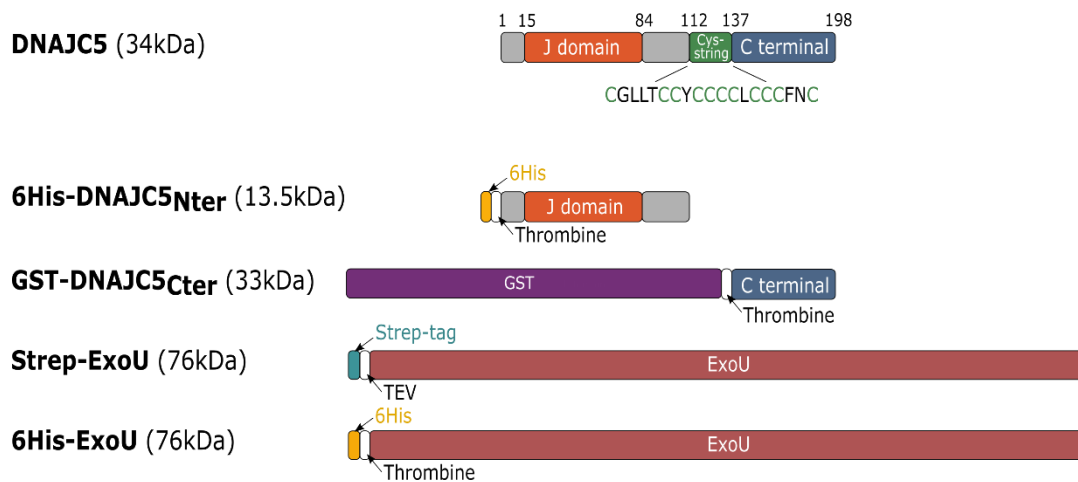


Figure 33 : Représentation schématique des protéines purifiées avec leur tag. La protéine DNAJC5 native de 34 kDa est également schématisée avec ses différents domaines.

Dans un premier temps, les protéines ont été produites séparément chez *E. coli* BL21 (DE3) pour 6His-ExoU (notée par la suite 6His-ExoU) et chez *E. coli* BL21 (DE3) RIL pour 6His-DNAJC5_{Nter} et GST-DNAJC5_{Cter}. Puis la protéine 6His-ExoU a été incubée sur la nuit avec la protéine 6His-DNAJC5_{Nter} ou avec la protéine GST-DNAJC5_{Cter} à un rapport molaire de 1 :1 ou 1 :10, avant que les mélanges soient injectés dans une colonne de filtration sur gel. Les protéines seules ont également été injectées dans la colonne comme contrôles. La **Figure 34** révèle ainsi qu'ExoU purifiée ne forme pas de complexe, ni avec la partie N-terminale de DNAJC5, ni avec la partie C-terminale. Chacune des protéines est en effet éluée à un temps de rétention correspondant à sa taille.

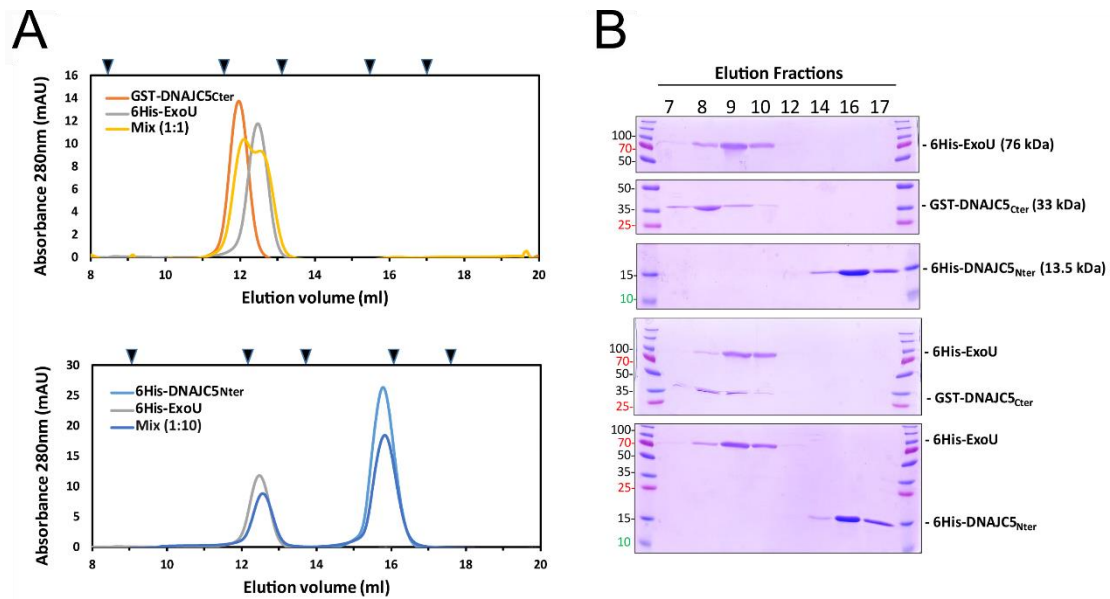


Figure 34 : Profils de filtration sur gel pour les interactions ExoU et DNAJC5. **A.** Les protéines purifiées ont été incubées sur la nuit à 4 ° C avec un rapport molaire de 1: 1 pour 6His-ExoU: GST-DNAJC5_{Cter} et 1:10 pour 6His-ExoU: 6His- DNAJC5_{Nter} avant injection sur une colonne Superdex 200. Les protéines seules ont été injectées comme contrôles. **B.** Les fractions d'élution pour chaque condition ont été analysées par SDS-PAGE et colorées avec du bleu de Coomassie. Des protéines standard ont été utilisées pour l'étalonnage de la colonne et sont marquées sous forme de triangles, de gauche à droite : BlueDextran (correspondant au volume de vide), 158 kDa, 76 kDa, 29 kDa et 13,7 kDa

Dans un second temps, les protéines ont été lysées ensemble avant d'être injectées dans une colonne liant spécifiquement un des marqueurs. Pour cela, les cultures de bactéries exprimant chacune des protéines ont été induites séparément puis mélangées. Les mélanges, comprenant soit les trois protéines (mélange 1), soit les protéines Strep-ExoU et GST-DNAJC5_{Cter} (Mélange 2), soit uniquement les protéines Strep-ExoU et 6His-DNAJC5_{Nter} (Mélange 3), ont ensuite été lysés puis clarifiés, avant d'être injectés dans une colonne His-trap ou Strep-trap. La **Figure 35** révèle que, quelle que soit la protéine d'intérêt liée à la matrice, les autres protéines cibles ne sont pas retenues par la colonne et sont éluées lors de l'injection de la solution, voire lors des lavages. Cela semble indiquer que ces protéines ne forment pas de complexe.

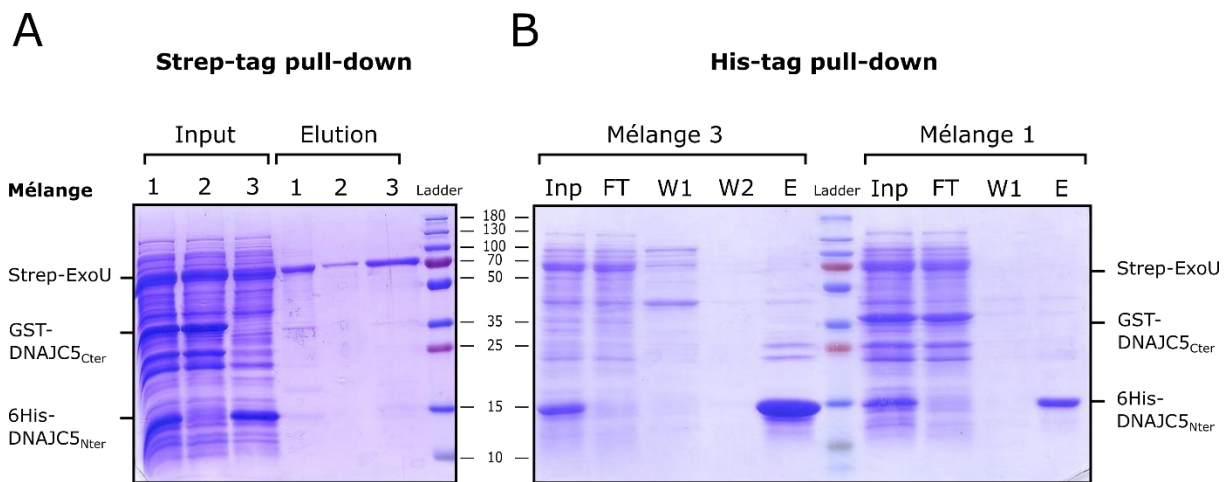


Figure 35 : Pull-down avec les protéines recombinantes ExoU, DNAJC5_{Nter} et DNAJC5_{Cter}. **A.** Trois mélanges différents de protéines sont injectés dans une colonne strep-trap. **B.** Le mélange ExoU et DNAJC5_{Nter} est injecté dans une colonne His-trap ou en combinaison avec DNAJC5_{Cter}. Mélange 1 : Strep-ExoU + 6His-DNAJC5_{Nter} + GST-DNAJC5_{Cter}, Mélange 2 = Strep-ExoU + GST-DNAJC5_{Cter}, Mélange 3 = Strep-ExoU + 6His-DNAJC5_{Nter}, Inp = input, FT = flowthrough, W = lavage, E = élution

L'interaction entre ces protéines nécessite peut-être leur synthèse simultanée dans la même bactérie. Ainsi la production séparée de chacune des protéines recombinantes dissimulerait leur l'interaction. Pour ce faire, nous avons co-exprimés ces protéines dans un même modèle bactérien. 6His-ExoU et GST-DNAJC5_{Cter} ont donc été co-exprimées chez *E.coli* puis le lysat bactérien a été purifié sur une matrice retenant les protéines fusionnées avec un tag GST. La **Figure 36** démontre que la toxine 6His-ExoU n'est pas retenue par la protéine GST-DNAJC5_{Cter}, sur une colonne GST, puisque la toxine est retrouvée dans le « flowthrough » avec le lysat bactérien après l'injection et dans le premier lavage.

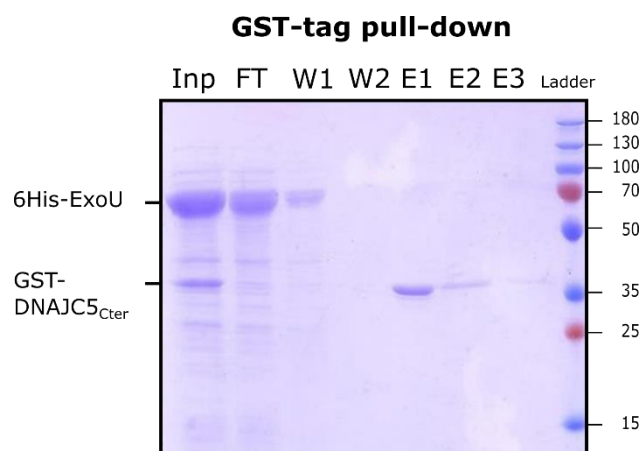


Figure 36 : Pull-down d'ExoU et de DNAJC5_{Cter} co-exprimées chez *E.coli* BL21 (DE3). Inp = input, FT = flowthrough, W = lavage, E = élution.

Pour être active chez *E. coli*, ExoU requière la co-expression de la toxine et de l'ubiquitine, protéine qui n'est pas présente chez les bactéries (Anderson *et al.*, 2011). Il serait donc intéressant de réitérer cette expérience en co-exprimant les protéines d'intérêt chez les levures ou dans les cellules, deux modèles qui expriment naturellement l'ubiquitine.

Néanmoins, aucune association physique entre DNAJC5 et ExoU n'a pu être révélée à travers ces techniques et dans les conditions observées.

2- Implication du domaine Cter d'ExoU dans l'interaction avec les vésicules

Dans cette étude, nous avons recherché si le domaine C-terminal d'ExoU, responsable de l'interaction avec la membrane plasmique, pouvait également être impliqué dans l'interaction avec les vésicules DNAJC5⁺. Deux études précédentes avaient déjà montré que la mutation du domaine MLD d'ExoU provoquait sa localisation cytosolique et avait un impact sur la toxicité d'ExoU dans les cellules HeLa (Stirling *et al.*, 2006; Gendrin *et al.*, 2012). Nous confirmons dans les cellules A549, que la délétion des résidus 680 à 684 d'ExoU, délocalise la toxine de la membrane plasmique des cellules mais également, qu'ExoU ainsi muté, n'est plus associée aux vésicules DNAJC5⁺ (**Figure 37**). Ces résidus, en plus de favoriser l'interaction avec le PIP2 (**Introduction - Chapitre 3B3**), semblent donc être également essentiels pour la localisation appropriée de la toxine sur les vésicules DNAJC5⁺.

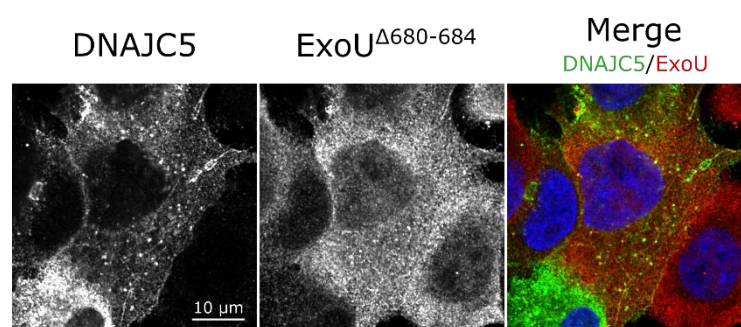


Figure 37 : Co-localisation de DNAJC5 (vert) et d'ExoU^{Δ680-684} (rouge). Les cellules A549 complémentées avec DNAJC5-FLAG ont été infectées pendant 4 heures avec la souche CHAΔST-ExoU^{S142A-Δ680-684 -Δ680-684}

Le fait que le domaine d'ExoU impliqué dans sa localisation vésiculaire soit le MLD, suggère fortement que le récepteur de la toxine à la surface des vésicules est de nature lipidique. Il est peu probable que le PIP2 soit le récepteur vésiculaire d'ExoU, car ce phospholipide est principalement situé sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique. En revanche,

plusieurs publications suggèrent que la toxine peut interagir avec d'autres lipides, en particulier le PI4P (Phosphatidylinositol-4-phosphate), qui est un autre phosphoinositide, précurseur du PIP2 (Tyson and Hauser, 2013; Tyson *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017). Contrairement au PIP2, le PI4P se localise sur la surface cytoplasmique du réseau trans-Golgi ainsi que sur les endosomes (Dickson *et al.*, 2014; Henmi *et al.*, 2016; Wallroth and Haucke, 2018). Une des particularités des phosphoinositides est de diriger le trafic vésiculaire pour faciliter le recrutement d'effecteurs vers des compartiments spécifiques. ExoU pourrait donc avoir évolué pour subvertir les propriétés intrinsèques de certains phosphoinositides et ainsi utiliser un système de localisation et de guidage eucaryote fondamental.

3- Rôle de DNAJC5 dans l'ubiquitylation d'ExoU

Une publication sur *C. elegans*, suggère que l'orthologue de DNAJC5 pourrait jouer un rôle dans le mécanisme d'ubiquitylation des protéines (McCue *et al.*, 2015). La toxine ExoU étant ubiquitylée au cours de son séjour dans les cellules, il serait intéressant de vérifier si DNAJC5 est important pour ce processus (Stirling *et al.*, 2006).

Dans notre publication, nous démontrons qu'ExoU est toujours retrouvée sous sa forme ubiquitylée, avec ou sans la présence de DNAJC5. En effet, le fractionnement post-infection des cellules déficientes ou complémentées, aboutit à des taux similaires d'ExoU-Ub dans les fractions membranaires (Figure 3A de la publication, bandes à 100 kDa). De plus, l'infection des cellules complémentées, avec une souche exprimant la forme inactive d'ExoU (ExoU^{S142A}) et comportant la mutation K178R, rendant impossible l'ubiquitylation covalente de la toxine, montre qu'il y a toujours une co-localisation avec DNAJC5 (**Figure 38**).

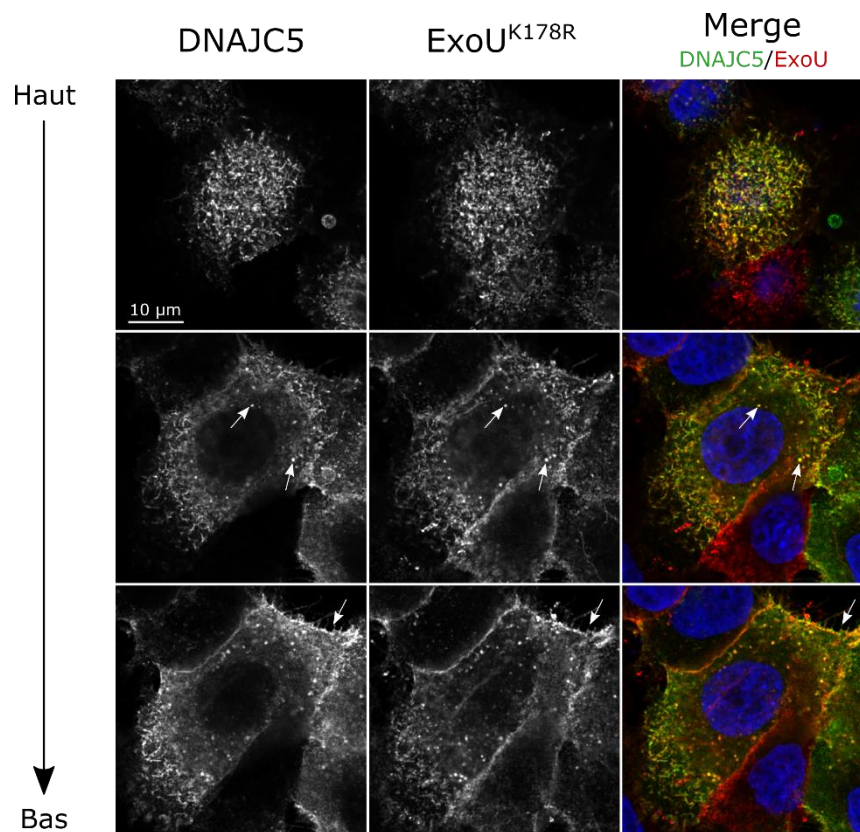


Figure 38 : Co-localisation de DNAJC5 (vert) et d'ExoU^{K178R} (rouge). Les cellules A549 complémentées avec DNAJC5-FLAG ont été infectées pendant 4 heures avec la souche CHAΔST-ExoU^{S142A-K178R}. Trois sections z, obtenues par microscopie confocale, représentatives du haut, milieu et bas de la cellule, sont représentées. Les flèches montrent la co-localisation des deux marqueurs au niveau de vésicules mais également au niveau de la membrane plasmique

Ainsi ces résultats démontrent que DNAJC5 ne participe pas au processus d'ubiquitylation tardif d'ExoU.

4- Conclusion

Un crible génétique portant sur plus de 18 000 gènes humains, a identifié une nouvelle protéine eucaryote essentielle pour déclencher la toxicité d'ExoU dans les cellules cibles. Nous avons démontré que dans les cellules déficientes en DNAJC5, ExoU était totalement inefficace pour induire la lyse cellulaire. De plus, l'inhibition de la protéine dans un modèle *in vivo*, *Drosophila melanogaster*, confère une résistance à l'infection aiguë induite par la toxine. Nous avons également montré qu'au cours de l'infection, qu'ExoU se localisait sur des vésicules péri-nucléaires et à la membrane plasmique, zones co-marquées avec DNAJC5. Enfin, des mutations spécifiques sur le gène *DNAJC5*, inhibant la capacité de la protéine à migrer vers la membrane plasmique, bloquent également la localisation membranaire de la toxine et sa toxicité. Ainsi,

nous avons démontré qu'une fois administrée dans le cytoplasme de la cellule hôte, ExoU utilise des vésicules marquées avec DNAJC5 pour être transportée vers la membrane plasmique, un processus strictement requis pour l'induction de la nécrose cellulaire par la toxine.

Comme il n'est pas inhabituel que des toxines bactériennes interagissent avec des chaperonnes eucaryotes pour devenir actives, il était donc primordial de savoir si ces deux protéines, DNAJC5 et ExoU, interagissaient ensemble. En effet, il a été démontré que Hsc70 et Hsp90, deux chaperonnes eucaryotes jouant un rôle essentiel dans le repliement tridimensionnel des protéines, interagissaient séquentiellement avec la toxine cholérique pour exporter sa sous-unité A1 du réticulum endoplasmique vers le cytosol, ainsi que pour favoriser le repliement de la toxine sous sa forme active (Burress *et al.*, 2019). De même, ces deux chaperonnes interagissent aussi avec d'autres entérotoxines binaires, telles la toxine C2 de *Clostridium botulinum*, la toxine iota de *C.perfringens* et la toxine CDT de *C. difficile*, pour transporter et activer leur sous unité toxique, piégé dans des compartiments cellulaires (Haug *et al.*, 2003; Kellner *et al.*, 2019; Ernst *et al.*, 2017).

Cependant, malgré tous nos efforts, aucune association physique entre DNAJC5 et ExoU n'a pu être révélée. Les différentes approches de mise en évidence d'interactions protéiques ont indiqué que les deux protéines ne formaient pas de complexe dans les conditions utilisées.

Il est donc probable qu'ExoU se lie aux vésicules DNAJC5⁺, sans pour autant interagir avec cette dernière. En effet, dans les cellules déficientes, ExoU est toujours présente sur des vésicules, indiquant que la liaison d'ExoU avec les vésicules serait indépendante de la protéine. En revanche il est probable qu'un lipide spécifique de ces vésicules, structurellement proche du PIP2, comme le PI4P, serve de récepteur.

En conclusion, DNAJC5 semble exclusivement utile pour le transport d'ExoU vers la membrane plasmique, un processus nécessaire pour l'activation de la toxine. La co-chaperonne n'est cependant pas essentielle pour l'activité phospholipase d'ExoU et n'intervient, ni dans l'interaction de la toxine avec les vésicules de transport, ni dans l'interaction tardif d'ExoU avec l'ubiquitine.

Chapitre 2

Identification du récepteur cellulaire d'ExlA

A-Introduction

Les études menées au sein du laboratoire ont révélé que l'ensemble des types cellulaires testés (cellules épithéliales, endothéliales et immunitaires) était sensible à la nouvelle toxine ExlA, découverte chez des souches de *P. aeruginosa* ne possédant pas le SST3. Cette cytotoxicité était proportionnelle à la quantité d'ExlA sécrétée par les souches (Reboud *et al.*, 2016; Basso *et al.*, 2017a). La pore-forming toxine (PFT) induit effectivement la formation de pores à la surface des cellules, d'environ 1,6 nm de diamètre, responsables de la mort par nécrose des modèles observés (Basso *et al.*, 2017a).

Pour induire la formation de pores sur la membrane des cellules, les PFT ont généralement besoin d'un récepteur eucaryote spécifique, qui provoque alors l'oligomérisation des toxines (Dal Peraro and van der Goot, 2016). Ce récepteur peut être de nature protéique ou lipidique. Afin d'identifier un tel récepteur pour ExlA dans les cellules épithéliales et de comprendre ainsi plus clairement son mécanisme de formation du pore, j'ai utilisé la même approche génétique que pour le criblage des partenaires d'ExoU.

Un crible de même nature avait déjà été mené par Pauline Basso sur les macrophages RAW, pour identifier le récepteur cellulaire d'ExlA (Basso, 2017). Pour s'affranchir des autres facteurs de virulence de *P. aeruginosa*, les macrophages avaient été infectées par une souche d'*E.coli* non toxique, transformée avec un plasmide codant pour les protéines ExlB et ExlA, dénommé *E.coli*-ExlBA. Cependant, bien que cette étude ait permis de mettre en lumière la cascade de signalisation activée par ExlA et aboutissant à la mort des macrophages par pyroptose, aucun récepteur n'a pu être identifié. En revanche, cette étude avait souligné l'importance de la composition lipidique pour l'infection des macrophages. En effet, un micro

ARN, le mir-714, jouant un rôle dans la régulation des enzymes impliquées dans la biosynthèse et le métabolisme des sphingolipides et des glycérophospholipides, avait été identifié comme cible potentiel (données non publiées). De plus une autre étude a démontré qu'après infection, la toxine ExlA est principalement localisée sur les radeaux lipidiques, zones de la membrane plasmique riches en sphingolipides (Bertrand *et al.*, 2020).

Ces études laissent donc supposer qu'un lipide, localisé dans les micro-domaines rigides de la membrane, pourrait être le récepteur d'ExlA

B- Identification des ARNg surreprésentés suite à des infections avec une souche ExlA⁺

Les cellules A549 mutées avec la librairie d'ARNg, précédemment utilisées pour le criblage avec ExoU, ont subi quatre infections successives avec la bactérie *E.coli*-ExlBA, utilisée par Pauline Basso pour son étude sur les macrophages (**Matériels & Méthodes – Chapitre 2A**) (Basso, 2017). Les ARNg ont ensuite été séquencés comme précédemment. Trois réplicats indépendants ont été réalisés. La **Figure 39A** montre clairement qu'il y a un enrichissement de certains ARNg dans les échantillons infectés, par rapport à l'échantillon non infecté. L'analyse statistique a révélé un enrichissement significatif pour certains ARNg ciblant, au total, 94 gènes (**Figure 39B**).

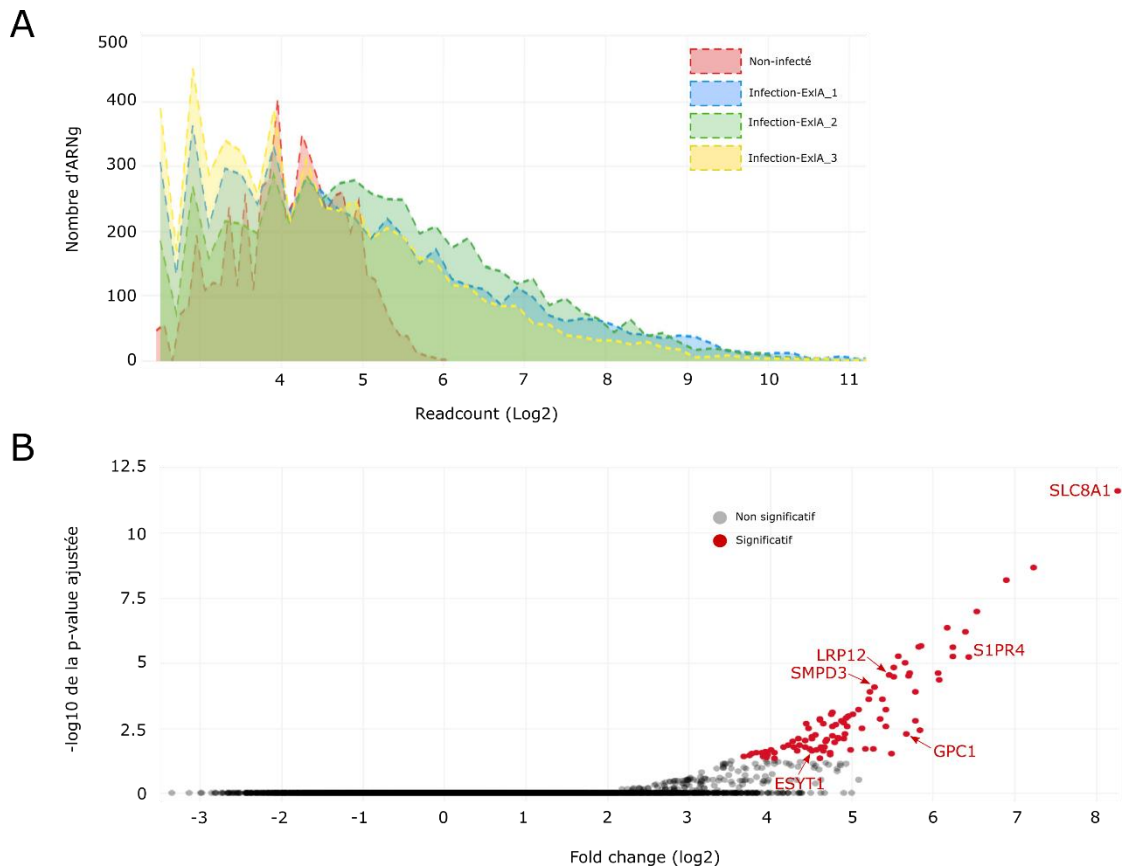


Figure 39 : Criblage des cellules A549 mutées par les ARNg avec E.coli-ExlBA. **A.** Représentation du nombre de « reads » par ARNg pour chaque échantillon. **B.** Analyse des données de séquençage. Analyse statistique des ARNg amplifiés dans les conditions infectées par rapport à la condition non-infectée, selon la méthode DESeq2. Le graphique représente la classification des gènes ciblés par ces ARNg selon leur Fold change et leur p-value. Le seuil de significativité est de 5%

ExlA étant une toxine formant des pores sur la membrane plasmique des cellules cibles, nous nous sommes donc focalisés sur les gènes eucaryotes codant pour des molécules localisées sur la membrane plasmique. Ces molécules pouvant être des protéines membranaires, des protéines impliquées dans la synthèse de sucres décorant les récepteurs membranaires ou des protéines impliquées dans la synthèse de lipides spécifiques. Avec ces critères, 12 gènes ont retenu notre attention, notamment les six gènes identifiés sur la **Figure 39B (Tableau 3)**.

Tableau 3: Liste des gènes identifiés par le crible avec ExlA et codant pour des protéines localisées au niveau de la membrane plasmique

Gène	Nom	Localisation de la protéine
<i>SLC8A1</i>	Solute carrier family 8 member A1	Protéine transmembranaire
<i>SIPR4</i>	Sphingosine-1-phosphate receptor 4	Protéine transmembranaire
<i>GPC1</i>	Glypican 1	Protéine de surface
<i>LRP12</i>	Low-density lipoprotein receptor-related protein 12	Protéine transmembranaire
<i>SMPD3</i>	Sphingomyelin phosphodiesterase 3	Enzyme intracellulaire et membranaire
<i>ESYT1</i>	Extended synaptotagmin 1	Protéine membranaire
<i>HTR3C</i>	5-hydroxytryptamine receptor 3C	Protéine transmembranaire
<i>HTR4</i>	5-hydroxytryptamine receptor 4	Protéine transmembranaire
<i>OR2AG1</i>	Olfactory Receptor 2AG1	Protéine transmembranaire
<i>OR2B2</i>	Olfactory receptor family 2 subfamily B member 2	Protéine transmembranaire
<i>SCUBE1</i>	Signal peptide, CUB domain and EGF like domain containing 1	Protéine membranaire et extracellulaire
<i>WLS</i>	Wnt Ligand Secretion Mediator	Protéine intracellulaire et membranaire

La toxine ExlA étant retrouvée dans les radeaux lipidiques des cellules infectées, les gènes *SMPD3* et *ESYT1*, nous ont paru particulièrement pertinents puisqu'ils codent pour des protéines impliquées dans le métabolisme des sphingolipides

C- Mutation des gènes codant pour les récepteurs potentiels d'ExlA

Pour confirmer l'implication de ces protéines dans l'activation d'ExlA, les gènes correspondants ont été mutés séparément dans les cellules épithéliales A549 à l'aide d'ARNg spécifiques (**Matériels & Méthodes – Chapitre 2D**). Dans un premier temps, pour chacun des six premiers gènes identifiés, trois ARNg, ciblant des exons différents du même gène, ont été rassemblés et transfectés dans une même population cellulaire. Ces populations ont ensuite été infectées par les bactéries *E.coli*-ExlBA et IHMA, toutes deux sécrétant la toxine ExlA, et la nécrose a été suivie par la technique d'incorporation d'iodure de propidium. Malheureusement,

aucune population n'a présenté un phénotype de résistance face à ExlA, comparé aux cellules sauvages (**Figure 40**). De même, les cellules mutées par un seul ARNg spécifique, ciblant un des six derniers gènes du **Tableau 3**, n'a pas permis d'identifier une sous-population résistante à ExlA.

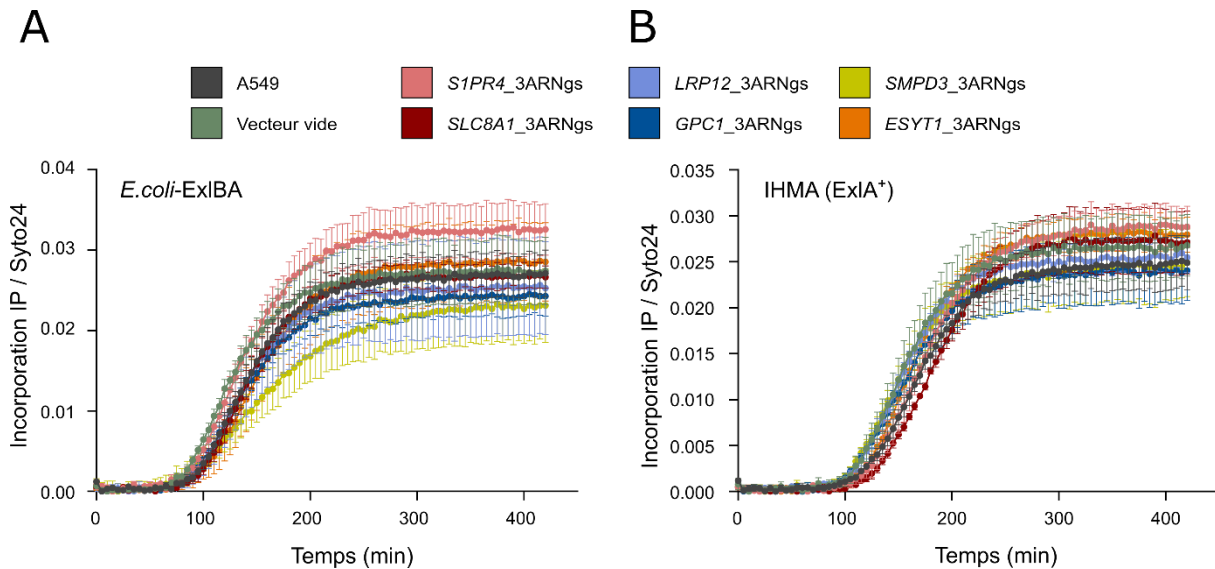


Figure 40 : Test de cytotoxicité avec la toxine ExlA sur les cellules mutées. **A.** Une population polyclonale de cellules, mutée pour chacun des gènes étudiés à l'aide d'une combinaison de 3 ARNg, a été infectée à une MOI de 15 avec la souche *E.coli-ExlBA*. Les cellules A549 natives et les cellules transfectées avec un vecteur vide, servent de contrôles. La nécrose a été évaluée par incorporation d'iodure de propidium (IP), et l'intensité de l'IP a été divisé à chaque temps par l'intensité du Syto24, afin de normaliser les courbes par le nombre de cellules totales. **B.** Test de cytotoxicité similaire au A, mais les cellules ont été infectées avec la souche IHMA à une MOI de 10. Les résultats sont représentés comme le pourcentage moyen de cellules nécrotiques (+/- ET). IP = iodure de propidium

D-Conclusion

La toxine ExlA étant retrouvée dans plusieurs pathogènes et étant actives chez différents hôtes, il apparaît nécessaire de trouver un moyen pour contrer ses effets néfastes, d'autant plus que certaines souches ExlA⁺ ont provoquées des infections fatales chez l'homme (Elsen *et al.*, 2014). L'un d'eux serait d'identifier le récepteur d'ExlA sur les cellules pour développer, par la suite, une stratégie thérapeutique visant à empêcher la liaison de la toxine avec son récepteur. Un criblage avec des cellules épithéliales sur plus de 18 000 gènes, n'a malheureusement pas permis d'identifier un récepteur spécifique pour la toxine.

Cependant, cette étude de cytotoxicité a été réalisée sur des cellules dont un seul gène a été

muté. Il est possible, qu'ExIA se lie à différents récepteurs et l'inactivation d'un seul ne suffit donc pas à bloquer l'activité de la toxine. Par exemple la toxine anthrax de *Bacillus anthracis* peut cibler deux récepteurs différents à la surface des cellules, dénommés ANTXR1 et ANTXR2 et produire cependant les mêmes effets cellulaires : inhiber la signalisation et la migration cellulaire (Van Der Goot and Young, 2009). Ainsi, par la suite, il serait intéressant de mixer les ARNg de plusieurs gènes, afin de perturber la synthèse de différentes protéines dans une même cellule.

Chapitre 3

Développement d'un test ELISA pour la détection d'ExIA

A-Introduction

La toxicité des souches ExIA⁺ est directement liée au niveau de sécrétion de la toxine ExIA, qui peut être très variable selon les souches. Or cette toxine est difficilement détectable dans les milieux d'infection, car très instable. Pour pallier à cet inconvénient, nous avons cherché à mettre en place un test ELISA sensible, permettant de mesurer la quantité d'ExIA dans des surnageants de culture bactérienne, dans des milieux d'infection cellulaire, dans des organismes infectés (souris, drosophile, ...), ou dans des fluides biologiques (expectorats, lavages broncho-alvéolaires, ...) de patients infectés par ces souches.

Les avantages d'un test ELISA (« Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay ») sont nombreux, comparés à d'autres types de test qui pourraient être utilisés pour détecter la présence d'ExIA, comme l'isolation de bactéries sur des milieux sélectifs suivi de l'analyse des caractères biochimiques et toxiques. Le test ELISA est un test rapide, facile à mettre en œuvre et présente, en général, une forte sensibilité.

Dans ce type de test, les anticorps sont essentiels et constituent la base de la spécificité et de la sensibilité. Parmi les différents types de test ELISA, celui sous forme de sandwich est le plus spécifique pour un antigène donné. Cependant, il requière l'utilisation de deux anticorps produits chez des hôtes différents avec de préférence, au moins un des deux anticorps qui soit un anticorps monoclonal.

Notre laboratoire possédait déjà trois anticorps polyclonaux contre ExIA. Ces anticorps, provenant de sérums de lapin, reconnaissent des domaines différents de la toxine et ont déjà été utilisés pour révéler la présence de la toxine sur des immunoblots (**Figure 41**). En particulier,

l'anticorps Nter reconnaît la partie N-terminale de la toxine, l'anticorps Cter la partie C-terminale, tandis que l'anticorps Tripeptides reconnaît trois épitopes différents d'ExIA nommés P4, P5 et P3, du nom des peptides utilisés pour l'immunisation.

Pour mettre en place un tel système, nous avons donc cherché à produire des anticorps monoclonaux chez la souris contre la toxine. La production de ces anticorps chez les souris a été réalisée par l'entreprise BIOTEM et a permis d'isoler quatre hybridomes produisant des anticorps monoclonaux, dont les épitopes ont été identifiés sur la séquence protéique d'ExIA à l'aide de fragments de la toxine produits par Antoine Maillard (**Figure 41**).

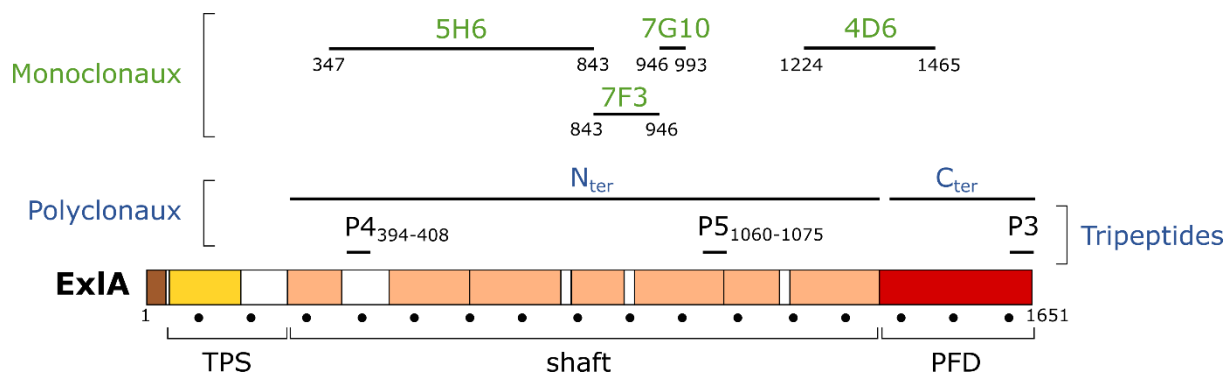


Figure 41 : Cartographie des anticorps sur la séquence ExIA.

B- Présentation du test ELISA en sandwich

Dans ce test, un anticorps de capture, de préférence l'anticorps polyclonal, est adsorbé sur une plaque prévue pour le test ELISA (**Figure 42**). La solution contenant l'antigène, ici ExIA, est alors ajoutée et l'anticorps de capture fixe l'antigène en se liant à un épitope. Un deuxième anticorps, l'anticorps de détection, est alors ajouté. Cet anticorps doit reconnaître un épitope de l'antigène différent de celui reconnu par l'anticorps de capture. Généralement, l'anticorps de détection est un anticorps monoclonal permettant de rendre la détection spécifique. Enfin, un anticorps secondaire, reconnaissant la partie Fc de l'anticorps de détection est ajouté. Cet anticorps, conjugué à une enzyme, la peroxydase de raifort (HRP), permet la production d'un signal en réagissant avec un substrat, qui peut être détecté et quantifié par spectrophotométrie. L'intensité du signal est proportionnelle au nombre d'antigènes fixés

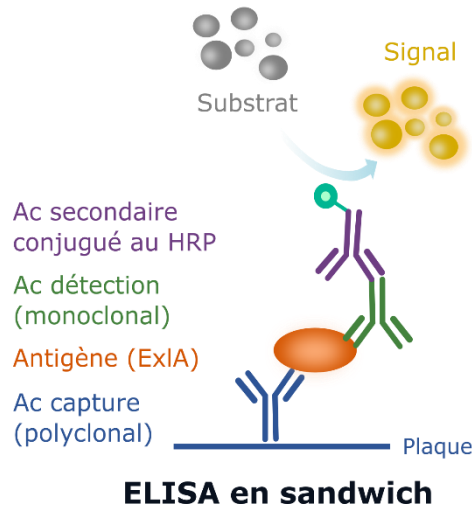


Figure 42 : Principe du test ELISA

C- Expériences préliminaires avec les anticorps polyclonaux

Pour rechercher l'anticorps polyclonal le mieux adapté à ce test ELISA, les anticorps polyclonaux ont été utilisés dans un test ELISA direct. Dans ce test, l'antigène est adsorbé sur la plaque et les anticorps polyclonaux sont utilisés à différentes concentrations comme anticorps de détection pour révéler la présence de l'antigène (**Matériels & Méthodes-Chapitre 3A**). L'antigène utilisé est le surnageant de culture de bactérie BL21 induites pour sécréter la toxine. La **Figure 43A** indique que les trois anticorps détectent bien la présence de la toxine. De plus, des expériences complémentaires ont démontré que ces anticorps n'interagissaient pas avec des lysats de bactéries BL21, indiquant que le signal correspond spécifiquement à la détection d'ExIA.

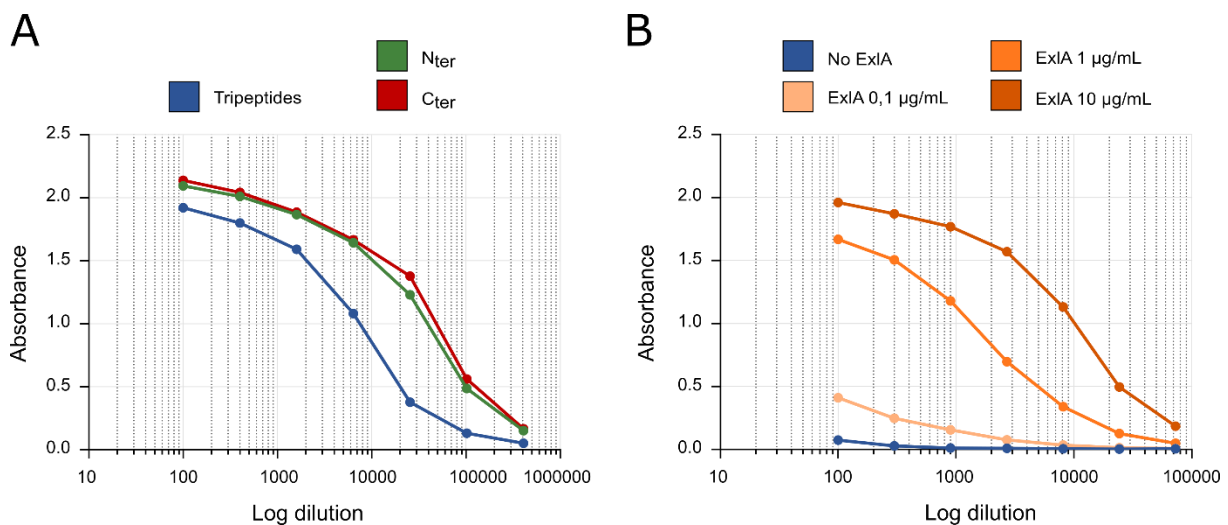


Figure 43 : Test ELISA direct contre ExIA purifiée avec les anticorps polyclonaux

Pour aller plus loin, l'anticorps Tripeptides a été utilisé dans un deuxième test avec des concentrations décroissantes en ExlA (**Figure 43B**). L'analyse montre que l'anticorps détecte l'antigène de façon concentration-dépendante. Ainsi, les anticorps polyclonaux peuvent être utilisés dans le test ELISA en sandwich. Comme l'anticorps Tripeptides reconnaît trois épitopes différents sur ExlA, à la fois dans les parties N- et C-terminale, cet anticorps a été choisi pour le test ELISA.

Cependant, les tests ELISA en sandwich ont révélé une cross-réaction entre cet anticorps polyclonal et l'anticorps monoclonal de souris sélectionné, le 5H6. Pour éviter que ce signal interfère avec celui produit par la présence d'ExlA, l'anticorps Tripeptides a été remplacé par l'anticorps Nter, plus sensible pour détecter ExlA dans un test ELISA en sandwich avec l'anticorps 5H6, que l'anticorps Cter. Le sérum contenant l'anticorps Nter a également été purifié sur une colonne de protéines A, afin d'augmenter la concentration en anticorps et d'éliminer la plupart des contaminants non IgG.

Le test ELISA en sandwich qui en résulte, avec une dilution au 1 :4000 de l'anticorps Nter purifié et une concentration de $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de l'anticorps 5H6, a permis de détecter la toxine ExlA jusqu'à une concentration de 10 ng.mL^{-1} .

Une fois les conditions d'utilisation des différents anticorps définies, il était nécessaire de vérifier si ces conditions permettaient de détecter la toxine sécrétée dans des milieux de culture ou dans des fluides biologiques.

D- Test ELISA avec des échantillons *in vitro*

Pour ce test, le surnageant de bactérie sécrétant ou non ExlA a été dosé. Quatre souches ont été utilisées : BL21-ExlA et CLJ1 exprimant ExlA et les souches BL21 et PAO1 comme témoins négatifs. ExlA a été détectée dans le surnageant de la souche BL21-ExlA, mais pas dans le surnageant de la souche CLJ1. Les deux conditions négatives ne présentant aucun signal. (**Figure 44**). Cette différence de signal entre les deux conditions positives peut provenir d'un manque de sensibilité du test. En effet, les souches « PA7-like » comme CLJ1, sont connues pour sécréter peu d'ExlA dans le surnageant et leur culture nécessite une précipitation à l'acide trichloroacétique pour concentrer la toxine, tandis que la souche BL21-ExlA a été spécialement conçue pour sécréter de grandes quantités de toxine. Une autre hypothèse est que des protéases, sécrétées par CLJ1 et pas par BL21-ExlA, puissent dégrader ExlA et perturber le dosage.

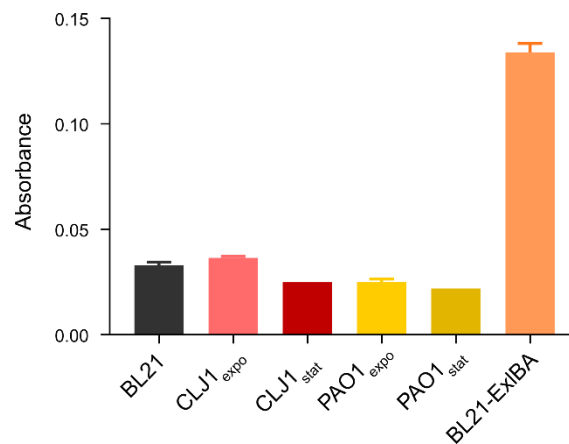


Figure 44 : Dosage ELISA d'ExlA dans les surnageants de cultures bactériennes. Pour CLJ1 et PAO1, les surnageants proviennent de cultures en phase exponentielle ou en phase stationnaire

E- Test ELISA avec des échantillons *in vivo*

Nous ne disposons pas d'expectorat de patient infecté par une souche ExlA⁺. Par conséquent, deux types d'échantillons *in vivo* ont été testés : des échantillons provenant de lavages broncho-alvéolaires (BAL) de souris infectées par une souche ExlA⁺ (CLJ1) et des expectorations de patients infectés par des souches non ExlA⁺ dans lesquelles la toxine ExlA est ajoutée à différentes concentrations (**Matériels & Méthodes - Chapitre 3B**).

La **Figure 45** montre qu'aucune absorbance n'est détectée pour les BAL de souris non infectées (conditions PBS), alors que certaines souris infectées avec la souche PAO1, qui ne sécrète pas ExlA, affichent un signal similaire, voire supérieur à celui détecté chez des souris infectées avec des souches exprimant ExlA. Le signal observé est donc indépendant de la présence de la toxine et peut représenter un bruit de fond important. Ainsi, il semble que ce test ELISA ne permette pas de détecter ExlA dans les BAL de souris infectées par une souche exprimant la toxine.

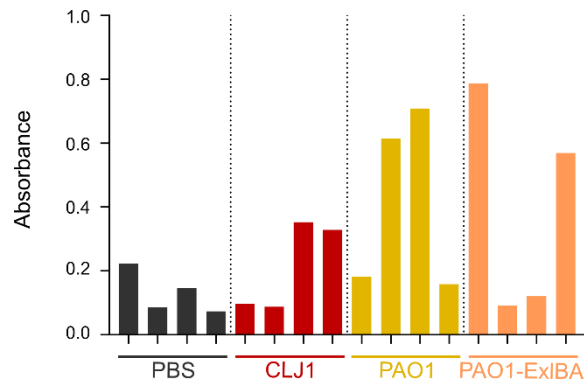


Figure 45 : ELISA d'ExlA dans les lavages broncho-alvéolaires (BAL) murins. Chaque barre représente le BAL d'une souris

De même l'ajout d'ExlA dans les expectorations de patients (numérotés de 1 à 6, **Matériels & Méthodes – Chapitre 3C**), ne donne pas de signal, contrairement à la condition sans expectoration où la toxine est présente à la même concentration (**Figure 46**).

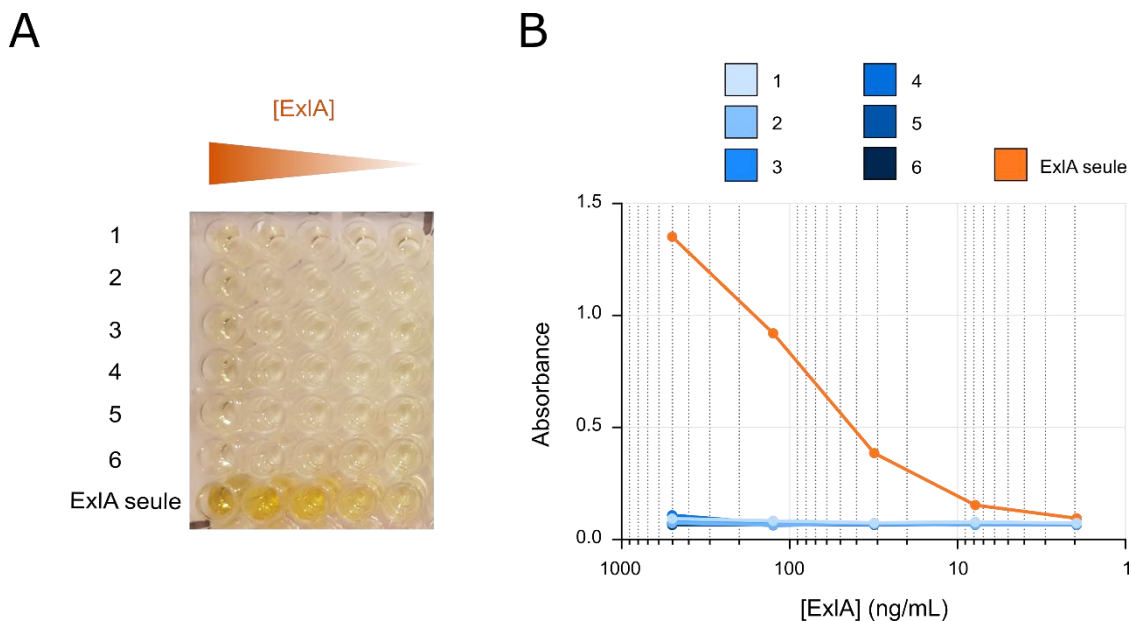


Figure 46 : Dosage ELISA dans les expectorations de patients. **A.** Visualisation du test ELISA après ajout d'ExlA dans les expectorations (numérotés de 1 à 6) et révélation. **B.** Courbe d'absorbance correspondant à détection d'ExlA ajoutée manuellement dans les expectorations de patients infectés (numérotés de 1 à 6)

Ces résultats semblent indiquer la présence de protéases dans ces échantillons *in vivo*, qui dégradent ExlA et empêchent ainsi sa détection par les anticorps. Pour vérifier cette hypothèse, il serait donc intéressant de prélever ces échantillons dans un milieu avec des anti-protéases.

F- Conclusion

Pour conclure, un test ELISA a été mis au point en utilisant un couple d'anticorps polyclonal et monoclonal. L'anticorps de capture étant l'anticorps polyclonal N-terminal purifié et utilisé à la dilution de 1 :4000 et l'anticorps de détection étant l'anticorps monoclonal de BIOTEM 5H6, utilisé à $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Ces anticorps, ont permis de détecter la toxine dans des conditions *in vitro* mais pas dans le surnageant de culture d'un isolat clinique exprimant ExIA (CLJ1). De même ExIA n'est pas détectée dans des BAL de souris infectées et dans des expectorations de patients où la toxine est ajoutée extemporanément. Même si la présence de protéases dans ces échantillons peut expliquer l'absence de signal, ce phénomène peut également s'expliquer par la faible sensibilité du test. En effet, la toxine est détectée à des concentrations de 58,14 pM, ce qui est encore trop élevé comparé à des tests ELISA en sandwich sur des échantillons biologique qui peuvent détecter l'antigène cible à des concentrations de 0,1 pM voire entre 0.02 et 0,6 pM pour certains kits commerciaux (Dhahir *et al.*, 1992). Il est donc nécessaire de continuer à travailler sur l'optimisation des conditions, afin de diminuer la limite de détection du test ELISA pour détecter ExIA.

Discussion générale

A-Le rôle joué par DNAJC5 dans le mécanisme d'activation d'ExoU

DNAJC5 (CSP α) est une co-chaperone exprimée de façon ubiquitaire dans la plupart des cellules, chez les vertébrés (homme, souris, poisson) comme chez les invertébrés (mouche des fruits et nématodes). Un orthologue de la protéine a en effet été identifié chez ces modèles invertébrés, avec les mêmes caractéristiques fonctionnelles (Gundersen, 2020).

Dans notre étude, nous avons identifié cette protéine comme un nouveau cofacteur d'ExoU, essentiel pour son activation complète. La délétion du gène *DNAJC5* empêche en effet la nécrose des cellules par ExoU et la complémentation restore son activité cytotoxique. Or cette protéine est largement décrite comme faisant partie d'un système de trafic vésiculaire, notamment à travers la voie de sécrétion non conventionnelle appelée MAPS. Nos recherches ont démontré la co-localisation de DNAJC5 et d'ExoU au niveau des endosomes tardifs, situés dans la région péri-nucléaire et supposent que, contrairement à ce qui est décrit pour les effecteurs naturels de la voie de sécrétion MAPS, ExoU n'est pas transférée dans la lumière de l'endosome, mais reste à l'extérieure. La fusion de la vésicule avec la membrane plasmique favoriserait donc la fixation d'ExoU sur cette membrane. Ainsi, bien que le mécanisme d'action d'ExoU dans la cellule ait été largement étudié, notre étude fournit une nouvelle piste pour expliquer comment la toxine se localise à la membrane plasmique, une fois injectée dans le cytosol. Dans le modèle proposé, la toxine utilise le trafic vésiculaire, dirigé par DNAJC5, pour atteindre la membrane plasmique, avant d'induire la lyse des lipides membranaires. Utiliser cette protéine comme cofacteur pour devenir active et toxique, témoigne qu'ExoU s'est adaptée pour s'approprier un système de trafic touchant probablement l'ensemble des eucaryotes. Ce mécanisme rend la toxine particulièrement efficace. Ensemble, ces résultats démontrent une nouvelle capacité des toxines bactériennes à subvertir les systèmes de trafic membranaire eucaryotes pour leur propre avantage.

Cependant, DNAJC5 n'est pas le récepteur vésiculaire d'ExoU. Par la suite, les prochaines expériences chercheront à déterminer ce récepteur, qui est probablement lipidique. Il faut, pour cela, dans un premier temps, identifier les lipides qui composent les vésicules DNAJC5⁺, en particulier les phosphoinositides structurellement proches du PIP2. En effet, le domaine MLD d'ExoU, essentiel pour son interaction avec le PIP2 et sa localisation sur la membrane

plasmique, semble également requis pour la localisation vésiculaire d'ExoU alors que ce lipide n'est pas présent.

La construction PH-GFP, où le domaine PH (« pleckstrin homology ») de la protéine PLC δ 1 est associé à la GFP, est couramment utilisée pour étudier la localisation subcellulaire du PIP2 (Stauffer *et al.*, 1998; Tall *et al.*, 2000; Golub and Caroni, 2005). Ainsi, des constructions similaires, avec des domaines protéiques connus pour reconnaître spécifiquement les différents phosphoinositides, pourraient être utilisées pour étudier la colocalisation de ces lipides avec les vésicules DNAJC5⁺. Plusieurs domaines ont déjà été identifiés pour leur association spécifique avec un phosphoinositide et certaines constructions ont été utilisées dans les cellules (Dowler *et al.*, 2000; Lemmon, 2003). Par exemple le domaine PH des protéines OSBP et FAPP1, reconnaît spécifiquement le PI4P dans des conditions *in vitro* et a déjà servi à déterminer la distribution du PI4P dans les cellules COS-7, en combinaison avec la GFP (Godi *et al.*, 2004; Balla *et al.*, 2005). Le domaine PH de la protéine PEPP, se lie quant à lui spécifiquement au PI3P ainsi que le domaine FYVE (Gaulhier *et al.*, 1998; Vermeer *et al.*, 2006; Kale *et al.*, 2010). Dans l'éventualité où un domaine de liaison spécifique d'un phospholipide présenterait une colocalisation avec DNAJC5, alors il faudrait, dans un deuxième temps, inactiver la synthèse de ce lipide, puis vérifier si la colocalisation d'ExoU et DNAJC5 est bien perturbée au niveau des vésicules DNAJC5⁺. Cette inhibition pourrait être réalisée via des composés chimiques ou des siRNA et ARNg ciblant spécifiquement les régulateurs impliqués dans la biosynthèse du phospholipide identifié. Si malgré tout le récepteur est protéique, une immunoprécipitation d'ExoU, suivie d'une analyse protéomique, pourrait être envisagée à partir des cellules totales ou de la fraction endosomale.

Au cours de ma thèse, nous avons également utilisé des cellules endothéliales provenant de la veine ombilicale humaine (HUVECs) pour confirmer le rôle de DNAJC5 dans ces cellules primaires. Même si nous avons obtenu des résultats préliminaires prometteurs, la courte viabilité de ces cellules restreint l'étude à une population hétérogène pour l'inactivation du gène et compromet ainsi une étude plus poussée sur un clone cellulaire déficient (données non montrées). Il serait cependant intéressant d'utiliser des types cellulaires autres que les cellules épithéliales, pour démontrer le rôle primordial de DNAJC5 dans le mécanisme d'activation d'ExoU. De même, bien que l'inactivation de *DNAJC5* soit létale chez les organismes d'étude, il pourrait être envisageable d'inactiver le gène uniquement dans les cellules du poumon de certains organismes, puis d'infecter ces zones avec une souche ExoU⁺ pour vérifier l'incapacité de la souche à induire la nécrose de ces cellules. Enfin, au vu des nombreux homologues

d'ExoU, nous pourrions tester certains d'entre-eux dans un test de cytotoxicité avec les cellules déficientes en DNAJC5. Cela permettra de définir si la co-chaperonne est spécifique du mécanisme d'action d'ExoU de *P. aeruginosa*.

B- Vers une meilleure compréhension du mécanisme d'action d'ExlA

Depuis sa découverte, beaucoup de travaux ont été menés au laboratoire, pour caractériser le mécanisme d'action d'ExlA. Contrairement à certaines autres PFT qui sont actives une fois sécrétées et sous forme solubles, ExlA nécessite une certaine proximité entre les bactéries et les cellules eucaryotes pour induire la formation de pores.

La formation de pore par ExlA reste cependant énigmatique. En particulier, le récepteur d'ExlA permettant l'oligomérisation de la toxine reste inconnu. Or, identifier ce récepteur permettrait de développer des cibles thérapeutiques spécifiques pour inhiber l'effet toxique d'ExlA observé sur différents modèles (cellules, souris) (Reboud *et al.*, 2016; Basso *et al.*, 2017a; Bouillot *et al.*, 2017, 2020). Le travail de criblage d'une banque de cellule par ExlA, dont plus de 18 000 gènes ont été inactivés, n'a pas permis d'identifier un récepteur pour la toxine. Cependant, plusieurs pistes ont souligné que la composition lipidique de la membrane plasmique pourrait jouer un rôle important. En effet, des gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme des sphingolipides ont été identifiés. De plus, au cours d'une l'infection, la toxine est principalement retrouvée dans les radeaux lipidiques (Bertrand *et al.*, 2020) et une étude précédente a souligné l'importance d'un micro ARN spécifique de la biosynthèse de certains lipides, dans l'activité d'ExlA sur des macrophages.

D'autres PFT sont connues pour utiliser les lipides de la membrane cellulaire afin de devenir active. C'est notamment le cas de la toxine ShlA de *Serratia marcescens*, dont la région N-terminale est importante pour la liaison lipidique, avec entre autres le phosphatidyléthanolamine (Hertle, 2005). Même si l'exolysine ne partage que 35% d'identité avec ShlA, il n'est pas exclu que son récepteur soit également lipidique et que l'interaction soit dépendante du domaine N-terminal d'ExlA (Elsen *et al.*, 2014). Le domaine C-terminal d'ExlA étant responsable de la perte de l'intégrité membranaire (Bertrand *et al.*, 2020).

Un récepteur lipidique pour ExlA pourrait notamment expliquer la diversité des hôtes ciblés par cette toxine. Cependant les expériences menées dans ce sens n'ont pas permis de prouver que les lipides, en particulier les sphingolipides, serviraient de récepteur pour ExlA. Par la suite,

il serait intéressant de combiner plusieurs mutations afin d'inactiver sélectivement certaines voies de synthèse des lipides membranaires, puis de vérifier si ces cellules sont effectivement plus résistantes à ExlA que les cellules natives.

Matériels & Méthodes

Chapitre 1

Interaction entre ExoU et DNAJC5

A-Construction de la souche exprimant la toxine ExoU-HA

Pour construire le plasmide pUCP*exoU*^{SI42A}-HA-*spcU*, le site de restriction de l'enzyme SpeI a d'abord été inséré en aval du gène *exoU* dans le plasmide pUCP*exoU*^{SI42A}-*spcU* par mutagenèse dirigée avec les oligonucléotides nommés « ExoU_SpeI », listés dans le **Tableau 4**. Ensuite, pour insérer le gène codant pour le tag HA dans le plasmide nouvellement obtenu pUCP*exoU*^{SI42A-SpeI}-*spcU*, deux oligonucléotides contenant la séquence HA avec une séquence linker, le tout flanqué du site de restriction de SpeI, ont été conçus (**Tableau 4**). Ces deux séquences ont été hybridées, phosphorylées puis insérées dans le plasmide, auparavant digéré par SpeI. Le plasmide résultant a été transformé dans des cellules compétentes TOP10 (#C4040-03, Invitrogen). Après extraction du plasmide (Monarch Plasmid Miniprep Kit, #T1010L), le plasmide pUCP*exoU*^{SI42A}-HA-*spcU* a alors été transféré dans la souche de *P. aeruginosa* CHAΔST, dont les gènes *exoS* et *exoT* sont mutés pour empêcher la production de ces deux toxines.

Tableau 4: Liste des oligonucléotides utilisés pour ajouter un tag HA au gène *exoU*

Nom	Séquences (5'→3') *
ExoU_SpeI-F	GGCGGAATAAGGAGTTC ACTAGT <u>TAAATGATTGATACATGGCT</u> GGC
ExoU_SpeI-R	GCCAGCCATGTATCAATCAT <u>TTAACTAGT</u> GAACTCCTTATTCCG CC
ExoU_SpeI_ Linker_HA-F	CTAGT GCTCCGCCGCCTCCGCCGCCGGCGCCGGCGAAGCCGCC GCCT ACCCGTACGATGTACCGGATTACGCATAGA
ExoU_SpeI_ Linker_HA-R	CTAGTCTATGCGTAATCCGGTACATCGTACGGGTAGGCGGGCGGC TTCGCCGGCGCCGGCGGGAGGCGGGAGCCA

* Les séquences en gras indiquent le site de restriction SpeI et les lettres soulignées, le codon stop du gène *exoU*. Les lettres noires correspondent à la séquence du « Linker » ajoutée, tandis que celle en rouges, représentent la séquence du tag HA

B- Sécrétome bactérien avec induction du SST3

La souche CHAΔST, contenant le plasmide pUCP_{exoU}^{S142A}-HA-*spcU* a d'abord été incubée sur la nuit à 37°C dans 3 mL de LB contenant 300 mg.mL⁻¹ de carbénicilline, afin de permettre uniquement la croissance des bactéries transformées. Les bactéries ont ensuite été inoculées à une DO de 0,2 dans un milieu de culture identique au précédent (SST3-) ou contenant en plus, 5 mM d'EGTA et 20 mM de MgCl₂ (SST3+). Ces composants permettent en effet de dépléter le calcium du milieu et ainsi d'induire la sécrétion des effecteurs du SST3 de manière artificielle. Les cultures bactériennes sont ensuite incubées trois heures puis normalisées en fonction de la DO, avant que les culots bactériens et les surnageants (sécrétomes) soient récupérés en centrifugeant les cultures à 6 000 g pendant 15 min. Les culots bactériens sont alors resuspendus dans 300 µL de LB puis le même volume de culot et de sécrétome (16 µL) est déposé sur gel et analysé par western-blot.

C- Co-immunoprécipitation

Pour chaque condition, 3.10⁶ de cellules ont étéensemencées et cultivées pendant 48 heures dans des boîtes de 10 cm, contenant du milieu DMEM supplémenté avec 10% de SVF. Le milieu contenant les cellules *DNAJC5*^{-/-} :: *DNAJC5* a également été supplémenté avec 200 µg.mL⁻¹ de néomycine. Ensuite, les cellules ont été lavées avec du PBS et les milieux, remplacés par du DMEM. Les cellules ont alors été infectées par des bactéries à une MOI de 15 pendant 4 heures. Les cellules de chaque boîte ont été lavées deux fois avec du PBS^{+/+} froid et lysées dans 400 µL de tampon de lyse contenant 1% de Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, un cocktail d'inhibiteur de protéase (# 04693159001, Roche) et le vanadate et l'acide okadaïque dilués respectivement à 1: 200 et 1: 1000. Les lysats ont été éliminés des débris cellulaires en collectant les surnageants après centrifugation à 18 000 g pendant 10 min à 4°C. Avant d'effectuer une immunoprécipitation avec les lysats cellulaires clarifiés, les billes magnétiques (#1003D, Invitrogen) ont été équilibrées avec l'anticorps puis lavées. En bref, 50 µL de billes par condition ont été incubées dans un tube Eppendorf de 1,5 mL, pendant 1h30, sur un agitateur rotatif, avec 5 µg d'anticorps anti-HA ou anti-FLAG. Ces billes ont ensuite été placées sur un portoir magnétique afin de retirer le surnageant. Les billes coatées avec l'anticorps, ont alors été resuspendues et mixées par aspiration-refoulement avec 200 µL de tampon de lavage (PBS + 0,02 % de Tween20). Le surnageant a de nouveau été éliminé en plaçant les billes sur le portoir magnétique.

Les lysats cellulaires clarifiés ont ensuite été mélangés avec ces billes équilibrées et incubés pendant 1h30 sur un agitateur rotatif, pour immunoprécipiter les protéines marquées FLAG (DNAJC5) ou HA (ExoU). Comme précédemment les surnageants ont été retirés et les billes ont été lavées trois fois avec 200 μ L de tampon de lavage. Après les lavages, les billes sont resuspendues avec 100 μ L de tampon de lavage et transférées dans un nouveau tube. Pour l'élution, le surnageant des billes a été éliminé et ces dernières ont été resuspendues dans 20 μ l d'un tampon non réducteur (tampon Laemmli 2X). Les tubes ont ensuite été bouillis à 95°C pendant 5 min. Les surnageants ont finalement été transférés dans des nouveaux tubes et ont été bouillis de nouveau avec 1 μ L de β -mercaptoéthanol (dilution finale 5%) avant séparation par SDS-PAGE et visualisation des protéines par immunoblot.

D-Production des protéines recombinantes

E.coli BL21(DE3) a été transformée avec le plasmide pET15b-ExoU pour ajouter un tag 6His en amont du gène ExoU, tandis que *E.coli* BL21(DE3)RIL a été transformée avec le plasmide pET15b-DNAJC5_{Nter} ou le plasmide pGEX-DNAJC5_{Cter} pour ajouter un tag 6His en amont du gène DNAJC5_{Nter} et un tag GST en amont du gène DNAJC5_{Cter}. Les bactéries ont été cultivées dans 300 mL de milieu Luria-Bertani (LB) à 37°C, jusqu'à une DO₆₀₀ de 0,8, puis l'expression des protéines a été induite par addition de 1 mM d'IPTG (isopropyl-D-thiogalactopyranoside) dans les cultures pendant 21 heures à 25°C. Après centrifugation de chacune des cultures, les culots bactériens ont été lysés à l'aide du Microfluidizer pendant 1h à 18 000 psi dans 30 mL d'un tampon de lyse spécifique de chaque souche. Pour la souche exprimant la protéine 6His-ExoU, ce tampon était composé de 25 mM de Tris-HCl (pH=8) et de 500 mM de NaCl. Pour la protéine 6His-DNAJC5_{Nter}, le tampon de lyse était composé de 25 mM de NaPi (pH=8), 200 mM de NaCl et 10% de glycérol, tandis que pour la souche exprimant la protéine GST-DNAJC5_{Cter}, le NaPi était remplacé par 25 mM d'HEPES (pH=7,5). Dans chaque cas, un cocktail d'anti-protéases a été ajouté au tampon de lyse (#0653282001, Sigma). Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 30 000 g pendant 1 h 30 min, et le surnageant a été chargé sur une colonne His-Trap de 5 ml (GE Healthcare) pour les protéine 6His-ExoU et 6His-DNAJC5_{Nter} et sur une colonne GSTrap-HP de 5 ml (GE Healthcare) pour la protéine GST-DNAJC5_{Cter}. Au préalable, chacune des colonnes a été équilibrée dans avec le tampon de lyse respectif. Pour la protéine 6His-ExoU l'élution a été réalisée en ajoutant 500 mM d'imidazol dans le tampon de lyse, de même pour la protéine 6His-DNAJC5_{Nter}, tandis que la protéine GST-DNAJC5_{Cter} a été éluée avec un tampon contenant 20 mM de glutathion et dans 50 mM

de Tris-HCl (pH=8,0).

E- Chromatographie d'exclusion

Les protéines 6His-Exou, 6His-DNAJC5_{Nter} et GST-DNAJC5_{Cter} ont été produites séparément dans 500 mL de culture, comme décrit précédemment, puis après induction, les bactéries ont été lysées et purifiées sur des colonnes GST-Trap ou His-Trap de 5 ml. Les protéines ont ensuite été purifiées par filtration sur gel, pour éliminer des agrégats possibles, puis les protéines pures ont été incubées à un rapport molaire 1: 1 ou 1 :10 sur la nuit à 4°C, avant d'être injectées sur une colonne Superdex 200 HR 10/30, préalablement équilibrée avec une solution contenant 25 mM HEPES (pH 7,5), 0,1 M de NaCl et 5% de glycérol. Les protéines seules sont également été réinjectées dans la colonne comme contrôles. Les fractions éluées ont été analysées par SDS-PAGE et colorées avec du bleu de Coomassie.

F- Pull-down avec les protéines exprimées séparément

Les bactéries *E. coli* BL21 (DE3) RIL contenant le plasmide codant pour la protéine 6His-DNAJC5_{Nter}, ont été cultivées dans 500 ml de milieu Luria-Bertani (LB) à 37°C, jusqu'à une OD₆₀₀ comprise entre 0,5 à 0,8. La production de protéine a ensuite été induite en ajoutant 1 mM d'IPTG dans la suspension et en incubant les bactéries pendant 3 h à 37°C. En parallèle, les bactéries *E. coli* BL21 (DE3) et *E. coli* BL21 (DE3) RIL (Chf^R), contenant respectivement les plasmides codant pour les protéines Strep-ExoU et GST-DNAJC5_{Cter} ont été cultivées de la même façon mais l'induction s'est déroulée sur la nuit à une température de 18°C. Pour le pull-down Strep-trap, 100 mL de chacune des cultures bactériennes ont été mélangés, centrifugés puis lysés par sonication dans 30 mL d'un tampon de lyse contenant 100 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM de NaCl, 1 mM d'EDTA (Tampon A) supplémenté avec 10 µL d'une solution de DNaseI à 10 mg.mL⁻¹ et d'un cocktail d'inhibiteur de protéases. La sonication des bactéries a été réalisée par microfluidizer en effectuant 4 passages à 15 000 psi. Le mélange a ensuite été centrifugé 1h à 30 000 g et chargé sur une colonne Strep-Trap de 1 ml (GE Healthcare), pré-équilibrés dans le tampon A. Les complexes ont été élués avec le même tampon contenant 2,5 mM de desthiobiotin. Toutes les fractions ont été analysées par SDS-PAGE 15% avec 20 µL d'échantillon par condition. Pour le pull-down His-Trap, la même procédure a été appliquée, excepté que les complexes ont été élués avec le tampon A supplémenté avec 10% de glycérol et 500 mM d'imidazol.

G-Pull-down avec les protéines co-exprimées

Pour cette expérience, les bactéries *E. coli* BL21 (DE3) ont été transformées avec les plasmides pET30A-Strep-ExoU et pGEX-DNAJC5_{Cter} codant respectivement pour les protéines Strep-ExoU et GST-DNAJC5_{Cter}. Les bactéries transformées ont été cultivées sur une boîte de LB agar contenant 100 µg.mL⁻¹ d'ampicilline et 25 µg.mL⁻¹ de kanamycine. Une colonie a été resuspendue dans 3 mL de LB liquide sur la nuit puis amplifiée dans 30 mL jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ comprise entre 0,6 et 0,7. La production des protéines a alors été induite en ajoutant 1 mM d'IPTG dans le milieu de culture sur la nuit à 18°C. Les culots bactériens ont été lysés par sonication dans un tampon de lyse contenant 25 mM HEPES (pH 7,5), 200 mM de NaCl et 10% de glycérol. Après clarification, l'extrait a été chargé sur une colonne GST-Trap de 1 ml (GE Healthcare), pré-équilibré avec le tampon de lyse. L'élution a été faite avec le tampon B composé de 50 mM de Tris-HCl et 20 mM de glutathion (pH final 7,5), puis les fractions ont été analysées par SDS-PAGE.

H- Test HTRF pour quantifier l'interaction entre ExoU et DNAJC5

1- Préparation des contrôles

L'interaction entre les protéines humaines USP8 et CHMP1B a déjà été documentée et ces deux protéines serviront de contrôles (Row *et al.*, 2007; Crespo-Yañez *et al.*, 2018). Pour réaliser ce test, un tag HA a été ajouté à la protéine USP8, tandis qu'un tag FLAG a été ajouté à la protéine CHMP1B. Le contrôle négatif utilisé est la protéine CHMP1B délétée des 3 hélices α situées au niveau de son domaine C-terminal (noté CHMP1B $\Delta\alpha4\alpha5\alpha6$), qui empêche alors son interaction avec USP8. En réalité, cette protéine mutée est très peu exprimée après transfection et son utilisation permet ici de mettre en évidence le bruit de fond généré par la technique HTRF. Des cellules HEK293T sontensemencées dans les puits d'une plaque 24 puits et sont ensuite co-transfectées par des plasmides codant pour les protéines chimères HA-CHMP1B (-WT ou - $\Delta\alpha4\alpha5\alpha6$) et FLAG-USP8. Ces cellules sont lysées après 48h de transfection avec 150 µL par puits de tampon TBS froid, contenant 1% de Triton X-100 et des inhibiteurs de protéases. Le lysat est enfin centrifugé à 1 500 rpm pendant 15 minutes à 4°C puis conservé à -80°C.

2- Préparation des échantillons testés

Les lysats de cellules déficientes en DNAJC5 ou complémentées avec le gène sauvage, ont été

préparés de la même façon que lors des tests de co-immunoprécipitation, après 4h d'infection avec la souche CHA Δ ST, contenant le plasmide pUCP $_{exoU}^{S142A}$ -HA-*spcU*. Pour obtenir une concentration similaire à celle des échantillons contrôles, ces lysats ont été dilués au 1 :2.

3- Évaluation de l'interaction entre les protéines

Le test HTRF est réalisé en plaque 384 puits. Une gamme de dilution des échantillons a été effectuée. Pour cela, chacun des échantillons (contrôles négatifs compris) a été dilué entre 1 et 100 fois dans 10 μ L de tampon de lyse. Puis, dans les puits correspondants, 10 μ L d'une solution contenant un mélange des anticorps donneur et accepteur, a été ajouté au volume de 10 μ L contenant les échantillons. La solution d'anticorps a été préparée en tampon HTRF (50 mM HEPES (pH = 7,5) ; 0,4 M KF ; 0,05% Tween20 ; 0,1% BSA), selon la notice Cisbio, avec 150 ng.mL⁻¹ pour l'anticorps donneur, anticorps monoclonal de souris anti-FLAG-M2 conjugués au cryptate d'Europium, (#61FG2KLx, Cisbio Bioassays) et 1 μ g.mL⁻¹ pour l'anticorps accepteur, anticorps monoclonal de souris anti-HA conjugués au d2 (#610HADAx, Cisbio Bioassays).

La plaque a été incubée pendant 5h à température ambiante avant d'être analysée à l'aide du Tecan Infinite M1000 : excitation de l'anticorps donneur à 340 nm, puis après un délai de 60 μ s, lecture pendant 500 μ s des émissions des anticorps donneur et accepteur, à 620 nm et 665 nm respectivement. Les résultats sont présentés comme étant le rapport entre l'intensité du signal et celui du témoin négatif, calculé selon la formule : $\% \Delta F = \frac{([665/620]_{\text{échantillon}} - [665/620]_{\text{ctl négatif}})}{[665/620]_{\text{ctl négatif}}} \times 100$.

Chapitre 2

Criblage avec la toxine ExlA

Les cellules A549-CRISPR utilisées pour réaliser ce crible sont les mêmes que celles décrites dans le manuscrit sur la toxine ExoU.

A-Infection des cellules A549-CRISPR avec ExlA

La souche *E.coli*-ExlBA a été cultivées dans du milieu Luria-Bertani (LB) à 37°C sous agitation avec 10 µg.mL⁻¹ de tétracycline. Pour les tests d'infection, les cultures d'une nuit ont été diluées à une densité optique (DO₆₀₀) de 0,06 dans du milieu LB avec 10 µg.mL⁻¹ de tétracycline et cultivées sous agitation. Lorsque ces cultures ont atteint une DO₆₀₀ de 0,6, de l'arabinose (0,05%) a été ajoutée pour induire la synthèse d'ExlA et les suspensions bactériennes ont été incubées une heure supplémentaire, afin d'atteindre une DO₆₀₀ de 1.

Pour le criblage, trois boîtes de 15 cm contenant chacune 15.10⁶ de cellules A549-CRISPR ont été infectées avec la souche pré-induite d'*E.coli*-ExlBA, pendant 2h30 à une MOI de 5. Comme lors de la culture bactérienne, 0,05% d'arabinose a été ajouté dans le milieu de culture des boîtes. Pour stopper l'infection, les cellules survivantes (20 à 30% des cellules initiales) ont été trypsinisées après lavage et réensemencées dans du DMEM supplémenté avec 10% de SVF et 20 µg.mL⁻¹ de polymixine B. Les populations survivantes ont été amplifiées et évaluées quotidiennement pour surveiller la récupération des cellules. Le lendemain de l'ensemencement, les milieux de culture ont été changés et la polymixine B remplacée par un mélange de Penicilline/Streptomycine (50 U.mL⁻¹ et 50 µg.mL⁻¹ respectivement). Lorsque les cellules survivantes ont atteint une confluence de 70 à 80%, elles ont été soumises à trois cycles d'infection supplémentaires avec la souche pré-induite d'*E.coli*-ExlBA, permettant la répétition de la procédure avec la même couverture.

B- Extraction, séquençage et analyse d'ADN génomique

Après quatre cycles d'infection, les populations survivantes ont été amplifiées pour obtenir 2.10^7 cellules, puis chaque population cellulaire a subi une extraction d'ADN génomique (ADNg) avec le kit QIAamp DNA Blood Maxi, en suivant le protocole du fabricant. Une PCR en une seule étape a alors été réalisée afin d'enrichir et d'amplifier les ARNg du génome de ces populations cellulaires sélectionnées avec des adaptateurs Illumina TruSeq (indices i5 et i7). De plus, un code-barre unique de deux index de 8 pb, requis pour le séquençage Illumina, a été ajouté pendant la PCR, à chaque pool d'ARNg amplifiés (voir **Tableau 4**). Les conditions de la PCR sont les mêmes que dans le manuscrit sur ExoU. Enfin, un séquençage haut débit a été réalisé sur le pool d'amplicons à l'aide d'un appareil NextSeq 500 (Illumina) sur la plateforme du CNRS d'Orsay (Institut de Biologie Intégrative de la Cellule). Les données brutes ont été traitées et analysées à l'aide d'une plateforme d'analyse nommée CRISPR-AnalyzeR. Les p-valeurs ajustées ont été analysées selon la méthode DESeq2, pour identifier les gènes surreprésentés ciblés par les ARNg, contenues dans les échantillons infectés par rapport à un échantillon non-infecté. Il est à noter que l'échantillon non-infecté est le même que celui utilisé dans le crible avec ExoU.

Tableau 5: Liste des oligonucléotides utilisés pour amplifier et séquencer les fragments d'ADNg, contenant les séquences d'ARNg, de chaque échantillon, après le criblage avec la toxine ExlA

Noms	Séquences (5'→3')*
ExlA-infecté-1_F	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATAGAGGC ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT TTGTG GAAAGGACGAAACACCG
ExlA-infecté-1_R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGAATCTCGTGAC TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT ACTTGCTAT TTCTAGCTCTAAAAC
ExlA-infecté-2_F	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATAGAGGC ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT TTGTG GAAAGGACGAAACACCG
ExlA-infecté-2_R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTCTGAATGTGAC TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT ACTTGCTATT TCTAGCTCTAAAAC
ExlA-infecté-3_F	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATAGAGGC ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT TTGTG GAAAGGACGAAACACCG
ExlA-infecté-3_R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACGAATTCGTGACT GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT ACTTGCTATTTC TAGCTCTAAAAC

* Les séquences en gras indiquent l'index i5 (séquence forward) ou i7 (séquence reverse). Les

séquences rouges indiquent la séquence d'hybridation sur le vecteur TKOv3

C- Inhibition des gènes sélectionnés

1- ARNg ciblant les gènes identifiés

Tableau 6: Liste des ARNg utilisés pour inhiber les gènes d'intérêt identifiés par le crible avec la toxine ExIA

Nom*	Séquences (5'→3') ^A
ARNg_SLC8A1_F	CACCGGCAGCCACTGACCAGCAAAG
ARNg_SLC8A1_R	AAACCTTTGCTGGTCAGTGGCTGCC
ARNg_SLC8A1_2_F	CACCGGCTGTTAGTCCCAACCACAA
ARNg_SLC8A1_2_R	AAACTTGTGGTTGGGACTAACAGCC
ARNg_SLC8A1_3_F	CACCGGTGCATCACGTAATCGAAAC
ARNg_SLC8A1_3_R	AAACGTTTCGATTACGTGATGCACC
ARNg_S1PR4_F	CACCGGAGCCGCGAAAGCTGTCCCT
ARNg_S1PR4_R	AAACAGGGACAGCTTTCGCGGCTCC
ARNg_S1PR4_2_F	CACCGCCACATGCGGTGCGGACGCT
ARNg_S1PR4_2_R	AAACAGCGTTCGCGACCGCATGTGGC
ARNg_S1PR4_3_F	CACCGGGTGATCTTCGCCGGCGTCC
ARNg_S1PR4_3_R	AAACGGACGCCGGCGAAGATCACCC
ARNg_LRP12_F	CACCGAGCAACGCAGACCTCCACCG
ARNg_LRP12_R	AAACCGGTGGAGGTCTGCGTTGCTC
ARNg_LRP12_2_F	CACCGGCAATCAATTGTCCATACGA
ARNg_LRP12_2_R	AAACTCGTATGGACAATTGATTGCC
ARNg_LRP12_3_F	CACCGCTAGCGGTACGATCTCAGCT
ARNg_LRP12_3_R	AAACAGCTGAGATCGTACCGCTAGC
ARNg_SMPD3_F	CACCGGCGACTGATGGTGTCTTCGG
ARNg_SMPD3_R	AAACCCGAAGACACCATCAGTCGCC
ARNg_SMPD3_2_F	CACCGAGGACAGCGCCATCCGGTGT
ARNg_SMPD3_2_R	AAACACACCGGATGGCGCTGTCCTC
ARNg_SMPD3_3_F	CACCGGCAGCATGTAGTCGATGCGC
ARNg_SMPD3_3_R	AAACGCGCATCGACTACATGCTGCC
ARNg_ESyt1_F	CACCGTTCGGTTGGGCAACACGAGGA
ARNg_ESYT1_R	AAACTCCTCGTGTTGCCCAACCGAC
ARNg_ESYT1_2_F	CACCGGGGTTAGATCCCCTAACAGC
ARNg_ESYT1_2_R	AAACGCTGTTAGGGGATCTAACCCC
ARNg_ESYT1_3_F	CACCGGATCACGTCCATTCTGTCTGA
ARNg_ESYT1_3_R	AAACTCGACAGAATGGACGTGATCC
ARNg_GPC1_F	CACCGCAAGAGCCGGAGCTGCGGCG

ARNg_GPC1_R	AAACCGCCGCAGCTCCGGCTCTTGC
ARNg_GPC1_2_F	CACCGGCTGTACACGCAGAACGCGA
ARNg_GPC1_2_R	AAACTCGCGTTCTGCGTGTACAGCC
ARNg_GPC1_3_F	CACCGAGCACATTTCCGGCAATAGTC
ARNg_GPC1_3_R	AAACGACTATTGCCGAAATGTGCTC

*La séquence du premier ARNg de chaque gène provient de la banque TKOv3 tandis que la séquence des autres ARNg a été déterminé en utilisant le site internet MIT CRISPR (<http://crispr.mit.edu:8079/>)

^Les lettres en gras représentent les séquences nécessaires pour le clonage dans le plasmide plentiCRISPRv2 digéré par BsmBI

Tableau 7: Liste des six autres couple d'ARNg utilisés pour inhiber les gènes d'intérêt identifiés par le crible avec la toxine ExlA

Nom	Séquences (5'→3')*
ARNg_HTR3C_F	CACCGAATGACTTGCTCCCTGCCAG
ARNg_HTR3C_R	AAACCTGGCAGGGAGCAAGTCATTC
ARNg_HTR4_F	CACCGTCATAGACTACACTGTCCCT
ARNg_HTR4_R	AAACAGGGACAGTGTAGTCTATGAC
ARNg_OR2AG1_F	CACCGCATGCACTATCCCTTCTGCA
ARNg_OR2AG1_R	AAACTGCAGAAGGGATAGTGCATGC
ARNg_OR2B2_F	CACCGACTAACAGAATGAACTCCTG
ARNg_OR2B2_R	AAACCAGGAGTTCATTCTGTAGTC
ARNg_SCUBE1_F	CACCGACGAGTGCATCAACATCCCG
ARNg_SCUBE1_R	AAACCGGGATGTTGATGCACTCGTC
ARNg_WLS_F	CACCGTGGCCCATGAAAGAGTACCA
ARNg_WLS_R	AAACTGGTACTCTTTCATGGGCCAC

*La séquence des ARNg de chaque gène provient de la banque TKOv3. Les lettres en gras représentent les séquences nécessaires pour le clonage dans le plasmide plentiCRISPRv2 digéré par BsmBI

2- Préparation des particules lentivirales contenant les ARNg

Les paires d'oligonucléotides correspondant aux ARNg enrichis ciblant les gènes sélectionnés (**Tableaux 6 et 7**) ont été annelées et clonées dans le vecteur pLentiCRISPRv2 digéré par BsmBI. Ensuite, comme décrit dans la publication (**Résultats et Discussion – Chapitre 1B**), des particules lentivirales contenant les plasmides recombinants ont été créées en utilisant les cellules HEK293T et les plasmides psPAX2 et pMD2.G. De même, des lentivirus contenant le vecteur pLentiCRISPRv2 sans ARNg ont été produits et appelés vecteur vide.

D-Production de cellules déficientes pour les gènes d'intérêt

Dans un premier temps, les ARNg du **Tableau 6**, ciblant le même gène ont été concentrés ensemble en utilisant le kit « Lenti-X Concentrator » (Clontech, #631231). La concentration est obtenue en mélangeant 2 mL des surnageants lentiviraux de chacun des ARNg avec 2 mL du réactif de ce kit. La solution est incubée sur la nuit à 4°C, avant d'être centrifugée à 1 500 g pendant 45 min à 4°C. Le culot obtenu est alors resuspendu avec 800 µL de DMEM supplémenté avec 10% de SVF. Les cellules A549 sont alors été incubées, dans un second temps, avec cette solution lentivirale. Pour chaque condition, $2,6 \cdot 10^6$ de cellules sontensemencées dans une boîte de 10 cm avec du DMEM contenant 10% de SVF et $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de polybrène. La solution lentivirale correspondant au mélange des ARNg est ajoutée et les cellules sont incubées pendant 24 h. Les cellules transfectées sont ensuite sélectionnées en remplaçant le milieu de culture par du DMEM complet contenant $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de puromycine. La même procédure a été appliquée pour inactiver chacun des gènes du **Tableau 7**.

E- Test de cytotoxicité des cellules mutées

Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de SVF et incubées à 37°C et 5% de CO₂. Les cellules ont étéensemencées 48 h avant l'infection, dans une plaque à 96 puits avec $1,5 \cdot 10^4$ de cellules par puits. Une heure avant l'infection, le Syto24 a été ajouté au milieu à 0,5 µM pour marquer les noyaux cellulaires, puis le milieu a été retiré et remplacé par du DMEM supplémenté avec 1 µM d'iodure de propidium (IP). Les cellules ont ensuite été infectées avec des souches exprimant la toxine ExIA ($\text{OD}_{600}=1$) aux MOI indiquées. La cinétique d'incorporation de l'IP, représentatif de l'état nécrotique des cellules, a été en suivit en mesurant la fluorescence (excitation 544 nm / émission 590 nm) toutes les 15 min, avec le Fluoroskan Ascent FL2.5 (Thermo Corporation), pendant 7h à 37°C. Pour prendre en compte la population cellulaire totale et normaliser les données d'incorporation d'IP, chaque mesure d'intensité a été divisée par l'intensité initiale du Syto24.

Chapitre 3

Protocoles pour le test ELISA

A-ELISA direct avec les anticorps polyclonaux

Dans chaque puits d'une plaque 96 Nunc-MaxiSorp, 100 μL d'une solution de PBS contenant 6M d'urée et la toxine Ex1A à 10 ou 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ont été déposés. Cette plaque a été incubée sur la nuit à 4°C. Après aspiration du milieu, trois lavages successifs avec 300 μL de tampon de lavage (Tween20 dilué à 0,05% dans du PBS) par puit ont été réalisés. Ensuite une solution de saturation (BSA 1%) a été ajoutée à raison de 200 μL par puit et la plaque a été incubée 1h à température ambiante avec une agitation de 500 tr/min. Comme précédemment, trois lavages successifs ont été effectués puis 100 μL d'une solution d'anticorps de détection ont été ajoutés par puit. Cet anticorps est dilué dans la solution de saturation à la concentration correspondante. La plaque a été de nouveau incubée pendant 2h à température ambiante et sous une agitation de 500 tr/min. L'anticorps secondaire conjugué avec l'enzyme HRP, a été ajouté après des lavages, à raison de 100 μL par puit. Ces anticorps secondaires sont les anticorps anti-lapin-HRP et anti-souris-HRP dilués au 1 :5000 dans la solution de saturation. La plaque a alors été incubée comme précédemment. Finalement, 100 μL de substrat TMB par puit ont été ajoutés après les lavages pour révéler la présence de la toxine. Le réactif a été incubé au moins 15 min dans l'obscurité à température ambiante et sous une agitation de 500 tr/min, jusqu'à l'apparition d'une coloration bleue. La réaction a alors été stoppée en ajoutant 100 μL de H_2SO_4 2N directement dans les puits. Pour finir, l'intensité de la coloration a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (SAFAS MP96) à 490 nm.

B-ELISA en sandwich avec les anticorps polyclonaux et monoclonaux

Le protocole est le même que précédemment, excepté qu'au préalable, les puits de la plaque 96

ont été coatés sur la nuit à 4°C avec l'anticorps polyclonal, dilué dans un tampon de Coating. Ce tampon se compose, pour 1L, de 1,59 g de Na₂CO₃ et 2,93 g de NaHCO₃. Puis les puits ont été saturés 1h à l'aide de la solution de saturation, avant que l'antigène ne soit ajouté à la concentration indiquée pendant 2h à température ambiante et sous agitation. Les anticorps monoclonaux sont utilisés en tant qu'anticorps de détection.

C- Caractéristiques des expectorats de patients infectés

Tableau 8: Liste des prélèvements respiratoires

	Type d'échantillon	Séquences (5'→3') *
1	Broncho-aspiration	<i>P. aeruginosa</i> + <i>Serratia marcescens</i> : 10 ⁴ UFC.mL ⁻¹
2	Broncho-aspiration	Flore non pathogène
3	Broncho-aspiration	<i>S. aureus</i> 10 ⁶⁻⁷ UFC.mL ⁻¹
4	Aspiration endo-trachéale	Numération bactérienne inférieure à 10 ⁵ UFC.mL ^{-1*}
5	Crachats	Numération bactérienne inférieure à 10 ⁷ UFC.mL ^{-1Δ}
6	Crachats	<i>Moraxella catarrhalis</i> 10 ⁷ UFC.mL ⁻¹

*Seuil de significativité dans les aspirations endo-trachéales

ΔSeuil de significativité dans les expectorations

Annexes

Annexe 1: Liste des participations à des événements scientifiques

- Participation à un mini colloque *Pseudomonas* en septembre 2018
- Participation et présentation de ma thèse lors du Bacto-GRE le 17 Avril 2019 au CEA de Grenoble
- Participation à la 12^{ème} journée scientifique de l'IBS le 13 Juin 2019 et présentation d'un poster
- Participation à la Journée Annuelle des Doctorants organisée par l'EDCSV en Juin 2019 et présentation d'un poster : 1^{er} prix
- Participation et présentation de ma thèse lors du « Mini-Colloque *Pseudomonas* 2019 » les 23-24 Septembre 2019 à Voiron

Annexe 2: Poster présenté à la 12^{ème} journée scientifique de l'IBS - Juin 2019 (Grenoble)

Identification of a new eukaryotic factor essential for the toxicity of the most cytotoxic effector of *Pseudomonas aeruginosa*

Vincent Deruelle, Stéphanie Bouillot, Viviana Job, Ina Attrée, and Philippe Huber

Bacterial Pathogenicity and Cellular Responses Team (CEA/IRIG/BCI, INSERM U1036, CNRS ERL5261, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France, France)

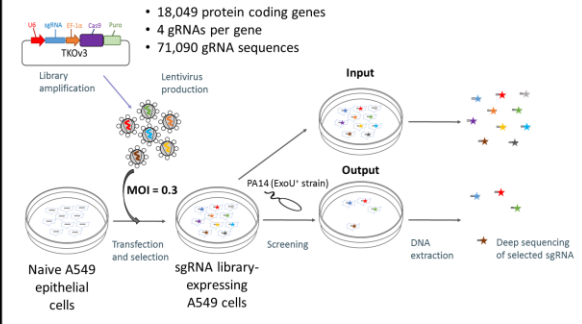
Contact : vincent.deruelle@cea.fr / phuber@cea.fr

INTRODUCTION

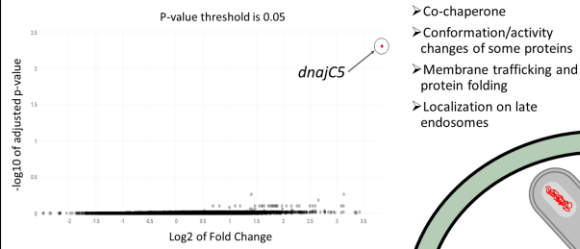
Pseudomonas aeruginosa is an ubiquitous and opportunistic Gram-negative bacterium and a leading cause of nosocomial infections. It is responsible for acute and chronic infections thanks to a broad panel of virulence factors. The most aggressive is a Type III Secretion System (T3SS), a syringe-like apparatus, that injects four effectors named exoenzymes S, T, U and Y directly into the cytosol of target cells. Among these effectors, ExoU is highly cytotoxic owing to its capacity to induce cell necrosis. Indeed, ExoU leads to plasma membrane rupture in infected cells. However, its mechanisms of action are poorly characterized.

- We used a genetic approach with the CRISPR/Cas9 system to identify the host partners involved in ExoU toxicity.
- Further work confirmed that a new eukaryotic protein is essential to trigger ExoU toxicity in target cells

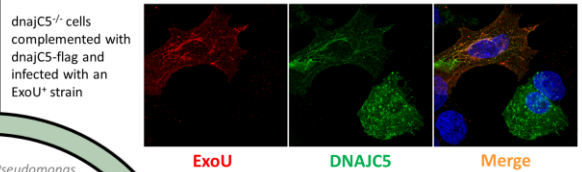
CRISPR screen with ExoU toxin on A549 cells



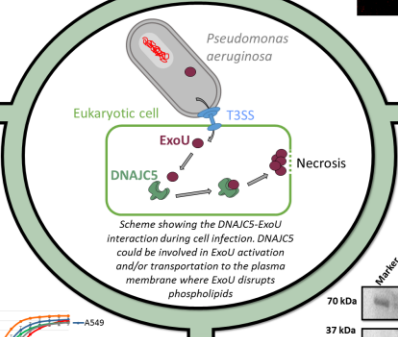
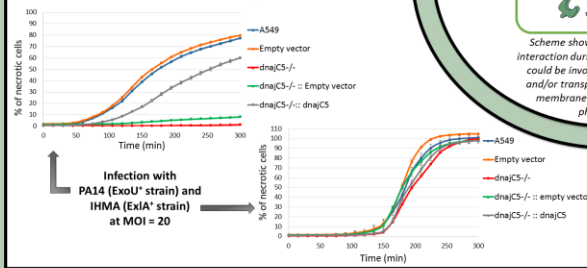
1 Only one gene was significantly enriched after the screen



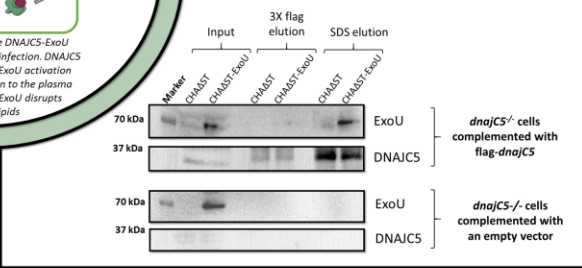
3 Co-localization between ExoU toxin and DNAJCS in infected A549 cells



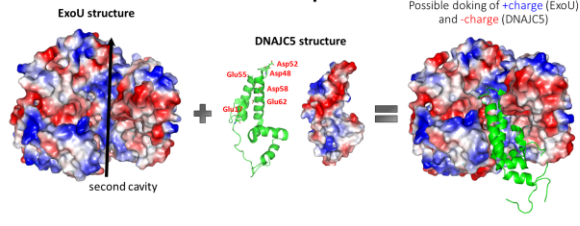
2 *dnajC5*^{-/-} cells are resistant to ExoU toxicity



4 ExoU co-immunoprecipitated with DNAJCS



5 Model of interaction between ExoU toxin and DNAJCS protein



Conclusion

- We identified a new host partner involved in ExoU toxicity during cell infection.
 - There is no ExoU-dependent necrosis in inactivated *dnajC5*-cells during ExoU infection
 - The complementation of *dnajC5*-mutant cells leads to the recovery of cell sensitivity to ExoU
 - DNAJCS is a specific partner of ExoU because *dnajC5*-KO cells are still sensitive to other major *P. aeruginosa*'s toxins.
 - ExoU binds directly to DNAJCS in cell cytoplasm during the infection.
- We now aim at deciphering the exact role of DNAJCS in ExoU toxicity: is it an activator of the toxin or its transporter to the plasma membrane?



Ce poster a également été présenté lors la Journée Annuelle des Doctorants (JAD) de l'École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant (EDCSV) en Juin 2019, et a obtenu le prix du meilleur poster.

Annexe 3: Résumé pour la présentation du poster lors de la JAD de l'EDCSV – Juin 2019 (Grenoble)

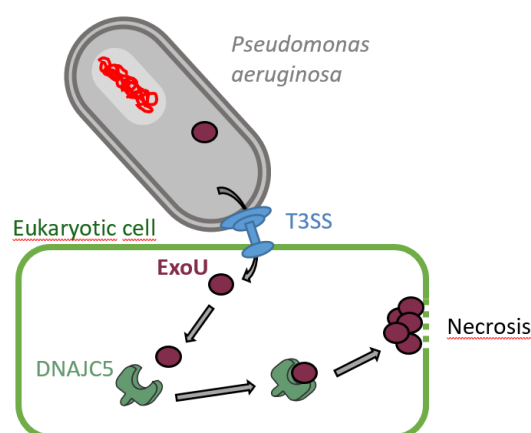
DNAJC5 is required for ExoU toxicity during *Pseudomonas aeruginosa* infections

Vincent Deruelle^a, S. Bouillot^a, I. Attrée^a and P. Huber^a

^a *Bacterial Pathogenicity and Cellular Responses (IRIG/BCI, Université Grenoble Alpes, France)*

Pseudomonas aeruginosa is an ubiquitous and opportunistic Gram-negative bacterium and a leading cause of nosocomial infections. The bacterium causes acute and chronic infections and is a major contributor of lung infections especially in people with cystic fibrosis. It possesses a Type III secretion system (T3SS) whose expression is related to poor clinical outcomes. This system injects directly into the cytosol of target cells, four effectors named exoenzymes S, T, U and Y. Among these effectors, ExoU is the highly cytotoxic and its secretion is associated with the most severe diseases, owing to its capacity to induce cell necrosis. However, its mechanisms of action are poorly characterized and we used a genetic approach with the CRISPR/Cas9 system to identify the host partners involved in ExoU toxicity. We identified DNAJC5, a co-chaperone protein involved in membrane trafficking and protein folding, as potential receptor for ExoU. We demonstrated that there is no ExoU-dependent necrosis in inactivated DNAJC5 cells during ExoU infection, suggesting that those cells are resistant to plasma membrane rupture caused by ExoU. Moreover, DNAJC5 seems to be a specific partner of ExoU because DNAJC5-KO cells are still sensitive to other major *P. aeruginosa*'s toxins. We now aim at exploring the potential DNAJC5-ExoU interaction and at deciphering the exact role of DNAJC5 in ExoU toxicity: is it an activator of the toxin or its transporter to the plasma membrane?

Scheme showing the DNAJC5-ExoU interaction during cell infection. DNAJC5 could be involved in ExoU activation and/or transportation to the plasma membrane where ExoU disrupts phospholipids.



Keywords: [ExoU] [DNAJC5] [CRISPR/Cas9]

Annexe 4: Communication orale lors du « Mini-Colloque Pseudomonas 2019 » - Septembre 2019 (Voiron)

DNAJC5, un nouveau facteur eucaryote essentiel au mécanisme d'action de la toxine ExoU de *Pseudomonas aeruginosa*

Vincent Deruelle^a, Stéphanie Bouillot^a, Viviana Job^a, Michel Ragno^a, Ina Attrée^a et Philippe Huber^a

^a *Bacterial Pathogenicity and Cellular Responses (IRIG/BCI, Université Grenoble Alpes, France)*

Mots clés: [ExoU] [DNAJC5] [CRISPR/Cas9]

Pseudomonas aeruginosa possède un large panel de facteurs de virulence dont le plus agressif est le système de sécrétion de type III (SST3). Il s'agit d'un appareil semblable à une seringue qui injecte quatre effecteurs nommés exoenzymes S, T, U et Y directement dans le cytosol des cellules cibles. Les effecteurs ExoS et ExoY sont sécrétés par la plupart des souches possédant un SST3, alors qu'ExoS et ExoU sont produites de façon exclusive. Bien que les souches exprimant la toxine ExoU représentent un tiers des isolats cliniques, ExoU est l'effecteur le plus cytotoxique et sa sécrétion est associée aux infections les plus sévères. Cette toxine induit la rupture de la membrane plasmique des cellules cibles grâce à son activité phospholipase, mais son mécanisme d'activation reste encore mal caractérisé. Au cours de mon projet, nous avons utilisé une approche génétique avec le système CRISPR-Cas9 afin d'identifier de nouveaux partenaires cellulaires nécessaires à sa toxicité. Nous avons identifié un seul gène, codant pour DNAJC5, une co-chaperone impliquée dans le trafic membranaire et le repliement des protéines. Nous avons confirmé, dans des modèles cellulaires, qu'une inactivation du gène *dnajC5* abolissait la cytotoxicité d'ExoU. Une réintroduction du gène *dnajC5* dans ces cellules a permis de ré-induire la toxicité dépendante d'ExoU. Nous avons également constaté que les drosophiles dépourvues de DNAJC5 résistaient mieux à la virulence des souches ExoU⁺. Il semble également que DNAJC5 soit un partenaire spécifique d'ExoU, car les cellules mutées sont toujours sensibles aux autres toxines majeures de *P. aeruginosa* (ExoS, ExoT, ExlA). Nous avons ainsi démontré que DNAJC5 était un partenaire cytoplasmique indispensable pour la toxicité d'ExoU, qui n'avait pas été identifié jusqu'à présent.

Annexe 5: Article présentant l'activation de l'inflammasome par Ex1A



RESEARCH ARTICLE

WILEY

Inflammasome activation by *Pseudomonas aeruginosa*'s ExlA pore-forming toxin is detrimental for the host

Stéphanie Bouillot¹ | Stéphane Pont¹ | Benoit Gallet² | Christine Moriscot² | Vincent Deruelle¹ | Ina Attrée¹ | Philippe Huber¹

¹Unité de Biologie Cellulaire et Infection, CEA, INSERM, CNRS, Université Grenoble-Alpes, Grenoble, France

²Institut de Biologie Structurale, CEA, CNRS, Université Grenoble-Alpes, Grenoble, France

Correspondence

Philippe Huber, IRIG-BCI, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France. Email: phuber@cea.fr

Funding information

Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Numbers: ANR-10-INSB-05-02, ANR-15-CE11-0018-01, ANR-17-EURE-0003; Fondation pour la Recherche Médicale, Grant/Award Number: DEQ20170336705

Abstract

During acute *Pseudomonas aeruginosa* infection, the inflammatory response is essential for bacterial clearance. Neutrophil recruitment can be initiated following the assembly of an inflammasome within sentinel macrophages, leading to activation of caspase-1, which in turn triggers macrophage pyroptosis and IL-1 β /IL-18 maturation. Inflammasome formation can be induced by a number of bacterial determinants, including Type III secretion systems (T3SSs) or pore-forming toxins, or, alternatively, by lipopolysaccharide (LPS) via caspase-11 activation. Surprisingly, previous studies indicated that a T3SS-induced inflammasome increased pathogenicity in mouse models of *P. aeruginosa* infection. Here, we investigated the immune reaction of mice infected with a T3SS-negative *P. aeruginosa* strain (IHMA879472). Virulence of this strain relies on ExlA, a secreted pore-forming toxin. IHMA879472 promoted massive neutrophil infiltration in infected lungs, owing to efficient priming of toll-like receptors, and thus enhanced the expression of inflammatory proteins including pro-IL-1 β and TNF- α . However, mature-IL-1 β and IL-18 were undetectable in wild-type mice, suggesting that ExlA failed to effectively activate caspase-1. Nevertheless, caspase-1/11 deficiency improved survival following infection with IHMA879472, as previously described for T3SS+ bacteria. We conclude that the detrimental effect associated with the ExlA-induced inflammasome is probably not due to hyperinflammation, rather it stems from another inflammasome-dependent process.

KEYWORDS

microbial-cell interaction, pseudomonads, toxins, virulence

1 | INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen which exploits several virulence factors to achieve infection of various organs (Gellatly & Hancock, 2013; Hauser, 2009; Williams, Dehnstiel, & Blackwell, 2010). One of its most potent virulence factors is its type 3 secretion system (T3SS) through which it delivers several effectors (ExoS, ExoT, ExoY and ExoU) into the cytoplasm of target cells. Most strains also display a flagellum, type 4 pili, and LPS at their surface, collectively called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)

These PAMPs can trigger the innate immune system (Hayward, Mathur, Ngo, & Man, 2018) through binding to toll-like receptors (TLRs) located at the surface of sentinel macrophages or dendritic cells. TLR triggering induces the synthesis of a large number of proteins, including inflammatory cytokines such as the IL-1 β precursor (pro-IL-1 β), and components of the inflammasome complex (see below).

In addition, the T3SS machinery per se, by forming a pore in the macrophage plasma membrane, can activate an intracellular sensor of innate immunity, the NOD-like receptor (NLR) family CARD domain

containing 4 (NLRC4) (Hayward et al., 2018; Man & Kanneganti, 2016). The NLRC4-associated inflammasome is a multiprotein complex which activates IL-1 β and IL-18 by inducing their cleavage by caspase-1, and their release into the extracellular milieu following plasma membrane rupture, as a result of a cell death process called pyroptosis. Noncanonical inflammasome activation has also been described for Gram-negative bacteria. This process involves caspase-11, which can directly trigger pyroptosis and indirectly induce IL-1 β /IL-18 cleavage through activation of the NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3)-associated inflammasome. The resulting IL-1 β (and to a lesser extent IL-18) secretion contributes significantly to enhancing the inflammatory response during its initial phases. The immune reaction is subsequently amplified by several other pro-inflammatory cytokines and chemokines secreted by immune and non-immune cells, a process referred to as a 'cytokine storm', which leads to recruitment of circulating neutrophils to the infected organ (Garlanda, Dinarello, & Mantovani, 2013; Potey, Rossi, Lucas, & Dorward, 2019).

In general, infection with *P. aeruginosa* strains leads to a massive recruitment of neutrophils. In *P. aeruginosa*-induced pneumonia, a high number of neutrophils penetrates the alveoli and accumulates in the bronchi, where they actively combat invading bacteria. However, *P. aeruginosa* is generally well adapted to hyperinflamed environments and can thrive in this bacteriocidal milieu by adapting its metabolism. The mechanisms deployed include producing a protective biofilm and injecting T3SS effectors into neutrophils. These effectors can block phagocytosis, inhibit reactive oxygen species (ROS) production, and induce apoptosis (ExoS and ExoT) (Rangel, Logan, & Hauser, 2014; Sun, Karmakar, Taylor, Rietsch, & Pearlman, 2012; Vareechon, Zmina, Karmakar, Pearlman, & Rietsch, 2017) or necrosis (ExoU) (Diaz et al., 2008).

Although the inflammatory reaction remains the main weapon against *P. aeruginosa* in acute infections, several groups have demonstrated that it may also be deleterious for the host (Cohen & Prince, 2013; Faure et al., 2014; Schultz et al., 2002; Thakur, Barrett, Hobden, & Hazlett, 2004; Thakur, Barrett, McClellan, & Hazlett, 2004; Veliz Rodriguez et al., 2012). By using mice deficient in various inflammasome proteins, including caspase-1 and caspase-11, inhibitors of IL-1 β , or genetically deficient mice for components of the IL-1 β pathway, these groups showed that inactivating the inflammasome or preventing IL-1 β action diminished the severity of disease in infected mice. However, contradictory data have been published in the literature regarding the role of the inflammasome in bacterial clearance, possibly owing to the genetic and phenotypic diversity of *P. aeruginosa* strains (Lin & Kazmierczak, 2017).

In recent years, our group and others have identified phylogenetic outliers of *P. aeruginosa* phylum, that were named PA7-like strains, in reference to the first fully sequenced isolate of the group, PA7 (Roy et al., 2010). PA7-like strains have now been isolated worldwide from patients with acute or chronic infections affecting a range of organs (Freschi et al., 2018; Reboud et al., 2016). Several features distinguish PA7-like strains from 'classical' *P. aeruginosa* strains, including their lack of the whole locus encoding the T3S machinery and genes for the

T3SS effectors (Elsen et al., 2014). The pathogenicity of these strains is mainly based upon a two-partner secretion system, ExlB–ExlA, which is only found in PA7-like strains. ExlA (also called Exolysin) is a pore-forming toxin inducing necrosis in several mammalian cell types, and ExlB is the transporter located in the bacterial outer membrane that allows ExlA secretion into the extracellular medium (Basso, Ragno, et al., 2017; Reboud et al., 2016). Some of these strains are highly cytotoxic, a property that has been correlated with the amounts of ExlA secreted (Reboud et al., 2016). However, strain virulence in a mouse model of acute pneumonia was not directly linked to their toxicity towards cells nor to the amount of ExlA secreted (Reboud et al., 2016), suggesting that the immune reaction in response to the various PA7-like strains could differ.

Further work from our group revealed that the pore formed in the plasma membrane by ExlA can activate the NLRP3 inflammasome *in vitro*—whereas classical strains activate the NLRC4 inflammasome—leading to macrophage pyroptosis and IL-1 β secretion (Basso, Wallet, et al., 2017). Activation of the NLRP3 rather than the NLRC4 inflammasome may lead to different outcomes, as suggested by Iannitti et al. (2016). In this article, we studied the immune reaction induced in mice infected with an *exlA*+ strain that can trigger IL-1 β secretion from macrophages. More specifically, we evaluated the effect of inflammasome inactivation on mouse survival and the response to infection.

2 | RESULTS

2.1 | Inflammasome activation in macrophages by *exlA*+ strains

The capacity of bacteria to trigger inflammasome assembly and IL-1 β release by resident macrophages has a major impact on the host response to infection (Garlanda et al., 2013; Wonnemberg et al., 2016). We therefore investigated inflammasome induction following exposure to several *exlA*+ strains by analysing levels of pro (p)- and mature (m)-IL-1 β produced by infected macrophages. Mouse bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were infected with 15 different *exlA*+ strains and the m-IL-1 β content of cellular lysates and supernatants was analysed at 3.5 hr post-infection (hpi) by Western blotting (Figure 1a). Pro-IL-1 β expression is induced by all *exlA*+ strains (except ATCC33359) at different levels, but they are all less efficient than the reference strain PAO1, an *exlA*– T3SS+ strain (ExoSTY+). In contrast, another *exlA*– T3SS+ (ExoUTY+) reference strain, PA14, was a poor inducer of p-IL-1 β , indicating that T3SS+ strains also differentially stimulate IL-1 β synthesis. m-IL-1 β was only detectable when cells were infected with IHMA567230, IHMA879472, or BLO43, however the signals were much less intense than observed following infection with PAO1. The profiles of IL-1 β contents in supernatants were confirmed by ELISA (Figure 1b). It should be noted that the small discrepancies between the Western blot and the ELISA data are likely due to the fact that the ELISA technique does not distinguish between the different forms of IL-1 β .

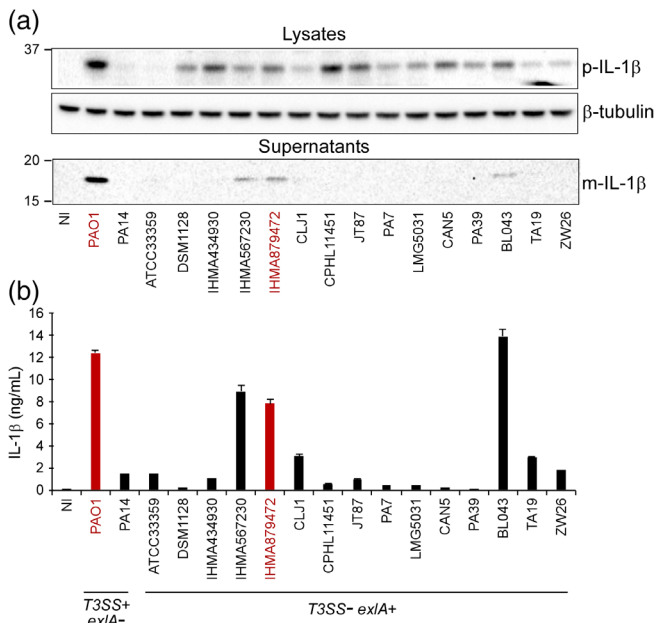


FIGURE 1 IL-1 β secretion in culture supernatants from infected BMDM. BMDMs were incubated with 15 T3SS– *exlA*+ strains, or T3SS+ *exlA*– strains (PAO1 and PA14) at MOI 10, or were left NI. Culture media and cell lysates were collected at 3.5 hpi. (a) Both the lysates (above) and the supernatants (below) were assayed for IL-1 β (either pro: p or mature: m) by Western blot. β -tubulin was used as loading control for the lysates. (b) IL-1 β concentrations in the supernatants assayed by ELISA. This analysis was performed twice. Strains used in subsequent studies are indicated in red. BMDM, bone marrow-derived macrophage; NI, non-infected

Altogether, there is no correlation between priming (induction of expression) and secretion of the mature form of IL-1 β . In conclusion, secretion of the active form of IL-1 β is more related to the capacity of *exlA*+ strains to activate the inflammasome than to induce its expression.

IL-18 is another interleukin processed by the inflammasome and secreted after macrophage pyroptosis (Hayward et al., 2018; Man & Kanneganti, 2016). IL-18 was not detected by Western blot in any supernatants of BMDMs infected by *exlA*+ strains (data not shown), suggesting that IL-18 is not involved in the immune response to these types of strains; a result that was confirmed *in vivo* (see below).

To combine virulence and m-IL-1 β response, we selected strain IHMA879472 (hereafter IHMA) for further investigation.

2.2 | Inflammasome activation is detrimental for mice infected with the IHMA strain

As mentioned above, several reports indicated that in mouse pneumonia models involving T3SS+ strains (either ExoS+ or ExoU+), survival was enhanced by inhibiting inflammasome induction (Cohen & Prince, 2013; Faure et al., 2014; Schultz et al., 2002; Thakur, Barrett, Hobden, & Hazlett, 2004; Thakur, Barrett, McClellan, & Hazlett, 2004; Veliz Rodriguez et al., 2012). To examine the impact of inflammasome

induction by IHMA (*exlA*+), we infected WT and caspase-1/caspase-11 KO (hereafter KO) mice by inhalation of a bacterial suspension. The KO mice used for this study induce neither conventional nor unconventional activation of IL-1 β , and cannot trigger pyroptosis (Basso, Wallet, et al., 2017). As with T3SS+ strains, mice lacking *caspase-1/caspase-11* genes survived significantly better than WT animals following infection with IHMA (Figure 2a), indicating that NLRP3-inflammasome activation is also detrimental in mice infected with an *exlA*+ strain. Mice (either WT or KO) infected with IHMA Δ *exlA* (IHMA Δ) strain all survived, indicating that ExlA is the major virulence factor deployed by IHMA *in vivo*.

Caspase-1 expression in WT lungs was strongly induced by IHMA and moderately by IHMA Δ (Figure 2b). This difference suggests that more inflammatory cells are recruited in lungs infected by IHMA than by IHMA Δ .

To directly assess the effects of IHMA on lung histology, infected mice were euthanized at 18 hpi and lung sections analysed by transmission electron microscopy (Figure 2c). Frequent interruptions of the pneumocytic lining of the alveoli (between arrowheads in Figure 2c) was observed in all mice (both WT and KO), confirming the cytolytic effect of IHMA (Basso, Wallet, et al., 2017). In contrast, no pneumocyte alteration was detected in IHMA Δ -infected lungs (WT or KO), confirming that pneumocyte disruption was caused by ExlA.

As disruption of the pneumocyte layer can affect permeability of the alveolo-capillary barrier, and to determine whether inflammasome inactivation affects this parameter, we measured the protein content of broncho-alveolar lavage (BAL) fluids (Figure 2d). Consistent with the histological data, IHMA-infected lungs were more permeable than those infected with IHMA Δ . Inactivation of *caspase-1/caspase-11* had no impact on permeability, indicating that the effect is a toxin-only effect. PAO1-infected mice showed a lower effect of this strain on barrier permeability, even though PAO1 is more virulent than IHMA *in vivo* (Reboud et al., 2016).

Pseudomonas aeruginosa exlA+ strains can potentially induce necrosis of different cell types in the lung: epithelial cells, when ExlA is secreted, macrophages, when pyroptosis is activated, and neutrophils, when neutrophil extracellular traps are produced by a process called NETosis (Delgado-Rizo et al., 2017). To further examine cell necrosis induced in infected lungs, BAL fluids were assessed to determine the β -actin (Figure 2e) and lactate dehydrogenase (LDH) (Figure 2f) levels. These two intracellular proteins are released after plasma membrane rupture. IHMA, and to a lower extent IHMA Δ , caused a significant increase in LDH activity. The difference in LDH activity between mice infected with IHMA and IHMA Δ strains was consistent with the degree of disruption of the pneumocytic lining observed in Figure 2c. The fact that IHMA Δ also induced some necrosis (Figure 2f) indicates that bacterial factors other than ExlA can trigger cell death, possibly by promoting neutrophil NETosis (see the confirmation below on isolated neutrophils), rather than macrophage pyroptosis, that requires ExlA activation of the inflammasome. Thus, our data suggest that IHMA is capable to induce both pneumocyte and neutrophil necrosis in the lung. PAO1 also induced necrosis in the

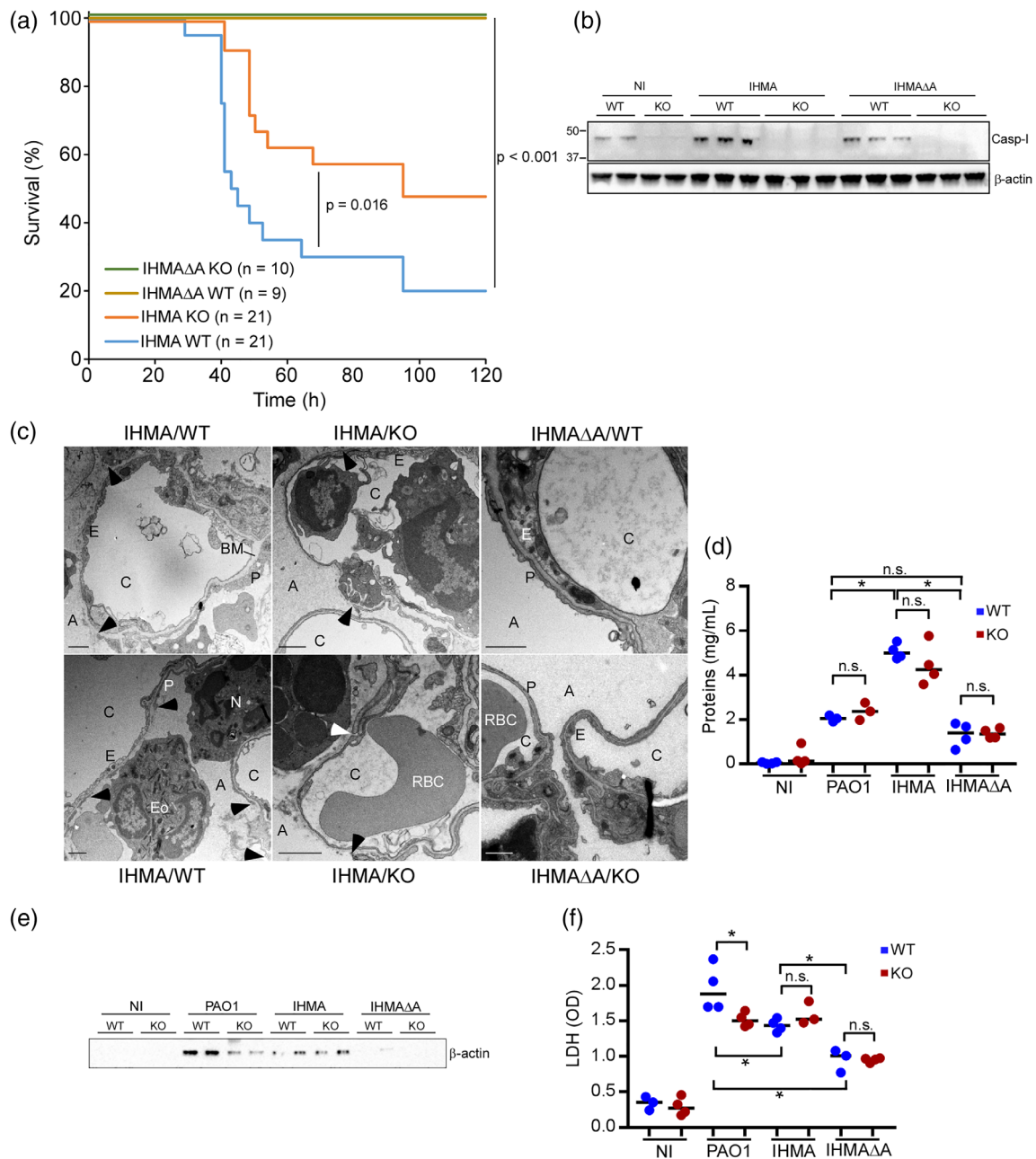


FIGURE 2 Infection of wild-type or caspase-1/caspase-11-deficient mice by IHMA or IHMAΔA. (a) Mice, either WT or caspase-1/caspase-11 deficient (KO), were infected intranasally with IHMA or IHMAΔA strains (10^7 bacteria), and their survival was monitored for 5 days. The number of mice per condition is indicated. Significance of differences between survival rates for WT and KO mice infected with IHMA, as well as differences in survival rates for WT mice infected with IHMA or IHMAΔA, were determined by the Log-Rank method, and the probability is shown on the graph. (b) Lung extracts were produced at 18 hpi and analysed by Western blotting using a caspase-1 antibody. β-actin was used as loading control. (c) Transmission electron micrographs of lung sections from IHMA- or IHMAΔA-infected mice (WT and KO) euthanized at 18 hpi. Two representative images are shown for IHMA/WT and IHMA/KO and one for IHMAΔA/WT and IHMAΔA/KO. Lack of pneumocytic coverage along alveoli is shown between arrowheads. A, alveolus; BM, basement membrane; C, capillary; E, endothelium; Eo, eosinophil; N, neutrophil; P, pneumocyte; RBC, red blood cell. (d) BALs were collected post-mortem from mice euthanized at 18 hpi ($n = 4$ per condition). Protein concentrations were measured and plotted; median values are shown (bars). Differences between WT and KO were not significant according to an unpaired *t* test. Differences between bacterial strains in WT mice were significant according to an ANOVA test; multiple comparisons were performed using a Tukey test, and the results are indicated by (*) or n.s. Differences were all significant compared to the NI condition (not shown). (e) β-actin contents in BALs was analysed by Western blot. (f) LDH activities were measured in BALs and plotted along with median values. Statistical analyses were performed as in (d). BAL, broncho-alveolar lavage; LDH, lactate dehydrogenase

lungs, partially due to pyroptosis, as both markers were higher in BAL fluids from WT than from KO animals.

In summary, taken together, our results indicate that IHMA has a major effect on pneumocyte and probably neutrophil cell death, whereas PAO1 mainly induces macrophage lysis.

2.3 | Bacterial growth and dissemination

Bacterial loads in lungs, liver and spleen were determined at 18 hpi to assess the role played by caspase-1/caspase-11 in the capacity of IHMA to proliferate in the lungs and to disseminate to distant organs (Figure 3). The bacterial amounts found in IHMA-infected lungs at 18 hpi were similar to the initial load (10^7), suggesting that IHMA did not thrive in lungs over this time period. In sharp contrast, the population of PAO1 (Figure 3) dramatically increased over the same time period. Conversely, the IHMA $\Delta\Delta$ bacterial load decreased, indicating that ExIA is required for sustained bacterial population of this organ, probably as it plays a role in IHMA's mechanisms of defence against the immune system. IHMA and PAO1 survived better in the presence of caspase-1/caspase-11 than in their absence, a feature previously observed for the T3SS⁺ strain PAK (Cohen & Prince, 2013).

In conclusion, IHMA appears to be less resistant than PAO1 to the immune system, probably because there is no equivalent of the T3SS effectors capable of preventing neutrophil bacteriocidal action.

As for PAO1, IHMA disseminated to the liver and spleen, whereas IHMA $\Delta\Delta$ remained confined to the lungs, confirming that ExIA is key for bacterial spread in the body (Bouillot et al., 2017), like the T3SS for classical strains (Allewelt, Coleman, Grout, Priebe, & Pier, 2000; Kudoh, Wiener-Kronish, Hashimoto, Pittet, & Frank, 1994; Rangel, Diaz, Knoten, Zhang, & Hauser, 2015; Shaver & Hauser, 2004; Vance, Rietsch, & Mekalanos, 2005).

2.4 | Mature-IL-1 β is undetectable in IHMA-infected lungs, but IL-1 α is highly produced

To assess IHMA's capacity to promote IL-1 β synthesis *in vivo*, we first used ELISA to measure the amounts of total IL-1 β (pro and mature) in

lung extracts (Figure 4a). For both IHMA- and IHMA $\Delta\Delta$ -infected lungs, there was a small non-significant increase in IL-1 β at 8 hpi; no difference was observed between WT and KO lungs. In contrast, at this time point, PAO1 had already induced a significant IL-1 β response in WT mice, but not in KO mice. This difference between mouse strains continued to 18 hpi. At this later time point, IL-1 β levels were also significantly increased in lungs infected with IHMA, and to a lower extent in those infected with IHMA $\Delta\Delta$, but again no difference between WT and KO mice was observed with these bacterial strains (Figure 4a). As only mature-IL-1 β produced upon caspase-1-dependent cleavage is active (Afonina, Muller, Martin, & Beyaert, 2015), we analysed lung extracts (18 hpi) by Western blot to discriminate between the two forms of IL-1 β (Figure 4b). Mature-IL-1 β was only detected in PAO1-infected WT mice, whereas strong pro-IL-1 β signals were detectable in all infected conditions. Taken together, we conclude that both IHMA and IHMA $\Delta\Delta$ can promote pro-IL-1 β expression via TLR activation, although not as early or as strongly as PAO1. The slight difference observed between IHMA- and IHMA $\Delta\Delta$ -infected lungs in the ELISA results suggests that ExIA contributes to the induction of pro-IL-1 β expression. However, no mature-IL-1 β was detected in IHMA-infected lungs, suggesting that ExIA is a poor inflammasome activator, or that NLRP3 is less efficient than NLRC4 when it comes to activating caspase-1. It should be noted that electrophoretic gels had to be overloaded to detect m-IL-1 β by Western blot in PAO1-infected lungs, indicating that only very small amounts of the mature form were present even for this strain, as previously reported (Galle et al., 2008). Thus, most of the pro-IL-1 β synthesized remained unused, and only minute amounts of active IL-1 β were detected following infection with PAO1, and any active IL-1 β produced following IHMA infection was at undetectable levels. However, extremely low amounts of IL-1 β is nevertheless sufficient to induce inflammatory reactions, as previously noted (Garlanda et al., 2013).

As for infected BMDM supernatants, IL-18 was at background levels in lung extracts when mice were infected with IHMA or IHMA $\Delta\Delta$ (Figure 4c), confirming that IL-18 does not play a role in the immune response to IHMA.

IL-1 α , an interleukin targeting the same receptor as IL-1 β (and thus triggering the same effects), but that does not require inflammasome

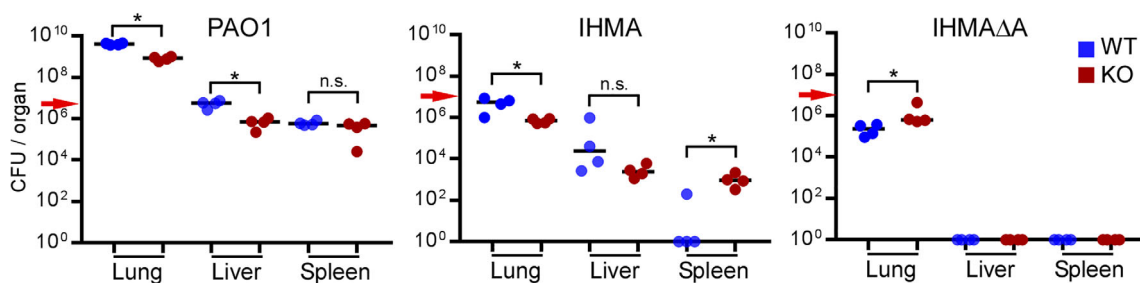


FIGURE 3 Bacterial growth in lungs and dissemination in liver and spleen. Mice infected with PAO1, IHMA or IHMA $\Delta\Delta$ were euthanized at 18 hpi, and their lungs, liver and spleen were homogenised. Serial dilutions of the homogenates were plated on LB plates for CFU counting. Data are shown with medians (bars). Statistical differences between WT and KO mice were calculated using a Mann-Whitney test. The red arrows indicate the initial bacterial load

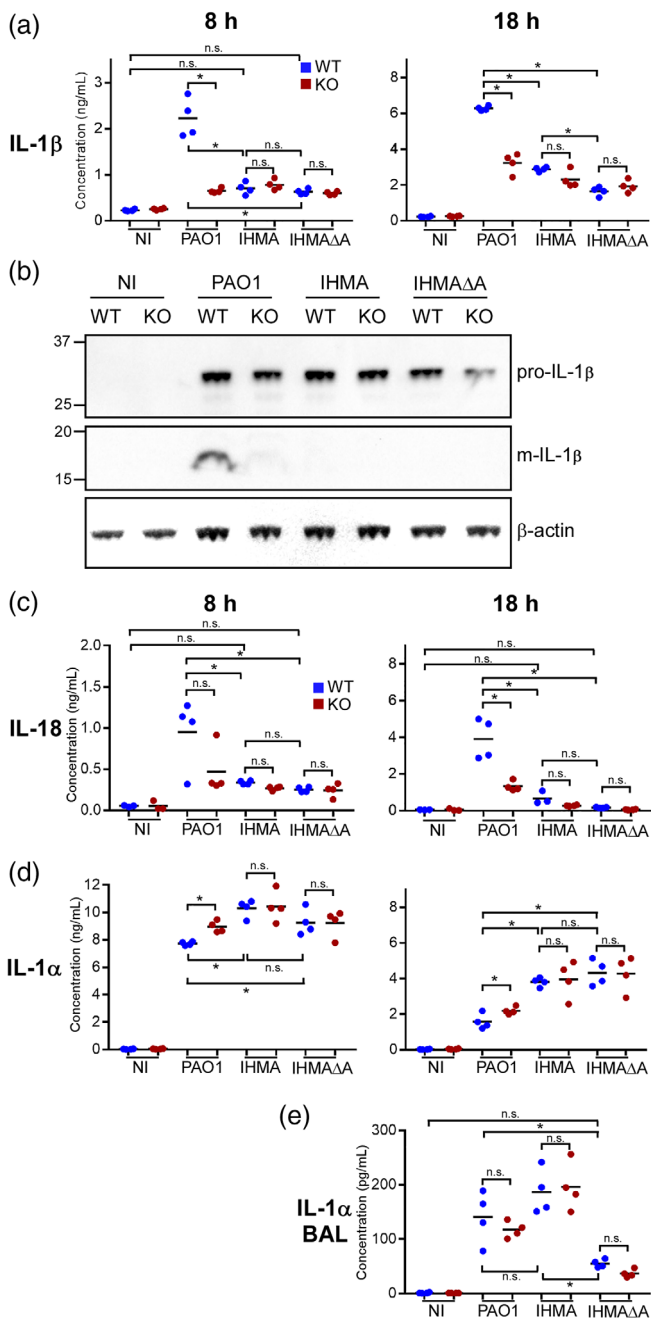


FIGURE 4 IL-1 β , IL-18 and IL-1 α production in infected lungs.

(a) IL-1 β concentration was measured by ELISA in lung extracts at 8 and 18 hpi. Results were plotted together with mean values (bars). (b) Lung extracts at 18 hpi were also analysed by Western blotting, using IL-1 β antibody and β -actin as control. Two gels were used: one for pro-IL-1 β / β -actin, and one for mature-IL-1 β . To detect mature-IL-1 β , gels were overloaded with protein, resulting in a distorted migration profile. (c) IL-18 concentration was measured by a bead-based immunoassay in lung extracts at 8 and 18 hpi. (d) IL-1 α concentration was measured by ELISA in lung extracts at 8 and 18 hpi. (e) IL-1 α concentration was measured by ELISA in BAL supernatants at 18 hpi. All statistical analyses (*t* test and ANOVA) were performed as described for Figure 2

activation, is rapidly and massively upregulated by IHMA and IHMA $\Delta\Delta$ strains, independent of the presence of caspase-1/caspase-11 as

expected (Figure 4d). IL-1 α was also detected in BAL supernatants from IHMA-infected mice (Figure 4e), showing that IL-1 α is indeed secreted and thus can interact with the IL-1 receptor (IL-1R). Likewise, IL-1 α production may compensate for the lack of substantial secretion of active IL-1 β and may trigger the production of secondary inflammatory cytokines, like IL-6, IL-17a and KC. Interestingly, IL-1 α contents of BAL supernatants from IHMA $\Delta\Delta$ -infected mice were significantly lower, suggesting that ExlA-dependent cell lysis was required for IL-1 α release.

2.5 | Induction of pro-inflammatory cytokines by IHMA

Several pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-17a and TNF- α) and a chemokine (KC) were significantly induced in IHMA-infected lungs. Levels of all inflammatory mediators except TNF- α were increased between 8 and 18 hpi.

The most striking increase was observed for IL-6, a cytokine involved in neutrophil maturation and recruitment (Figure 5). IL-6 levels were similar in PAO1- and IHMA-infected lungs, but were strikingly lower at 18 hpi in the absence of caspase-1/caspase-11. Furthermore, IHMA $\Delta\Delta$ failed to induce IL-6 expression in infected lungs at 18 hpi. Thus, ExlA is required for IL-6 expression, and both caspase-1/caspase-11-dependent and -independent pathways are involved.

Two other mediators of neutrophil recruitment—IL-17a and especially KC—were also induced by IHMA at 18 hpi, but at lower levels than with PAO1. Similar to our result for IL-6, caspase-1/caspase-11 deficiency was associated with lower IL-17a and KC levels, and their expression was negligible in IHMA $\Delta\Delta$ -infected lungs. Thus, in addition to ExlA, to enhance IL-6, IL-17a, and KC expression, the inflammasome must be activated. This conclusion is consistent with previous reports using other strains (Gasse et al., 2011; Rosales, 2018; Schultz et al., 2002; Slaats, Ten Oever, van de Veerdonk, & Netea, 2016).

TNF- α is another chemo-attractant for neutrophils that also facilitates their extravasation by acting on endothelial cells. TNF- α expression was found to be induced to similar levels in all infected conditions, regardless of strain type or mouse genetic background.

Taken together, our results show that IHMA-infected WT mice can mount an inflammatory cytokine response, which is mostly dependent on ExlA and partly on caspase-1/caspase-11 activation. As mentioned previously, massive IL-1 α production in IHMA-infected lungs is likely to provide the alarming signal triggering pro-inflammatory cytokine synthesis in the infected lungs.

Interestingly, the anti-inflammatory cytokine IL-10 was detected at 8 and 18 hpi in IHMA $\Delta\Delta$ -infected lungs, but not in IHMA-infected lungs. This result suggests that mice infected with the avirulent IHMA $\Delta\Delta$ strain were at a very early stage in the resolution phase of inflammation, a process characterised by IL-10 production. A similar increase in IL-10 levels was observed in PAO1-infected lungs at 18 hpi. The main difference between the two cases was that the increase was caspase-1/caspase-11-independent for IHMA $\Delta\Delta$ and caspase-1/caspase-11-dependent for PAO1, suggesting different mechanisms of activation.

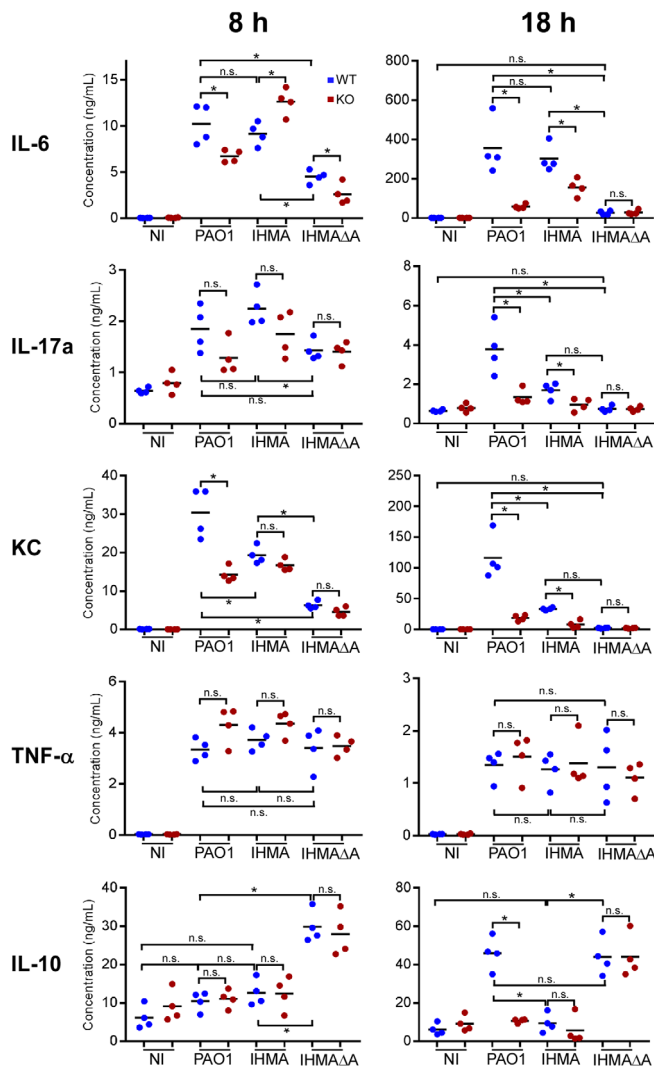


FIGURE 5 Additional inflammatory cytokines and chemokine in infected lungs. Levels of IL-6, IL-17a, KC, TNF- α and IL-10 in lung extracts at 8 and 18 hpi were measured by ELISA and plotted alongside mean values. Significance of differences between WT and KO data were calculated using an unpaired t test, or Mann-Whitney test when distribution was not normal (i.e. for IL-17a at 18 hpi, TNF- α at 18 hpi, IL-10 at 18 hpi). For all cytokines, differences between bacterial strains in WT mice were significant according to a one-way ANOVA test; multiple comparisons were performed using a Tukey's test and the results are indicated with a (*) or n.s. Differences were all significant relative to NI, unless indicated with n.s.

A diagram summarising our results related to cytokine production is presented in Figure 6.

2.6 | Blocking IL-1 receptor has no impact on IHMA-infected mouse survival

The differences in mouse survival observed in Figure 2a between WT and Caspase-1/caspase-11 KO mice infected by IHMA may be caused

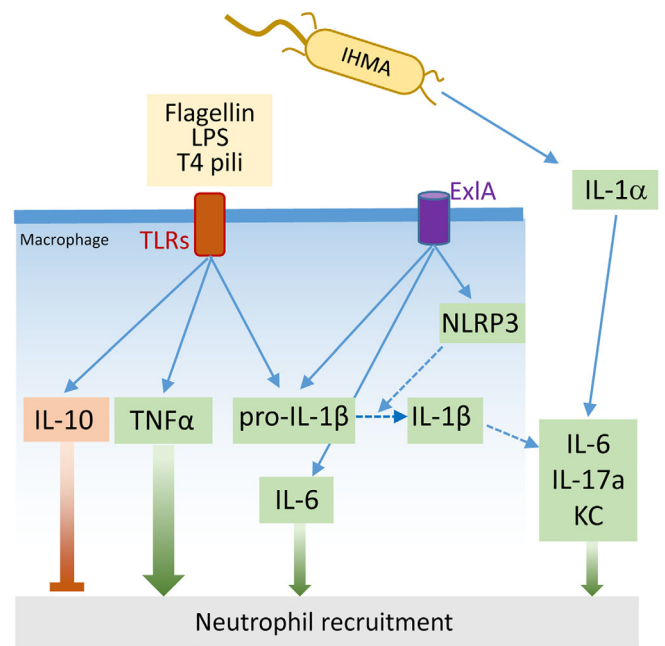


FIGURE 6 Proposed mechanisms of inflammatory cytokine activation by IHMA. The diagram summarises the main results from Figures 4 and 5. IHMA can activate TLR receptors at the surface of macrophages, via the release of flagellin, pili and LPS, in an ExIA-independent manner. TLR activation results in IL-10, TNF- α and pro-IL-1 β expression. ExIA has a strong and direct effect on IL-6 production, but only a small but significant impact on pro-IL-1 β expression. Production of mature IL-1 β by ExIA-induced NLRP3 inflammasome was not detected in vivo; the dotted lines indicate that IL-1 β activation was only observed in vitro. Conversely, IL-1 α expression was strongly upregulated by IHMA, which is likely responsible for enhancement of IL-6, IL-17a and KC synthesis

by the hyperinflammation-induced by pro-inflammatory cytokine secretion, as suggested by previous works (Cohen & Prince, 2013; Faure et al., 2014; Schultz et al., 2002; Thakur, Barrett, Hobden, & Hazlett, 2004; Thakur, Barrett, McClellan, & Hazlett, 2004; Veliz Rodriguez et al., 2012), or by the activation of the inflammasome itself, as recently reported (Wu et al., 2019). To discriminate between these two hypotheses, we used a pharmacological inhibitor of IL-1R, anakinra (Cavalli & Dinarello, 2018), in mouse infection assays. Mice were administered with anakinra (10 mg/kg), as previously reported (Norelli et al., 2018), 1 hr before infection, and then daily. We first examined anakinra efficiency on IL-6 production at 18 hpi (Figure 7a). Anakinra administration dramatically reduced IL-6 content of infected lungs compared to untreated mice. Next, we performed survival experiments on mice treated with anakinra or untreated (Figure 7b). The two survival curves were not significantly different. Hence, IL-1R blocking had no impact on mouse survival after IHMA infection. As IL-18 is not produced following IHMA infection (Figure 4c), these results suggest that the decrease in mouse death observed in absence of caspase-1/caspase-11 is not due to the lack of IL-1 β /IL-18 secretion, but to the absence of a functional inflammasome, per se.

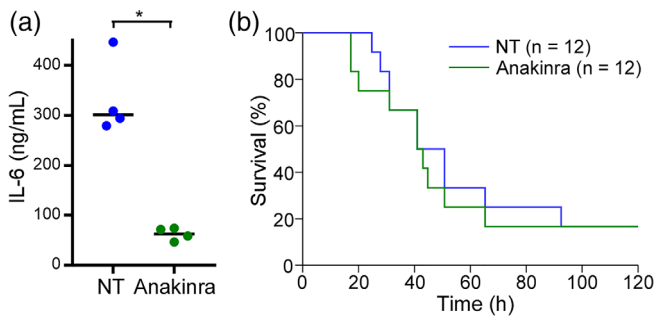


FIGURE 7 Effect of IL-1 receptor inhibition on mouse survival. (a) Mice were either treated with the IL-1 receptor inhibitor anakinra at 10 mg/kg or untreated ($n = 4$ in each condition), and infected by IHMA 1 hr later. Mice were euthanized at 18 hpi, IL-6 concentrations were measured in lung extracts and represented together with the median. Statistical differences were calculated with Student's t test; $*p < .0001$. (b) Mice were either untreated or treated with anakinra (10 mg/kg 1 hr before infection and then daily), and infected with IHMA. Shown is the Kaplan–Meyer representation of the survival curves in each condition. No statistical difference was obtained with the Log-Rank test

2.7 | Neutrophil recruitment and activity in IHMA-infected lungs

Having shown that IHMA-induced a pro-inflammatory cytokine response, we next monitored the presence of neutrophils in infected lungs by assaying myeloperoxidase (MPO) activity in lung extracts (Figure 8a). MPO activity was increased to a similar extent in all infected WT mice as early as 8 hpi. Caspase-1/caspase-11 deficiency significantly altered neutrophil recruitment in IHMA- and PAO1-infected lungs. At 18 hpi, MPO activity was increased approximately 10-fold over baseline in all infected conditions. For IHMA, neutrophil infiltration was increased due to the presence of both ExIA and caspase-1/caspase-11. PAO1 yielded a significantly higher response than IHMA, but the increase was not significantly different in animals lacking caspase-1/caspase-11.

From these results, we conclude that IHMA can trigger neutrophil recruitment almost in the same range as PAO1, and although the presence of ExIA and caspase-1/caspase-11 both contribute to this process, they are not absolutely required, as high MPO activities were also detected in IHMA $\Delta\Delta$ -infected KO mice.

To examine any association between bacteria and neutrophils in infected lungs, we analysed lung histological sections labelled with anti-LPS antibody (for bacteria), and with Hoechst to identify neutrophils thanks to their characteristic nuclear shape. In infected lungs, neutrophils infiltrated the alveoli and accumulated in the bronchi, where they were associated with IHMA or IHMA $\Delta\Delta$ bacteria (Figure 8b), thus suggesting that neutrophils were actively internalising bacteria.

To characterise the phagocytic capacity of neutrophils in both mouse strains, neutrophils were isolated from WT and KO mice and were incubated with pHrodo Green *Escherichia coli* (dead *E. coli* labelled with a dye which fluoresces green upon phagosome

acidification). Cells exposed to these bioparticles were then analysed by flow cytometry. Similar percentages of fluorescence intensity were recorded for both WT and KO neutrophils, indicating that they were equally capable of internalising and processing bacteria (Figure 8c).

Pseudomonas aeruginosa's T3SS effectors have been reported to induce neutrophil apoptosis, pyroptosis or necrosis (Diaz et al., 2008; Diaz & Hauser, 2010; Rangel et al., 2014; Sun et al., 2012; Vareechon et al., 2017). To investigate the capacity of IHMA to induce neutrophil death, the survival of infected neutrophils was determined in kinetic experiments. The numbers of remaining neutrophils were counted by microscopy at several time points (Figure 8d). The area under the curve (AUC) was plotted for each strain (PAO1, IHMA and IHMA $\Delta\Delta$) for neutrophils from WT or KO mice (Figure 8e). Incubation with IHMA and IHMA $\Delta\Delta$ induced similar death patterns, with significantly higher mortality than recorded in non-infected conditions and significantly lower mortality than following exposure to PAO1. No difference between WT and KO neutrophils was detectable in any condition, except with PAO1, to which KO neutrophils were slightly less sensitive than WT neutrophils. This feature suggests that, unlike IHMA, PAO1 can induce a low level of pyroptosis in this cell type, as previously shown (Ryu et al., 2017). Hence, IHMA-induced a cell death program in neutrophils that is independent of ExIA and does not result from pyroptosis. This program could partly account for the release of cytoplasmic proteins detected in BAL fluids (Figure 2d,e).

In addition to their phagocytic capacity, neutrophils can immobilise and kill bacteria by forming neutrophil extracellular traps (NETs), composed of chromatin and proteins from secretory vesicles (Delgado-Rizo et al., 2017; Rosales, 2018). *P. aeruginosa* has been shown to induce NET formation in various models (Dwyer et al., 2014; Thanabalasuriar et al., 2019; Yoo et al., 2014; Young et al., 2011). To examine whether IHMA-induced neutrophil death was due to NET formation, infected neutrophils were labelled with Hoechst, to reveal their DNA, and with anti-histone H2AX antibodies, two markers of NETs (McDonald, Urrutia, Yipp, Jenne, & Kubes, 2012). As illustrated in Figure 8f, multiple figures showing networks containing DNA and H2AX, which are typical of NETs, were observed when neutrophils were infected with PAO1, IHMA or IHMA $\Delta\Delta$. Thus, IHMA can induce NET formation, thereby contributing to bacterial elimination.

3 | DISCUSSION

Inflammasome activation is a powerful system to rapidly trigger the inflammatory response in order to contain bacterial expansion. Experiments in mice with different genetic backgrounds showed that mouse strains where the immune response is delayed by only a few hours eliminate bacteria less efficiently and have a poorer outcome than mice mounting an earlier response (De Simone et al., 2014). Inflammasome induction is crucial to eradicate internal pathogens, such as *Listeria monocytogenes* (Sauer et al., 2011). However, uncontrolled inflammation may induce tissue damage and limit gas exchange in lungs, because of overwhelming neutrophil accumulation and

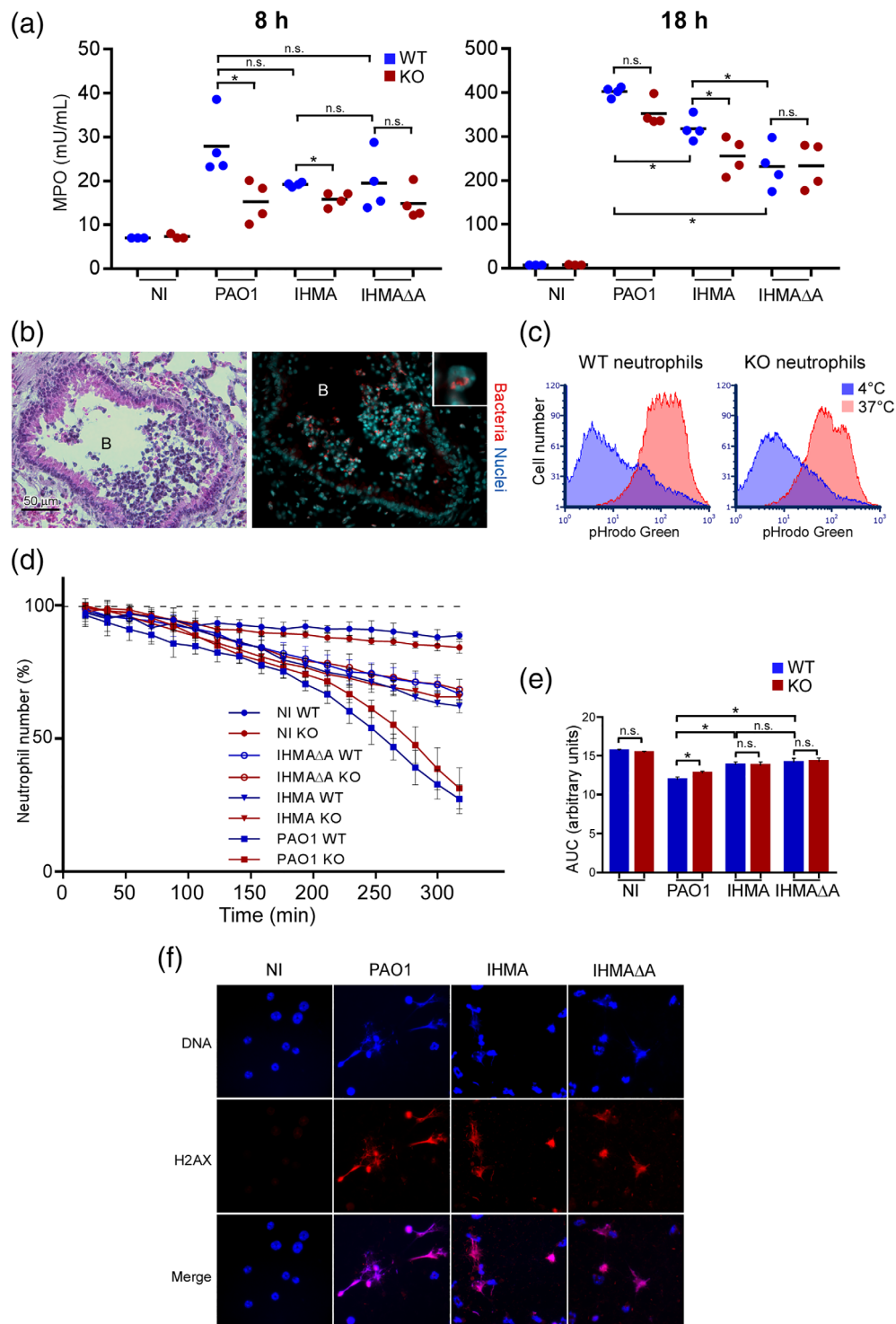


FIGURE 8 Neutrophil infiltration and activity in infected lungs. (a) Neutrophil content was monitored by measuring MPO activity in lung extracts collected at 8 and 18 hpi. Data are plotted with the corresponding mean value. Significance of differences between WT and KO data were calculated using the Mann–Whitney's test. Differences between bacterial strains in WT mice were significant according to a one-way ANOVA test; multiple comparisons were performed using a Tukey's test and the results are indicated with a (*) or n.s. Differences were all significant relative to NI. (b) Paraffin sections of IHMA-infected WT lungs were stained with haematoxylin–eosin to reveal morphological features (left), and with anti-LPS and Hoechst to reveal bacteria and nuclei, respectively (right). Images represent bronchi (b) containing neutrophils. The insert shows bacteria associated with a neutrophil at higher magnification. Similar data were obtained with KO mice and mice infected with IHMA $\Delta\Delta$ (not shown). (c) Phagocytosis assay using pHrodo Green *E. coli*. Neutrophils were incubated with the bioparticles for 1 hr, either at 4°C (inactive phagocytosis, used as control) or at 37°C (active phagocytosis) before analysis by flow cytometry. (d,e) Neutrophils from WT or KO mice were incubated in an automated microscope with IHMA, IHMA $\Delta\Delta$ or PAO1 at MOI 10, or were uninfected (NI). Phase-contrast images (nine per condition) were acquired every 15 min for 5 hr. Neutrophil numbers were counted using ImageJ and the means (\pm SD) were plotted as a function of time (d). (e) The areas under the curves (AUC) were calculated and are represented as means + SD. Statistical analyses were performed as described for Figure 2. (f) To visualise NETosis, infected cells were labelled with Hoechst for DNA (blue) and anti-H2AX antibodies (red). Intact neutrophils are only blue, and neutrophils subjected to NETosis are revealed by spread chromatin labelled by both markers. All experiments on neutrophils were repeated at least twice, with similar results. MPO, myeloperoxidase

excessive edema. In the mouse acute pneumonia model, inflammasome ablation increased host survival following infection with various T3SS+ *P. aeruginosa* strains (Cohen & Prince, 2013; Faure et al., 2014; Thakur, Barrett, Hobden, & Hazlett, 2004; Thakur, Barrett, McClellan, & Hazlett, 2004). This effect was attributed to the hyperinflamed status of the infected lungs when the inflammatory caspases are present. This hypothesis was recently challenged by Wu et al. (2019) who demonstrated that inflammasome activation triggers intravascular coagulation, resulting in host death. In their study, these authors showed that macrophage pyroptosis led to the formation of microvesicles decorated with Tissue Factor, which initiates the extrinsic coagulation cascade. This process was demonstrated to exist for both the T3SS-induced NLRC4 inflammasome, and non-canonical activation of the inflammasome by caspase-11, and provides a major insight into the surprising improvement in survival observed after inflammasome inactivation.

Pseudomonas aeruginosa strains are known to be highly heterogeneous, especially in terms of virulence factors and release of bacterial determinants (flagellin, pili and LPS) stimulating inflammatory cytokine expression via TLR activation. The IHMA strain studied herein possesses pili and a flagellum (Reboud et al., 2016) and is indeed able to stimulate IL-1 β expression (Figures 1a and 4b).

Previous studies investigating the role of the inflammasome in host immune reaction to *P. aeruginosa*, used T3SS+ strains activating NLRC4 (Cohen & Prince, 2013; Faure et al., 2014; Iannitti et al., 2016; Schultz et al., 2002; Thakur, Barrett, Hobden, & Hazlett, 2004; Thakur, Barrett, McClellan, & Hazlett, 2004; Veliz Rodriguez et al., 2012). Here, we showed that inflammasome activation is also detrimental for mice infected with an *exlA*+ strain, although a different inflammasome is involved (NLRP3 vs. NLRC4) (Basso, Wallet, et al., 2017) and its inactivation has a moderate effect on inflammatory mediators. Indeed, IHMA-dependent inflammasome activation induced secretion of small amounts of m-IL-1 β in vitro and undetectable amounts in vivo (Figures 1 and 4). Furthermore, caspase ablation resulted in only a very small (albeit significant) relative decrease in neutrophil recruitment, as measured by MPO activity (Figure 8a). Finally, inhibition of IL-1R and the subsequent diminution of IL-6 synthesis did not modify mouse survival curve profile (Figure 7). Likewise, our data support the model proposed by Wu et al. (2019), rather than the hypothesis of hyperinflammation-induced host death.

The precise role of caspase-11 in the immune response to pathogens remains elusive. Caspase-11 is not involved in IL-1 β production when mice are infected with a T3SS+ strain (Cohen & Prince, 2013). We previously showed that *ExlA* failed to induce pyroptosis when macrophages lacked either NLRP3 or ASC (a central player of the NLRP3 inflammasome) (Basso, Wallet, et al., 2017). As caspase-11 can induce pyroptosis independently of NLRP3, our previous in vitro data excluded a role for caspase-11 in *ExlA*-induced pyroptosis. Therefore, it is probable that caspase-11 was not activated by *ExlA* in alveolar macrophages and did not contribute to NLRP3-dependent IL-1 β activation either. However, caspase-11 was shown to induce pneumocyte lysis (Wang et al., 2018). Thus, caspase-11 deficiency may also contribute to the improved mouse survival observed in

infected caspase-1/caspase-11 KO mice by limiting pneumocytic lesions.

As for the T3SS+ bacteria, the capacity of *exlA*+ strains to induce inflammasome assembly is highly variable and independent of its toxicity on non-immune cells. In a previous study, we showed that the hypervirulent strain CLJ1, which secretes high levels of *ExlA* but displays no flagellum nor type 4 pili, can grow in mouse lungs while remaining relatively non-immunogenic (Bouillot et al., 2017). In contrast, the IHMA bacterial population remained relatively stable in the lungs and dramatically increased pro-IL-1 β level, hence priming the expression of a major inflammasome substrate, as well as other inflammatory cytokines (including TNF- α and IL-10). As mentioned above, no m-IL-1 β was detectable in IHMA-infected lungs (Figure 4b). Nevertheless, IL-1 β is a very potent cytokine, acting at vanishingly low concentrations on cells (Garlanda et al., 2013). In addition, IL-1 α , interacting with the same receptor as IL-1 β , was massively produced in IHMA-infected lungs and was probably the main contributor of the enhancement of IL-6, IL-17a and KC production (Figure 5), thereby amplifying the inflammatory reaction. In addition to caspase-1/caspase-11, *ExlA* is absolutely required for IL-17a and KC synthesis, as they were not induced by IHMA $\Delta\Delta$ (Figure 5), indicating that the TLRs are not involved in the induction observed.

Furthermore, our data show that *ExlA* per se, possibly through pore formation, can stimulate pro-IL-1 β and IL-6 production (Figure 5). Two PFTs, staphylococcal Pantone-Valentine leukocidin and Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes* (Kayal et al., 2002; Ma, Chang, Zhang, Zhou, & Yu, 2012), were shown to induce a stress response that can activate NF- κ B, thereby inducing an inflammatory response not relying on TLR activation. Hence, *ExlA* may use a similar pathway to stimulate pro-IL-1 β and IL-6 synthesis.

IL-10 is known to improve lung injury and survival in *P. aeruginosa* pneumonia (Chmiel et al., 1999; Guilbault et al., 2002; Sawa et al., 1997). The production of IL-10 in IHMA $\Delta\Delta$ -infected lungs, from 8 hpi, further indicates that the inflammation was promptly defused when mice were infected with IHMA $\Delta\Delta$, thereby preventing collateral damage to tissues. In contrast, IL-10 remained undetectable at 18 hpi in IHMA-infected lungs, suggesting that inflammation was still very active at this time point. In comparison, PAO1-infected lungs contained high IL-10 levels at 18 hpi, meaning that the inflammatory response was tempered at this stage. Thus, the pro-inflammatory phase may last longer with IHMA than with PAO1.

Neutrophils were massively recruited to IHMA-infected lungs, even in the absence of *ExlA* and the inflammatory caspases (Figure 8a). This result suggests that neutrophil recruitment mainly relies on secretion of TNF- α , or other untested cytokines, as levels of IL-6, IL-17a and KC remained low in the absence of both *ExlA* and the caspases. However, the presence of either the toxin or the caspases significantly increased lung MPO levels, in line with the known pro-inflammatory action of these cytokines.

IHMA and IHMA $\Delta\Delta$ bacteria were found associated with neutrophils in infected lung sections (Figure 8b). Part of the bacterial population was probably located inside neutrophils, as suggested by the insert image. Neutrophils from WT and KO mice were equally

competent for phagocytosis (Figure 8c), confirming previous data showing that inflammasome activation is not necessary for extracellular killing of bacteria, whereas it is required for the elimination of intracellular bacteria (Cohen & Prince, 2013). In addition, both IHMA and IHMA $\Delta\Delta$ induced NETosis of WT and KO neutrophils (Figure 8d–f), thus providing neutrophils with another opportunity to kill this bacterial strain. PAO1 induced a stronger NETosis response, although it thrives better in the lungs. This apparent discrepancy is consistent with a recent report showing that PAO1 can evade the antimicrobial activity of NETs by secreting a DNase (EddB) and a phosphatase (EddA) that both contribute to the bacteria's defence against killing (Wilton, Halverson, Charron-Mazenod, Parkins, & Lewenza, 2018). The genes encoding these two enzymes are also present in IHMA; further work will be required to clarify whether these enzymes are expressed in this strain and mount a similar defensive mechanism.

The pathogenic role of ExlA was confirmed in this study. As previously shown, ExlA is the major factor causing *exlA*+ strain virulence, as all IHMA $\Delta\Delta$ -infected mice survived (Figure 2a). Images of alveoli with partial pneumocytic lining were frequently observed when ExlA was present, but never seen in lungs infected with IHMA $\Delta\Delta$ or PAO1 (Figure 2c). Furthermore, IHMA $\Delta\Delta$ bacterial loads rapidly decreased in lungs, and bacteria did not spread to other organs in mice (Figure 3). ExlA is thus responsible for multiple pathogenic actions of IHMA. It is noteworthy that IHMA could be pathogenic and induced lethality without any notable increase in bacterial burden.

Similarly, IHMA can induce death in three different cell types in the infected lungs: (a) it induces ExlA-dependent necrosis of pneumocytes, which causes tissue lesions and increases pulmonary barrier permeability, (b) it can induce neutrophil death by the formation of NETs, and (c) it triggers macrophage pyroptosis, leading to increased host lethality by a process that is probably independent of an excessive inflammatory response (Figure 9).

This study also showed that *exlA*+ strains—when they activate the innate immune response—are poorly adapted to an inflammatory environment; these strains are less resistant to the action of

phagocytic cells, possibly because they have developed fewer counteracting mechanisms than T3SS+ strains.

In conclusion, whatever the pathway and the level of inflammasome activation by *P. aeruginosa*, activation of the inflammatory caspases is detrimental for the host. Therefore, targeting the inflammatory caspases may be beneficial for hosts infected by any strains of *P. aeruginosa*.

4 | EXPERIMENTAL PROCEDURES

4.1 | Ethics statement

All protocols in this study were conducted in strict compliance with the French guidelines for the care and use of laboratory animals. The protocols for mouse infection were approved by the institutional animal research committee (CETEA#44, project number 13-024 and 20-033) and the French Ministry for Research.

4.2 | *Pseudomonas aeruginosa* strains and culture

The strains used in this study (15 *exlA*+ strains and IHMA879472 $\Delta exlA$) are described elsewhere (Basso, Ragno, et al., 2017; Reboud et al., 2016). IHMA879472 genome sequence has been published recently (Kos et al., 2015). Reference strains PAO1 and PA14 were used for comparison. Bacteria were grown in liquid LB medium at 37°C with agitation until the cultures reached an optical density at 600 nm of 1.0.

4.3 | Production of BMDMs

BMDMs were prepared from the femurs and tibias of C57BI/6 mice and differentiated as previously described (Basso, Wallet, et al., 2017).

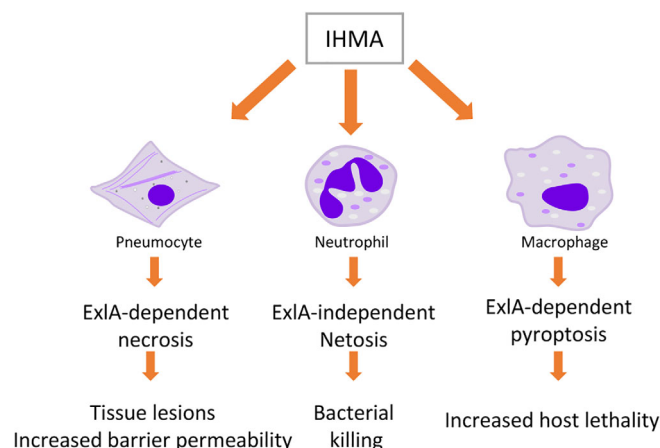


FIGURE 9 Action of *exlA*+ *P. aeruginosa* on pneumocytes, neutrophils and macrophages IHMA induces death of three cell types present in the lung. ExlA triggers pneumocyte necrosis, which induces the rupture of the alveolo-capillary barrier. IHMA promotes neutrophil NETosis, independent of ExlA action, as a response to bacterial invasion. ExlA promotes macrophage pyroptosis via NLRP3 activation

BMDMs were grown in bone marrow differentiation media: RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 20% fetal bovine serum (Lonza), 2 mM glutamine (Gibco), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Gibco) and 10% L929-cell conditioned medium (LCCM) at 37°C, 5% CO₂ in non-tissue culture-treated dishes. Four days later, 10 mL of fresh differentiation medium was added and cultures were incubated for an additional 3 days. Twenty-four hours before exposure to bacteria, BMDMs were resuspended in BMDM culture medium (RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, 5% LCCM and 2 mM L-Glutamine).

4.4 | Analysis of IL-1β in infected BMDM lysates and supernatants

Cells were infected for 3.5 hr at MOI 10 with the bacterial strains. Then, supernatants were collected and cellular lysates were prepared. Both were analysed for their IL-1β contents by Western blotting using the anti-mouse IL-1β from R&D Systems (AB-401-NA). The β-actin antibody was used for loading control of the lysates. IL-1β concentrations in supernatants were measured by ELISA (BioLegend).

4.5 | Mouse pulmonary infection

Pathogen-free C57Bl/6 (WT) mice were obtained from Charles River Laboratories and C57Bl/6 *caspase-1/caspase-11* double knockout (KO) mice were kindly provided by Thomas Henry (Ciri, Lyon). Animals were housed and mated in the institute's animal care facility. Both males and females were used in equilibrated ratios. Bacteria from exponential growth (OD₆₀₀ = 1.0) were centrifuged and resuspended in sterile PBS at 1.67 × 10⁸ per mL for PAO1 and 3.33 × 10⁸ per mL for IHMA and IHMAΔA. Mice (8–10 weeks) were anaesthetised by intraperitoneal administration of a mixture of xylazine (10 mg.Kg⁻¹) and ketamine (50 mg.Kg⁻¹). Then, 30 µL of bacterial suspension (5 × 10⁶ for PAO1 and 1 × 10⁷ for IHMA/IHMAΔA) were deposited in the animal's nostrils.

To study survival rates, mice were inspected six times per day; moribund mice were considered dead and were euthanized by CO₂ inhalation. Experiments were stopped at day 5.

To investigate various infection parameters, mice were euthanized at 8 or 18 hpi, as indicated. Lungs, liver, and spleen were isolated and homogenised in PBS with a Polytron. When indicated, anakinra (Kineret from SOBI laboratories), was injected IP at 10 mg/kg 1 hr prior infection and then daily.

These *in vivo* experiments were performed only once; the results obtained with all mice used in these experiments are presented in the figures.

4.6 | Analysis of organ homogenates

The presence of caspase-1 was examined by Western blotting using an appropriate antibody (Santa Cruz Biotechnology; sc-56036). Bacterial

colony-forming units (CFU) were determined by plating serial dilutions and counting colonies on *Pseudomonas* Isolation (Difco) Agar plates. The CFU were calculated for the total organ. IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-17a and TNF-α levels were measured using the corresponding ELISA kits from BioLegend; KC levels were determined using the ELISA kit from R&D Systems and IL-18 by the LEGENDplex bead-based immunoassay from BioLegend. IL-1β was analysed by Western blotting as above, and membranes were reprobated with an anti-β-actin antibody to allow signal normalisation (Sigma-Aldrich A1978). MPO activity was determined using the Myeloperoxidase Fluorometric kit from Enzo Life Sciences. All dosages were performed once in triplicate.

4.7 | Analysis of BALs

BALs were collected at 18 hpi by flushing the lungs of euthanized and intubated mice with 0.5 mL PBS (three times). The fluids collected were pooled, centrifuged and the supernatants were aliquoted, snap-frozen and stored at -80°C. Protein concentration in the supernatants was measured using the BCA kit from Thermo Scientific. The presence of β-actin was determined by Western blot analysis, as above. Lactate dehydrogenase (LDH) activity in BAL supernatants was assayed using the Cytotoxicity Detection kit (Roche) and IL-1α was measured by ELISA as above. Dosages were performed once in triplicate.

4.8 | Transmission electron microscopy

For electron microscopy, mice euthanized at 18 hpi were rapidly perfused intracardially with NaCl 0.9%/heparin 20 U/mL and then with a fixative solution (paraformaldehyde 2%/glutaraldehyde 2%). Lungs were minced in small pieces (about 1 mm³) and prepared for electron microscopy as previously described (Bouillot et al., 2017). For transmission electron imaging, 80-nm sections, collected on formvar-coated copper grids, were observed under an FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin transmission electron microscope operating at 120 kV using an Orius SC1000B CCD camera. Two mice were analysed per bacterial strain.

4.9 | Histological analysis

The histology of infected organs was examined. Organs were fixed, paraffin-embedded, and sections were prepared and stained with haematoxylin-eosin for morphological examination. Bacteria were labelled with an anti-LPS antibody (Acris Antibodies BP2235) and nuclei were counterstained with Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich). Slides were observed under an Axioplan Zeiss microscope.

4.10 | Mouse neutrophil isolation

Neutrophils were isolated from bone marrow using established procedures (Swamydas & Lionakis, 2013). Briefly, mice were euthanized

with 180 mg/Kg of Dolethal. Blood was collected by cardiac puncture and the serum was recovered. Bone marrow was harvested from femurs and tibias to isolate neutrophils. Neutrophils were purified on a Ficoll Paque Plus gradient (GE Healthcare). Purity (>90%) was determined by fluorescence microscopy after labelling nuclei with Syto 24 (Life Technology).

To assess NETosis, purified neutrophils were incubated for 3 hr with bacteria, then fixed and labelled with Hoechst and anti-H2AX antibodies (Millipore 07-727). The experiment was performed twice.

To monitor the phagocytic capacity of neutrophils, purified neutrophils were first labelled with the fluorescent DNA binding probe DRAQ5 (Life Technology) to exclude any non-lysed erythrocytes from the analysis. Then, cells were incubated with *E. coli* pHrodo Green (Life Technology) for 1 hr at 4 or 37°C in presence of 5% autologous serum. They were subsequently labelled at 4°C with an anti-Ly6G antibody conjugated with phycoerythrin (Becton Dickinson, 551461). Finally, cells (30,000) were analysed using a BD FACSCalibur, and the pHrodo Green fluorescence intensity was monitored on DRAQ5+/Ly6G+ cells (i.e. neutrophils).

4.11 | Time-lapse microscopy and data analysis

Kinetic experiments were performed on an IncuCyte live-cell microscope (Sartorius). Purified neutrophils were exposed to bacteria in a chamber at 37°C with CO₂, and phase-contrast images were automatically acquired every 15 min for up to 5 hr to monitor the progressive loss of intact neutrophils. Images were analysed with ImageJ software to determine the number of intact neutrophils at each time point. Nine images were collected per condition. The experiment was performed three times.

4.12 | Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (v. 7.00). All quantitative data were analysed by applying Shapiro-Wilk's normality test. In order to not overload the figures and to show only the relevant comparisons, we compared (a) the WT versus KO data for each strain and (b) the data between strains only in WT mice. The comparison of data between strains for the KO mice were not calculated. Significance of differences between data for WT and KO mice was determined using Student's or Mann-Whitney's tests (as indicated in the legends), depending on the result of the normality test. Significance of differences between data from the three strains and non-infected control in WT mice was determined using a one-way analysis of variance (ANOVA) test, as all data from WT mice had a normal distribution; $p < .001$ for all data. For multiple comparisons, a Tukey's test was used. (*) indicates a $p < .05$ and n.s. indicates a non-significant difference. For clarity, significance relative to uninfected controls is only shown when non-significant.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Thomas Henry for the transfer of caspase-1/caspase-11 KO mice as well as François Cretin and Guy Schoehn for helpful discussions. Strain IHMA879472 was obtained from the International Health Management Association. The team's work is supported by grants from the French National Agency for Research (Agence Nationale de la Recherche; ANR-15-CE11-0018-01) and Fondation pour la Recherche Médicale 'Equipe FRM 2017' (DEQ20170336705), as well as institutional support from CNRS, INSERM, CEA and University Grenoble-Alpes. We further acknowledge the platforms supported by GRAL, funded through the University Grenoble-Alpes Graduate School (Ecoles Universitaires de Recherche) CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003) and the platforms at the Grenoble INSTRUCT-ERIC Center (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-EMBL) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB), supported by French Infrastructure for Integrated Structural Biology (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL, funded through the University Grenoble Alpes Graduate School (Ecoles Universitaires de Recherche) CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Stéphanie Bouillot participated to most experiments of the study. Stéphane Pont performed the experiments on neutrophils and made some dosages. Benoit Gallet and Christine Moriscot did the electron microscopy work. Vincent Deruelle performed some in vivo analyses. Ina Attrée contributed to the conceptualisation of the project. Philippe Huber participated to most experiments and wrote the manuscript.

ORCID

Philippe Huber  <https://orcid.org/0000-0002-4153-7694>

REFERENCES

- Afonina, I. S., Muller, C., Martin, S. J., & Beyaert, R. (2015). Proteolytic processing of interleukin-1 family cytokines: Variations on a common theme. *Immunity*, 42(6), 991–1004. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.003>
- Allewelt, M., Coleman, F. T., Grout, M., Priebe, G. P., & Pier, G. B. (2000). Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infection and Immunity*, 68(7), 3998–4004.
- Basso, P., Ragno, M., Elsen, S., Reboud, E., Golovkine, G., Bouillot, S., ... Attree, I. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* pore-forming exolysin and type IV pili cooperate to induce host cell lysis. *MBio*, 8(1), e02250–e02216. <https://doi.org/10.1128/mBio.02250-16>
- Basso, P., Wallet, P., Elsen, S., Soleilhac, E., Henry, T., Faudry, E., & Attree, I. (2017). Multiple *pseudomonas* species secrete exolysin-like toxins and provoke caspase-1-dependent macrophage death. *Environmental Microbiology*, 19(10), 4045–4064. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13841>
- Bouillot, S., Munro, P., Gallet, B., Reboud, E., Cretin, F., Golovkine, G., ... Huber, P. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* exolysin promotes bacterial

- growth in lungs, alveolar damage and bacterial dissemination. *Scientific Reports*, 7(1), 2120. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02349-0>
- Cavalli, G., & Dinarello, C. A. (2018). Anakinra therapy for non-cancer inflammatory diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1157. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01157>
- Chmiel, J. F., Konstan, M. W., Knesebeck, J. E., Hilliard, J. B., Bonfield, T. L., Dawson, D. V., & Berger, M. (1999). IL-10 attenuates excessive inflammation in chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160(6), 2040–2047. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.160.6.9901043>
- Cohen, T. S., & Prince, A. S. (2013). Activation of inflammasome signaling mediates pathology of acute *P. aeruginosa* pneumonia. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(4), 1630–1637. <https://doi.org/10.1172/JCI66142>
- De Simone, M., Spagnuolo, L., Lore, N. I., Rossi, G., Cigana, C., De Fino, I., ... Bragonzi, A. (2014). Host genetic background influences the response to the opportunistic *Pseudomonas aeruginosa* infection altering cell-mediated immunity and bacterial replication. *PLoS One*, 9(9), e106873. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106873>
- Delgado-Rizo, V., Martinez-Guzman, M. A., Iniguez-Gutierrez, L., Garcia-Orozco, A., Alvarado-Navarro, A., & Fafutis-Morris, M. (2017). Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: An overview. *Frontiers in Immunology*, 8, 81. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00081>
- Diaz, M. H., & Hauser, A. R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU is injected into phagocytic cells during acute pneumonia. *Infection and Immunity*, 78(4), 1447–1456. <https://doi.org/10.1128/IAI.01134-09>
- Diaz, M. H., Shaver, C. M., King, J. D., Musunuri, S., Kazzaz, J. A., & Hauser, A. R. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* induces localized immunosuppression during pneumonia. *Infection and Immunity*, 76(10), 4414–4421. <https://doi.org/10.1128/IAI.00012-08>
- Dwyer, M., Shan, Q., D'Ortona, S., Maurer, R., Mitchell, R., Olesen, H., ... Gadjeva, M. (2014). Cystic fibrosis sputum DNA has NETosis characteristics and neutrophil extracellular trap release is regulated by macrophage migration-inhibitory factor. *Journal of Innate Immunity*, 6(6), 765–779. <https://doi.org/10.1159/000363242>
- Elsen, S., Huber, P., Bouillot, S., Coute, Y., Fournier, P., Dubois, Y., ... Attree, I. (2014). A type III secretion negative clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* employs a two-partner secreted exolysin to induce hemorrhagic pneumonia. *Cell Host & Microbe*, 15(2), 164–176. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.003>
- Faure, E., Mear, J. B., Faure, K., Normand, S., Couturier-Maillard, A., Grandjean, T., ... Kipnis, E. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* type-3 secretion system dampens host defense by exploiting the NLR4-coupled inflammasome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 189(7), 799–811. <https://doi.org/10.1164/rccm.201307-1358OC>
- Freschi, L., Bertelli, C., Jeukens, J., Moore, M. P., Kukavica-Ibrulj, I., Emond-Rheault, J. G., ... Winstanley, C. (2018). Genomic characterisation of an international *Pseudomonas aeruginosa* reference panel indicates that the two major groups draw upon distinct mobile gene pools. *FEMS Microbiology Letters*, 365(14), 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny120>
- Galle, M., Schotte, P., Haegman, M., Wullaert, A., Yang, H. J., Jin, S., & Beyaert, R. (2008). The *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system plays a dual role in the regulation of caspase-1 mediated IL-1 β maturation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(5A), 1767–1776. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00190.x>
- Garlanda, C., Dinarello, C. A., & Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 family: Back to the future. *Immunity*, 39(6), 1003–1018. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.010>
- Gasse, P., Riteau, N., Vacher, R., Michel, M. L., Fautrel, A., di Padova, F., ... Couillin, I. (2011). IL-1 and IL-23 mediate early IL-17A production in pulmonary inflammation leading to late fibrosis. *PLoS One*, 6(8), e23185. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023185>
- Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, 67(3), 159–173. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>
- Guilbault, C., Stotland, P., Lachance, C., Tam, M., Keller, A., Thompson-Snipes, L., ... Radzioch, D. (2002). Influence of gender and interleukin-10 deficiency on the inflammatory response during lung infection with *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Immunology*, 107(3), 297–305. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2002.01508.x>
- Hauser, A. R. (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: Infection by injection. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(9), 654–665. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2199>
- Hayward, J. A., Mathur, A., Ngo, C., & Man, S. M. (2018). Cytosolic recognition of microbes and pathogens: Inflammasomes in action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 82(4), 1–40. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-18>
- Iannitti, R. G., Napolioni, V., Oikonomou, V., De Luca, A., Galosi, C., Pariano, M., ... Romani, L. (2016). IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent inflammation in murine and human cystic fibrosis. *Nature Communications*, 7, 10791. <https://doi.org/10.1038/ncomms10791>
- Kayal, S., Lilienbaum, A., Join-Lambert, O., Li, X., Israel, A., & Berche, P. (2002). Listeriolysin O secreted by *Listeria monocytogenes* induces NF- κ B signalling by activating the I κ B kinase complex. *Molecular Microbiology*, 44(5), 1407–1419.
- Kos, V. N., Deraspe, M., McLaughlin, R. E., Whiteaker, J. D., Roy, P. H., Alm, R. A., ... Gardner, H. (2015). The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(1), 427–436. <https://doi.org/10.1128/AAC.03954-14>
- Kudoh, I., Wiener-Kronish, J. P., Hashimoto, S., Pittet, J. F., & Frank, D. (1994). Exoproduct secretions of *Pseudomonas aeruginosa* strains influence severity of alveolar epithelial injury. *The American Journal of Physiology*, 267(5 Pt 1), L551–L556.
- Lin, C. K., & Kazmierczak, B. I. (2017). Inflammation: A double-edged sword in the response to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Journal of Innate Immunity*, 9(3), 250–261. <https://doi.org/10.1159/000455857>
- Ma, X., Chang, W., Zhang, C., Zhou, X., & Yu, F. (2012). Staphylococcal Panton–Valentine leukocidin induces pro-inflammatory cytokine production and nuclear factor- κ B activation in neutrophils. *PLoS One*, 7(4), e34970. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034970>
- Man, S. M., & Kanneganti, T. D. (2016). Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 16(1), 7–21. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.7>
- McDonald, B., Urrutia, R., Yipp, B. G., Jenne, C. N., & Kubes, P. (2012). Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host & Microbe*, 12(3), 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.06.011>
- Norelli, M., Camisa, B., Barbiera, G., Falcone, L., Purevdorj, A., Genua, M., ... Bondanza, A. (2018). Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells. *Nature Medicine*, 24(6), 739–748. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0036-4>
- Potey, P. M., Rossi, A. G., Lucas, C. D., & Dorward, D. A. (2019). Neutrophils in the initiation and resolution of acute pulmonary inflammation: Understanding biological function and therapeutic potential. *The Journal of Pathology*, 247(5), 672–685. <https://doi.org/10.1002/path.5221>
- Rangel, S. M., Diaz, M. H., Knoten, C. A., Zhang, A., & Hauser, A. R. (2015). The role of ExoS in dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* during pneumonia. *PLoS Pathogens*, 11(6), e1004945. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004945>
- Rangel, S. M., Logan, L. K., & Hauser, A. R. (2014). The ADP-ribosyltransferase domain of the effector protein ExoS inhibits

- phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* during pneumonia. *MBio*, 5(3), e01080–e01014. <https://doi.org/10.1128/mBio.01080-14>
- Reboud, E., Elsen, S., Bouillot, S., Golovkine, G., Basso, P., Jeannot, K., ... Huber, P. (2016). Phenotype and toxicity of the recently discovered exlA-positive *Pseudomonas aeruginosa* strains collected worldwide. *Environmental Microbiology*, 18(10), 3425–3439. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13262>
- Rosales, C. (2018). Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? *Frontiers in Physiology*, 9, 113. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00113>
- Roy, P. H., Tetu, S. G., Larouche, A., Elbourne, L., Tremblay, S., Ren, Q., ... Paulsen, I. T. (2010). Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PLoS One*, 5(1), e8842. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008842>
- Ryu, J. C., Kim, M. J., Kwon, Y., Oh, J. H., Yoon, S. S., Shin, S. J., ... Ryu, J. H. (2017). Neutrophil pyroptosis mediates pathology of *P. aeruginosa* lung infection in the absence of the NADPH oxidase NOX2. *Mucosal Immunology*, 10(3), 757–774. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.73>
- Sauer, J. D., Pereyre, S., Archer, K. A., Burke, T. P., Hanson, B., Lauer, P., & Portnoy, D. A. (2011). *Listeria monocytogenes* engineered to activate the Nlr4 inflammasome are severely attenuated and are poor inducers of protective immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(30), 12419–12424. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019041108>
- Sawa, T., Corry, D. B., Gropper, M. A., Ohara, M., Kurahashi, K., & Wiener-Kronish, J. P. (1997). IL-10 improves lung injury and survival in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Journal of Immunology*, 159(6), 2858–2866.
- Schultz, M. J., Rijneveld, A. W., Florquin, S., Edwards, C. K., Dinarello, C. A., & van der Poll, T. (2002). Role of interleukin-1 in the pulmonary immune response during *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 282(2), L285–L290. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00461.2000>
- Shaver, C. M., & Hauser, A. R. (2004). Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infection and Immunity*, 72(12), 6969–6977. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.6969-6977.2004>
- Slaats, J., Ten Oever, J., van de Veerdonk, F. L., & Netea, M. G. (2016). IL-1beta/IL-6/CRP and IL-18/ferritin: Distinct inflammatory programs in infections. *PLoS Pathogens*, 12(12), e1005973. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005973>
- Sun, Y., Karmakar, M., Taylor, P. R., Rietsch, A., & Pearlman, E. (2012). ExoS and ExoT ADP ribosyltransferase activities mediate *Pseudomonas aeruginosa* keratitis by promoting neutrophil apoptosis and bacterial survival. *Journal of Immunology*, 188(4), 1884–1895.
- Swamydas, M., & Lionakis, M. S. (2013). Isolation, purification and labeling of mouse bone marrow neutrophils for functional studies and adoptive transfer experiments. *Journal of Visualized Experiments*, 77, e50586. <https://doi.org/10.3791/50586>
- Thakur, A., Barrett, R. P., Hobden, J. A., & Hazlett, L. D. (2004). Caspase-1 inhibitor reduces severity of *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(9), 3177–3184. <https://doi.org/10.1167/iovs.04-0041>
- Thakur, A., Barrett, R. P., McClellan, S., & Hazlett, L. D. (2004). Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* corneal infection in IL-1 beta converting enzyme (ICE, caspase-1) deficient mice. *Current Eye Research*, 29(4–5), 225–233. <https://doi.org/10.1080/02713680490516710>
- Thanabalasuriar, A., Scott, B. N. V., Peiseler, M., Willson, M. E., Zeng, Z., Warren, P., ... Kubes, P. (2019). Neutrophil extracellular traps confine *Pseudomonas aeruginosa* ocular biofilms and restrict brain invasion. *Cell Host & Microbe*, 25(4), 526–536 e524. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.02.007>
- Vance, R. E., Rietsch, A., & Mekalanos, J. J. (2005). Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in vivo. *Infection and Immunity*, 73(3), 1706–1713.
- Vareechon, C., Zmina, S. E., Karmakar, M., Pearlman, E., & Rietsch, A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* effector ExoS inhibits ROS production in human neutrophils. *Cell Host & Microbe*, 21(5), 611–618 e615. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.04.001>
- Veliz Rodriguez, T., Moalli, F., Polentarutti, N., Paroni, M., Bonavita, E., Anselmo, A., ... Garlanda, C. (2012). Role of toll interleukin-1 receptor (IL-1R) 8, a negative regulator of IL-1R/toll-like receptor signaling, in resistance to acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Infection and Immunity*, 80(1), 100–109. <https://doi.org/10.1128/IAI.05695-11>
- Wang, J., Sahoo, M., Lantier, L., Warawa, J., Cordero, H., Deobald, K., & Re, F. (2018). Caspase-11-dependent pyroptosis of lung epithelial cells protects from melioidosis while caspase-1 mediates macrophage pyroptosis and production of IL-18. *PLoS Pathogens*, 14(5), e1007105. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007105>
- Williams, B. J., Dehnbostel, J., & Blackwell, T. S. (2010). *Pseudomonas aeruginosa*: Host defence in lung diseases. *Respirology*, 15(7), 1037–1056. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2010.01819.x>
- Wilton, M., Halverson, T. W. R., Charron-Mazenod, L., Parkins, M. D., & Lewenza, S. (2018). Secreted phosphatase and deoxyribonuclease are required by *Pseudomonas aeruginosa* to defend against neutrophil extracellular traps. *Infection and Immunity*, 86(9), 1–12. <https://doi.org/10.1128/IAI.00403-18>
- Wonnenberg, B., Bischoff, M., Beisswenger, C., Dinh, T., Bals, R., Singh, B., & Tschernig, T. (2016). The role of IL-1beta in *Pseudomonas aeruginosa* in lung infection. *Cell and Tissue Research*, 364(2), 225–229. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2387-9>
- Wu, C., Lu, W., Zhang, Y., Zhang, G., Shi, X., Hisada, Y., ... Li, Z. (2019). Inflammasome activation triggers blood clotting and host death through pyroptosis. *Immunity*, 50(6), 1401–1411 e1404. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.003>
- Yoo, D. G., Winn, M., Pang, L., Moskowitz, S. M., Malech, H. L., Leto, T. L., & Rada, B. (2014). Release of cystic fibrosis airway inflammatory markers from *Pseudomonas aeruginosa*-stimulated human neutrophils involves NADPH oxidase-dependent extracellular DNA trap formation. *Journal of Immunology*, 192(10), 4728–4738. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301589>
- Young, R. L., Malcolm, K. C., Kret, J. E., Caceres, S. M., Poch, K. R., Nichols, D. P., ... Nick, J. A. (2011). Neutrophil extracellular trap (NET)-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence of acquired resistance within the CF airway, independent of CFTR. *PLoS One*, 6(9), e23637. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023637>

How to cite this article: Bouillot S, Pont S, Gallet B, et al. Inflammasome activation by *Pseudomonas aeruginosa*'s ExlA pore-forming toxin is detrimental for the host. *Cellular Microbiology*. 2020;e13251. <https://doi.org/10.1111/cmi.13251>

Bibliographie

- Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., and Chihib, N.-E. (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch. Microbiol.* *196*, 453–472.
- Ackermann, E.J., Kempner, E.S., and Dennis, E.A. (1994). Ca²⁺-independent cytosolic phospholipase A2 from macrophage-like P388D1 cells. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* *269*, 9227–9233.
- Adamo, R., Sokol, S., Soong, G., Gomez, M.I., and Prince, A. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* Flagella Activate Airway Epithelial Cells through asialoGM1 and Toll-Like Receptor 2 as well as Toll-Like Receptor 5. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *30*, 627–634.
- Akeda, Y., and Galán, J.E. (2005). Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* *437*, 911–915.
- Alarcon, I., Evans, D.J., and Fleiszig, S.M.J. (2009). The Role of Twitching Motility in *Pseudomonas aeruginosa* Exit from and Translocation of Corneal Epithelial Cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *50*, 2237–2244.
- Allen, L., Dockrell, D.H., Pattery, T., Lee, D.G., Cornelis, P., Hellewell, P.G., and Whyte, M.K.B. (2005). Pyocyanin Production by *Pseudomonas aeruginosa* Induces Neutrophil Apoptosis and Impairs Neutrophil-Mediated Host Defenses In Vivo. *J. Immunol.* *174*, 3643–3649.
- Allewelt, M., Coleman, F.T., Grout, M., Priebe, G.P., and Pier, G.B. (2000). Acquisition of Expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU Cytotoxin Leads to Increased Bacterial Virulence in a Murine Model of Acute Pneumonia and Systemic Spread. *Infect. Immun.* *68*, 3998–4004.
- Aloush, V., Navon-Venezia, S., Seigman-Igra, Y., Cabili, S., and Carmeli, Y. (2006). Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk Factors and Clinical Impact. *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 43–48.
- Amiel, E., Lovewell, R.R., O’Toole, G.A., Hogan, D.A., and Berwin, B. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* Evasion of Phagocytosis Is Mediated by Loss of Swimming Motility and Is Independent of Flagellum Expression. *Infect. Immun.* *78*, 2937–2945.
- Anderson, D.M., Schmalzer, K.M., Sato, H., Casey, M., Terhune, S.S., Haas, A.L., Feix, J.B., and Frank, D.W. (2011). Ubiquitin and Ubiquitin-Modified Proteins Activate the *Pseudomonas aeruginosa* T3SS Cytotoxin, ExoU. *Mol. Microbiol.* *82*, 1454–1467.
- Anderson, D.M., Feix, J.B., Monroe, A.L., Peterson, F.C., Volkman, B.F., Haas, A.L., and Frank, D.W. (2013). Identification of the Major Ubiquitin-binding Domain of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU A2 Phospholipase. *J. Biol. Chem.* *288*, 26741–26752.
- Anderson, D.M., Sato, H., Dirck, A.T., Feix, J.B., and Frank, D.W. (2015). Ubiquitin Activates Patatin-Like Phospholipases from Multiple Bacterial Species. *J. Bacteriol.* *197*, 529–541.
- Anyan, M.E., Amiri, A., Harvey, C.W., Tierra, G., Morales-Soto, N., Driscoll, C.M., Alber, M.S., and Shrout, J.D. (2014). Type IV pili interactions promote intercellular association and moderate swarming of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 18013–18018.
- Apodaca, G., Bomsel, M., Lindstedt, R., Engel, J., Frank, D., Mostov, K.E., and Wiener-Kronish, J. (1995). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa*-induced MDCK cell injury: glycosylation-defective host cells are resistant to bacterial killing. *Infect. Immun.* *63*, 1541–1551.
- Armour, A.D., Shankowsky, H.A., Swanson, T., Lee, J., and Tredget, E.E. (2007). The impact of nosocomially-acquired resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a burn unit. *J. Trauma* *63*, 164–171.
- Arnold, C., Reisch, N., Leibold, C., Becker, S., Prüfert, K., Sautter, K., Palm, D., Jatzke, S., Buchner, S., and Buchner, E. (2004). Structure–function analysis of the cysteine string protein in *Drosophila*: cysteine string, linker and C terminus. *J. Exp. Biol.* *207*, 1323–1334.
- Arora, S.K., Ritchings, B.W., Almira, E.C., Lory, S., and Ramphal, R. (1998). The *Pseudomonas aeruginosa* Flagellar Cap Protein, FliD, Is Responsible for Mucin Adhesion. *Infect. Immun.* *66*, 1000–1007.

- Bäckhed, F., Meijer, L., Normark, S., and Richter-Dahlfors, A. (2002). TLR4-dependent recognition of lipopolysaccharide by epithelial cells requires sCD14. *Cell. Microbiol.* *4*, 493–501.
- Balachandran, P., Dragone, L., Garrity-Ryan, L., Lemus, A., Weiss, A., and Engel, J. (2007). The ubiquitin ligase Cbl-b limits *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin T-mediated virulence. *J. Clin. Invest.* *117*, 419–427.
- Ball, G., Durand, É., Lazdunski, A., and Filloux, A. (2002). A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* *43*, 475–485.
- Balla, A., Tuymetova, G., Tsiomenko, A., Várnai, P., and Balla, T. (2005). A Plasma Membrane Pool of Phosphatidylinositol 4-Phosphate Is Generated by Phosphatidylinositol 4-Kinase Type-III Alpha: Studies with the PH Domains of the Oxysterol Binding Protein and FAPP1. *Mol. Biol. Cell* *16*, 1282–1295.
- Balloy, V., Verma, A., Kuravi, S., Si-Tahar, M., Chignard, M., and Ramphal, R. (2007). The Role of Flagellin versus Motility in Acute Lung Disease Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.* *196*, 289–296.
- Banerji, S., and Flieger, A. (2004). Patatin-like proteins: a new family of lipolytic enzymes present in bacteria? *Microbiol. Read. Engl.* *150*, 522–525.
- Barbier, F., and Wolff, M. (2010). Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa*: Vers l’impasse thérapeutique ? *médecine/sciences* *26*, 960–968.
- Bardoel, B.W., Ent, S. van der, Pel, M.J.C., Tommassen, J., Pieterse, C.M.J., Kessel, K.P.M. van, and Strijp, J.A.G. van (2011). *Pseudomonas* Evades Immune Recognition of Flagellin in Both Mammals and Plants. *PLOS Pathog.* *7*, e1002206.
- Barken, K.B., Pamp, S.J., Yang, L., Gjermansen, M., Bertrand, J.J., Klausen, M., Givskov, M., Whitchurch, C.B., Engel, J.N., and Tolker-Nielsen, T. (2008). Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.* *10*, 2331–2343.
- Barker, A.P., Vasil, A.I., Filloux, A., Ball, G., Wilderman, P.J., and Vasil, M.L. (2004). A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Mol. Microbiol.* *53*, 1089–1098.
- Basso, P. (2017). Exolysine, un facteur de virulence majeur de *Pseudomonas aeruginosa* *Pseudomonas aeruginosa* pore-forming Exolysin and Type IV pili cooperate to induce host-cell lysis Multiple *Pseudomonas* species secrete Exolysin-like toxins and provoke Caspase-1-dependent macrophage death *Pseudomonas aeruginosa* renews its virulence factors Exolysin Shapes the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Clonal Outliers. These de doctorat. Université Grenoble Alpes (ComUE).
- Basso, P., Ragno, M., Elsen, S., Reboud, E., Golovkine, G., Bouillot, S., Huber, P., Lory, S., Faudry, E., and Attrée, I. (2017a). *Pseudomonas aeruginosa* Pore-Forming Exolysin and Type IV Pili Cooperate To Induce Host Cell Lysis. *MBio* *8*.
- Basso, P., Wallet, P., Elsen, S., Soleilhac, E., Henry, T., Faudry, E., and Attrée, I. (2017b). Multiple *Pseudomonas* species secrete exolysin-like toxins and provoke Caspase-1-dependent macrophage death. *Environ. Microbiol.* *19*, 4045–4064.
- Bastaert, F., Chignard, M., and Sallenave, J.M. (2015). LasB elastase, a T2SS *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor kills mice in part by subverting host alveolar macrophage activity, through IL-1 β down-regulation. *Rev. Mal. Respir.* *32*, 332.
- Bastaert, F., Kheir, S., Saint-Criq, V., Villeret, B., Dang, P.M.-C., El-Benna, J., Sirard, J.-C., Voulhoux, R., and Sallenave, J.-M. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* LasB Subverts Alveolar Macrophage Activity by Interfering With Bacterial Killing Through Downregulation of Innate Immune Defense, Reactive Oxygen Species Generation, and Complement Activation. *Front. Immunol.* *9*, 1675.
- Beatty, A.L., Malloy, J.L., and Wright, J.R. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* Degrades Pulmonary Surfactant and Increases Conversion In Vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *32*, 128–134.

- Beaufort, N., Corvazier, E., Mlanaoindrou, S., de Bentzmann, S., and Pidard, D. (2013). Disruption of the Endothelial Barrier by Proteases from the Bacterial Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: Implication of Matrilysin and Receptor Cleavage. *PLoS ONE* 8.
- Beckert, U., Wolter, S., Hartwig, C., Bähre, H., Kaefer, V., Ladant, D., Frank, D.W., and Seifert, R. (2014). ExoY from *Pseudomonas aeruginosa* is a nucleotidyl cyclase with preference for cGMP and cUMP formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450, 870–874.
- Belyy, A., Raoux-Barbot, D., Saveanu, C., Namane, A., Ogryzko, V., Worpenberg, L., David, V., Henriot, V., Fellous, S., Merrifield, C., et al. (2016). Actin activates *Pseudomonas aeruginosa* ExoY nucleotidyl cyclase toxin and ExoY-like effector domains from MARTX toxins. *Nat. Commun.* 7, 13582.
- Belyy, A., Mechold, U., Renault, L., and Ladant, D. (2018a). ExoY, an actin-activated nucleotidyl cyclase toxin from *P. aeruginosa*: A minireview. *Toxicon* 149, 65–71.
- Belyy, A., Santecchia, I., Renault, L., Bourigault, B., Ladant, D., and Mechold, U. (2018b). The extreme C terminus of the *Pseudomonas aeruginosa* effector ExoY is crucial for binding to its eukaryotic activator, F-actin. *J. Biol. Chem.* 293, 19785–19796.
- Benson, M.A., Komar, S.M., Schmalzer, K.M., Casey, M.S., Frank, D.W., and Feix, J.B. (2011). Induced Conformational Changes in the Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III Toxin, ExoU. *Biophys. J.* 100, 1335–1343.
- Bertrand, Q., Job, V., Maillard, A.P., Imbert, L., Teulon, J.-M., Favier, A., Pellequer, J.-L., Huber, P., Attrée, I., and Dessen, A. (2020). Exolysin (ExlA) from *Pseudomonas aeruginosa* Punctures Holes into Target Membranes Using a Molten Globule Domain. *J. Mol. Biol.* 432, 4466–4480.
- Bhagirath, A.Y., Li, Y., Somayajula, D., Dadashi, M., Badr, S., and Duan, K. (2016). Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulm. Med.* 16.
- Bjarnsholt, T., Jensen, P.Ø., Fiandaca, M.J., Pedersen, J., Hansen, C.R., Andersen, C.B., Pressler, T., Givskov, M., and Høiby, N. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr. Pulmonol.* 44, 547–558.
- Blanc, D.S., Francioli, P., and Zanetti, G. (2007). Molecular Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the Intensive Care Units – A Review. *Open Microbiol. J.* 1, 8.
- 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.
- Boal, F., Zhang, H., Tessier, C., Scotti, P., and Lang, J. (2004). The Variable C-Terminus of Cysteine String Proteins Modulates Exocytosis and Protein–Protein Interactions. *Biochemistry* 43, 16212–16223.
- Boman, H.G., Nilsson, I., and Rasmuson, B. (1972). Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*. *Nature* 237, 232–235.
- Bonfield, T.L., Panuska, J.R., Konstan, M.W., Hilliard, K.A., Hilliard, J.B., Ghnaim, H., and Berger, M. (2012). Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*
- Bonomo, R.A., and Szabo, D. (2006). Mechanisms of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* Species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Infect. Dis.* 43, S49–S56.
- Botzenhart, K., and Döring, G. (1993). Ecology and Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. In *Pseudomonas Aeruginosa as an Opportunistic Pathogen*, M. Campa, M. Bendinelli, and H. Friedman, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 1–18.
- Bouillot, S., Munro, P., Gallet, B., Reboud, E., Cretin, F., Golovkine, G., Schoehn, G., Attrée, I., Lemichez, E., and Huber, P. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Exolysin promotes bacterial growth in lungs, alveolar damage and bacterial dissemination. *Sci. Rep.* 7, 2120.

- Bouillot, S., Pont, S., Gallet, B., Moriscot, C., Deruelle, V., Attrée, I., and Huber, P. (2020). Inflammasome activation by *Pseudomonas aeruginosa*'s ExlA pore-forming toxin is detrimental for the host. *Cell. Microbiol.* e13251.
- Breidenstein, E.B.M., Fuente-Núñez, C. de la, and Hancock, R.E.W. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* *19*, 419–426.
- Britigan, B.E., Roeder, T.L., Rasmussen, G.T., Shasby, D.M., McCormick, M.L., and Cox, C.D. (1992). Interaction of the *Pseudomonas aeruginosa* secretory products pyocyanin and pyochelin generates hydroxyl radical and causes synergistic damage to endothelial cells. Implications for *Pseudomonas*-associated tissue injury. *J. Clin. Invest.* *90*, 2187–2196.
- Britigan, B.E., Railsback, M.A., and Cox, C.D. (1999). The *Pseudomonas aeruginosa* Secretory Product Pyocyanin Inactivates $\alpha 1$ Protease Inhibitor: Implications for the Pathogenesis of Cystic Fibrosis Lung Disease. *Infect. Immun.* *67*, 1207–1212.
- Brown, H.A., Thomas, P.G., and Lindsley, C.W. (2017). Targeting phospholipase D in cancer, infection and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* *16*, 351–367.
- Bucior, I., Pielage, J.F., and Engel, J.N. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Pili and Flagella Mediate Distinct Binding and Signaling Events at the Apical and Basolateral Surface of Airway Epithelium. *PLoS Pathog.* *8*.
- Burgoyne, R.D., and Morgan, A. (2015). Cysteine string protein (CSP) and its role in preventing neurodegeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.* *40*, 153–159.
- Burke, J.E., and Dennis, E.A. (2009). Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J. Lipid Res.* *50*, S237–S242.
- Burress, H., Kellner, A., Guyette, J., Tatulian, S.A., and Teter, K. (2019). HSC70 and HSP90 chaperones perform complementary roles in translocation of the cholera toxin A1 subunit from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *J. Biol. Chem.* *294*, 12122–12131.
- Burrows, L.L. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action. *Annu. Rev. Microbiol.* *66*, 493–520.
- Burstein, D., Satanower, S., Simovitch, M., Belnik, Y., Zehavi, M., Yerushalmi, G., Ben-Aroya, S., Pupko, T., and Banin, E. (2015). Novel Type III Effectors in *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio* *6*.
- Cadoret, F., Ball, G., Douzi, B., and Voulhoux, R. (2014). Txc, a New Type II Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PA7, Is Regulated by the TtsS/TtsR Two-Component System and Directs Specific Secretion of the CbpE Chitin-Binding Protein. *J. Bacteriol.* *196*, 2376–2386.
- Caiazza, N.C., Shanks, R.M.Q., and O'Toole, G.A. (2005). Rhamnolipids Modulate Swarming Motility Patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *187*, 7351–7361.
- Carter, M.Q., Chen, J., and Lory, S. (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenicity Island PAPI-1 Is Transferred via a Novel Type IV Pilus. *J. Bacteriol.* *192*, 3249–3258.
- Casas, J., Gijón, M.A., Vigo, A.G., Crespo, M.S., Balsinde, J., and Balboa, M.A. (2006). Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Anchors Cytosolic Group IVA Phospholipase A2 to Perinuclear Membranes and Decreases Its Calcium Requirement for Translocation in Live Cells. *Mol. Biol. Cell* *17*, 155–162.
- Chamberlain, L.H., and Burgoyne, R.D. (1997). Activation of the ATPase activity of heat-shock proteins Hsc70/Hsp70 by cysteine-string protein. *Biochem. J.* *322*, 853–858.
- Chamberlain, L.H., and Burgoyne, R.D. (1998). The cysteine-string domain of the secretory vesicle cysteine-string protein is required for membrane targeting. *Biochem. J.* *335*, 205–209.
- Chen, L., Zou, Y., She, P., and Wu, Y. (2015). Composition, function, and regulation of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Res.* *172*, 19–25.

- Cheng, J., Goldstein, R., Stec, B., Gershenson, A., and Roberts, M.F. (2012). Competition between Anion Binding and Dimerization Modulates *Staphylococcus aureus* Phosphatidylinositol-specific Phospholipase C Enzymatic Activity. *J. Biol. Chem.* *287*, 40317–40327.
- Cho, J.-S., Han, I.-H., Lee, H.R., and Lee, H.-M. (2014). Prostaglandin E2 Induces IL-6 and IL-8 Production by the EP Receptors/Akt/NF- κ B Pathways in Nasal Polyp-Derived Fibroblasts. *Allergy Asthma Immunol. Res.* *6*, 449–457.
- Choi, Y., Paik, J.H., Kim, J.H., Han, S.B., and Durey, A. (2018). Clinical Predictors of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia in Emergency Department. *Emerg. Med. Int.* *2018*, 1–6.
- Chung, J.W., Piao, Z.-H., Yoon, S.R., Kim, M.S., Jeong, M., Lee, S.H., Min, J.K., Kim, J.W., Cho, Y.-H., Kim, J.C., et al. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* Eliminates Natural Killer Cells via Phagocytosis-Induced Apoptosis. *PLoS Pathog.* *5*.
- Cole, S.J., Records, A.R., Orr, M.W., Linden, S.B., and Lee, V.T. (2014). Catheter-Associated Urinary Tract Infection by *Pseudomonas aeruginosa* Is Mediated by Exopolysaccharide-Independent Biofilms. *Infect. Immun.* *82*, 2048–2058.
- Comolli, J.C., Waite, L.L., Mostov, K.E., and Engel, J.N. (1999a). Pili Binding to Asialo-GM1 on Epithelial Cells Can Mediate Cytotoxicity or Bacterial Internalization by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* *67*, 3207–3214.
- Comolli, J.C., Hauser, A.R., Waite, L., Whitchurch, C.B., Mattick, J.S., and Engel, J.N. (1999b). *Pseudomonas aeruginosa* Gene Products PilT and PilU Are Required for Cytotoxicity In Vitro and Virulence in a Mouse Model of Acute Pneumonia. *Infect. Immun.* *67*, 3625–3630.
- Conrad, J.C., Gibiansky, M.L., Jin, F., Gordon, V.D., Motto, D.A., Mathewson, M.A., Stopka, W.G., Zelasko, D.C., Shrout, J.D., and Wong, G.C.L. (2011). Flagella and Pili-Mediated Near-Surface Single-Cell Motility Mechanisms in *P. aeruginosa*. *Biophys. J.* *100*, 1608–1616.
- Cosson, P., Zulianello, L., Join-Lambert, O., Faurisson, F., Gebbie, L., Benghezal, M., van Delden, C., Kocjancic Curty, L., and Köhler, T. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Analyzed in a *Dictyostelium discoideum* Host System. *J. Bacteriol.* *184*, 3027–3033.
- Cowell, B.A., Evans, D.J., and Fleiszig, S.M.J. (2005). Actin cytoskeleton disruption by ExoY and its effects on *Pseudomonas aeruginosa* invasion. *FEMS Microbiol. Lett.* *250*, 71–76.
- Cowles, K.N., and Gitai, Z. (2010). Surface association and the MreB cytoskeleton regulate pilus production, localization, and function in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* *76*, 1411–1426.
- Cowles, K.N., Moser, T.S., Siryaporn, A., Nyakudarika, N., Dixon, W., Turner, J.J., and Gitai, Z. (2013). The putative Poc complex controls two distinct *Pseudomonas aeruginosa* polar motility mechanisms. *Mol. Microbiol.* *90*, 923–938.
- Crespo-Yañez, X., Aguilar-Gurrieri, C., Jacomin, A.-C., Journet, A., Mortier, M., Taillebourg, E., Soleilhac, E., Weissenhorn, W., and Fauvarque, M.-O. (2018). CHMP1B is a target of USP8/UBPY regulated by ubiquitin during endocytosis. *PLoS Genet.* *14*.
- Cullen, L., and McClean, S. (2015). Bacterial Adaptation during Chronic Respiratory Infections. *Pathog. Basel Switz.* *4*, 66–89.
- Cuzick, A., Stirling, F.R., Lindsay, S.L., and Evans, T.J. (2006). The Type III Pseudomonas Exotoxin U Activates the c-Jun NH2-Terminal Kinase Pathway and Increases Human Epithelial Interleukin-8 Production. *Infect. Immun.* *74*, 4104–4113.
- Czech, M.P. (2000). PIP2 and PIP3: Complex Roles at the Cell Surface. *Cell* *100*, 603–606.
- Dacheux, D., Goure, J., Chabert, J., Usson, Y., and Attree, I. (2001). Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Mol. Microbiol.* *40*, 76–85.

- D'Agata, E. (2015). 221 - *Pseudomonas aeruginosa* and Other *Pseudomonas* Species. In Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition), J.E. Bennett, R. Dolin, and M.J. Blaser, eds. (Philadelphia: Content Repository Only!), pp. 2518-2531.e3.
- Dal Peraro, M., and van der Goot, F.G. (2016). Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. *Nat. Rev. Microbiol.* *14*, 77–92.
- D'Argenio, D.A., Gallagher, L.A., Berg, C.A., and Manoil, C. (2001). *Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J. Bacteriol.* *183*, 1466–1471.
- Dasgupta, N., Wolfgang, M.C., Goodman, A.L., Arora, S.K., Jyot, J., Lory, S., and Ramphal, R. (2003). A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* *50*, 809–824.
- Davey, M.E., Caiazza, N.C., and O'Toole, G.A. (2003). Rhamnolipid Surfactant Production Affects Biofilm Architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* *185*, 1027–1036.
- David, A., Risitano, D.C., Mazzeo, G., Sinardi, L., Venuti, F.S., and Sinardi, A.U. (2005). Central venous catheters and infections. *Minerva Anesthesiol.* *71*, 561–564.
- Davies, G., Wells, A.U., Doffman, S., Watanabe, S., and Wilson, R. (2006). The effect of *Pseudomonas aeruginosa* on pulmonary function in patients with bronchiectasis. *Eur. Respir. J.* *28*, 974–979.
- Deng, Q., and Barbieri, J.T. (2008). Modulation of host cell endocytosis by the type-III cytotoxin, *Pseudomonas* ExoS. *Traffic Cph. Den.* *9*, 1948–1957.
- Deng, Q., Zhang, Y., and Barbieri, J.T. (2007). Intracellular trafficking of *Pseudomonas* ExoS, a type III cytotoxin. *Traffic Cph. Den.* *8*, 1331–1345.
- Denning, G.M., Wollenweber, L.A., Railsback, M.A., Cox, C.D., Stoll, L.L., and Britigan, B.E. (1998a). *Pseudomonas* Pyocyanin Increases Interleukin-8 Expression by Human Airway Epithelial Cells. *Infect. Immun.* *66*, 5777–5784.
- Denning, G.M., Railsback, M.A., Rasmussen, G.T., Cox, C.D., and Britigan, B.E. (1998b). *Pseudomonas* pyocyanine alters calcium signaling in human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* *274*, L893–L900.
- Dennis, E.A. (1994). Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* *269*, 13057–13060.
- Dessen, A., Tang, J., Schmidt, H., Stahl, M., Clark, J.D., Seehra, J., and Somers, W.S. (1999). Crystal Structure of Human Cytosolic Phospholipase A2 Reveals a Novel Topology and Catalytic Mechanism. *Cell* *97*, 349–360.
- Dhahir, F.J., Cook, D.B., and Self, C.H. (1992). Amplified enzyme-linked immunoassay of human proinsulin in serum (detection limit: 0.1 pmol/L). *Clin. Chem.* *38*, 227–232.
- Di Paolo, G., and De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* *443*, 651–657.
- Diaz, M.H., and Hauser, A.R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxin ExoU Is Injected into Phagocytic Cells during Acute Pneumonia. *Infect. Immun.* *78*, 1447–1456.
- Diaz, M.H., Shaver, C.M., King, J.D., Musunuri, S., Kazzaz, J.A., and Hauser, A.R. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* Induces Localized Immunosuppression during Pneumonia. *Infect. Immun.* *76*, 4414–4421.
- Diaz, M.R., King, J.M., and Yahr, T.L. (2011). Intrinsic and Extrinsic Regulation of Type III Secretion Gene Expression in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Front. Microbiol.* *2*.
- Dickson, E.J., Jensen, J.B., and Hille, B. (2014). Golgi and plasma membrane pools of PI(4)P contribute to plasma membrane PI(4,5)P2 and maintenance of KCNQ2/3 ion channel current. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*,

E2281–E2290.

Dikic, I., Wakatsuki, S., and Walters, K.J. (2009). Ubiquitin binding domains — from structures to functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 659–671.

DiMango, E., Zar, H.J., Bryan, R., and Prince, A. (1995). Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J. Clin. Invest.* *96*, 2204–2210.

Dortet, L., Lombardi, C., Cretin, F., Dessen, A., and Filloux, A. (2018). Pore-forming activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system translocon alters the host epigenome. *Nat. Microbiol.* *3*, 378–386.

Douzi, B., Filloux, A., and Voulhoux, R. (2012). On the path to uncover the bacterial type II secretion system. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *367*, 1059–1072.

Dowler, S., Currie, R.A., Campbell, D.G., Deak, M., Kular, G., Downes, C.P., and Alessi, D.R. (2000). Identification of pleckstrin-homology-domain-containing proteins with novel phosphoinositide-binding specificities. *Biochem. J.* *351*, 19–31.

Doyle, T.B., Hawkins, A.C., and McCarter, L.L. (2004). The Complex Flagellar Torque Generator of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *186*, 6341–6350.

Drake, D., and Montie, T.C. (1988). Flagella, motility and invasive virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* *134*, 43–52.

Dunne, W.M. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* *15*, 155–166.

Duong, F., Bonnet, E., Géli, V., Lazdunski, A., Murgier, M., and Filloux, A. (2001). The AprX protein of *Pseudomonas aeruginosa*: a new substrate for the Apr type I secretion system. *Gene* *262*, 147–153.

Elsen, S., Collin-Faure, V., Gidrol, X., and Lemercier, C. (2013). The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* activates the DNA double-strand break signaling and repair pathway in infected cells. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *70*, 4385–4397.

Elsen, S., Huber, P., Bouillot, S., Couté, Y., Fournier, P., Dubois, Y., Timsit, J.-F., Maurin, M., and Attrée, I. (2014). A Type III Secretion Negative Clinical Strain of *Pseudomonas aeruginosa* Employs a Two-Partner Secreted Exolysin to Induce Hemorrhagic Pneumonia. *Cell Host Microbe* *15*, 164–176.

El-Solh, A.A., Hattemer, A., Hauser, A.R., Alhajhusain, A., and Vora, H. (2012). CLINICAL OUTCOMES OF TYPE III PSEUDOMONAS AERUGINOSA BACTEREMIA. *Crit. Care Med.* *40*, 1157–1163.

Emerson, J., Rosenfeld, M., McNamara, S., Ramsey, B., and Gibson, R.L. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* *34*, 91–100.

Epelman, S., Bruno, T.F., Neely, G.G., Woods, D.E., and Mody, C.H. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* Exoenzyme S Induces Transcriptional Expression of Proinflammatory Cytokines and Chemokines. *Infect. Immun.* *68*, 4811–4814.

Epelman, S., Stack, D., Bell, C., Wong, E., Neely, G.G., Krutzik, S., Miyake, K., Kubes, P., Zbytniuk, L.D., Ma, L.L., et al. (2004). Different Domains of *Pseudomonas aeruginosa* Exoenzyme S Activate Distinct TLRs. *J. Immunol.* *173*, 2031–2040.

Ernst, K., Schmid, J., Beck, M., Hägele, M., Hohwieler, M., Hauff, P., Ückert, A.K., Anastasia, A., Fauler, M., Jank, T., et al. (2017). Hsp70 facilitates trans-membrane transport of bacterial ADP-ribosylating toxins into the cytosol of mammalian cells. *Sci. Rep.* *7*, 2724.

Faure, L.M., Garvis, S., de Bentzmann, S., and Bigot, S. (2014). Characterization of a novel two-partner secretion system implicated in the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, *160*, 1940–1952.

Feix, J.B., Kohn, S., Tessmer, M.H., Anderson, D.M., and Frank, D.W. (2019). Conformational Changes and Membrane Interaction of the Bacterial Phospholipase, ExoU: Characterization by Site-Directed Spin Labeling.

Cell Biochem. Biophys. 77, 79–87.

Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H., and Prince, A. (1998). Role of Flagella in Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* Pulmonary Infection. *Infect. Immun.* 66, 43–51.

Feltman, H., Schulert, G., Khan, S., Jain, M., Peterson, L., and Hauser, A.R. (2001). Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 147, 2659–2669.

Fernández-Barat, L., Ferrer, M., De Rosa, F., Gabarrús, A., Esperatti, M., Terraneo, S., Rinaudo, M., Li Bassi, G., and Torres, A. (2017). Intensive care unit-acquired pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* with and without multidrug resistance. *J. Infect.* 74, 142–152.

Ferrell, J.E., and Huestis, W.H. (1984). Phosphoinositide metabolism and the morphology of human erythrocytes. *J. Cell Biol.* 98, 1992–1998.

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

Finck-Barbançon, V., and Frank, D.W. (2001). Multiple Domains Are Required for the Toxic Activity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU. *J. Bacteriol.* 183, 4330–4344.

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

Finck-Barbançon, V., Yahr, T.L., and Frank, D.W. (1998). Identification and Characterization of SpcU, a Chaperone Required for Efficient Secretion of the ExoU Cytotoxin. *J. Bacteriol.* 180, 6224–6231.

Finley, D., Ulrich, H.D., Sommer, T., and Kaiser, P. (2012). The Ubiquitin–Proteasome System of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 192, 319–360.

Fleiszig, S.M., Wiener-Kronish, J.P., Miyazaki, H., Vallas, V., Mostov, K.E., Kanada, D., Sawa, T., Yen, T.S., and Frank, D.W. (1997). *Pseudomonas aeruginosa*-mediated cytotoxicity and invasion correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S. *Infect. Immun.* 65, 579–586.

Floret, N., Bertrand, X., Thouverez, M., and Talon, D. (2009). Infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* : origine exogène ou endogène de la bactérie responsable ? *Pathol. Biol.* 57, 9–12.

Fontaine, S.N., Zheng, D., Sabbagh, J.J., Martin, M.D., Chaput, D., Darling, A., Trotter, J.H., Stothert, A.R., Nordhues, B.A., Lussier, A., et al. (2016). DnaJ/Hsc70 chaperone complexes control the extracellular release of neurodegenerative-associated proteins. *EMBO J.* 35, 1537–1549.

Foulkes, D.M., McLean, K., Haneef, A.S., Fernig, D.G., Winstanley, C., Berry, N., and Kaye, S.B. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* Toxin ExoU as a Therapeutic Target in the Treatment of Bacterial Infections. *Microorganisms* 7.

Foulkes, D.M., McLean, K., Harris, J., Haneef, A.S., Fernig, D.G., Winstanley, C., Berry, N., and Kaye, S.B. (2020). Evaluation of ExoU inhibitors in a *Pseudomonas aeruginosa* scratch infection assay. *BioRxiv* 2020.06.24.170373.

Frank, D.W., Vallis, A., Wiener-Kronish, J.P., Roy-Burman, A., Spack, E.G., Mullaney, B.P., Megdoud, M., Marks, J.D., Fritz, R., and Sawa, T. (2002). Generation and Characterization of a Protective Monoclonal Antibody to *Pseudomonas aeruginosa* PcrV. *J. Infect. Dis.* 186, 64–73.

Franzetti, F., Cernuschi, M., Esposito, R., and Moroni, M. (1992). *Pseudomonas* infections in patients with AIDS and AIDS-related complex. *J. Intern. Med.* 231, 437–443.

Frazier, A.A., Wisner, M.A., Malmberg, N.J., Victor, K.G., Fanucci, G.E., Nalefski, E.A., Falke, J.J., and Cafiso, D.S. (2002). Membrane Orientation and Position of the C2 Domain from cPLA2 by Site-Directed Spin Labeling. *Biochemistry* 41, 6282–6292.

- Fu, H., Coburn, J., and Collier, R.J. (1993). The eukaryotic host factor that activates exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is a member of the 14-3-3 protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *90*, 2320–2324.
- Fujita, K., Akino, T., and Yoshioka, H. (1988). Characteristics of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* *56*, 1385–1387.
- Funk, C.D. (2001). Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. *Science* *294*, 1871–1875.
- Galán, J.E., Lara-Tejero, M., Marlovits, T.C., and Wagner, S. (2014). Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annu. Rev. Microbiol.* *68*, 415–438.
- Galle, M., Jin, S., Bogaert, P., Haegman, M., Vandenabeele, P., and Beyaert, R. (2012a). The *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System Has an Exotoxin S/T/Y Independent Pathogenic Role during Acute Lung Infection. *PLoS ONE* *7*.
- Galle, M., Carpentier, I., and Beyaert, R. (2012b). Structure and Function of the Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Protein Pept. Sci.* *13*, 831–842.
- Ganter, M.T., Roux, J., Su, G., Lynch, S.V., Deutschman, C.S., Weiss, Y.G., Christiaans, S.C., Myazawa, B., Kipnis, E., Wiener-Kronish, J.P., et al. (2009). Role of Small GTPases and $\alpha\beta 5$ Integrin in *Pseudomonas aeruginosa*-Induced Increase in Lung Endothelial Permeability. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *40*, 108–118.
- Gao, Y., Guan, W., Zhu, Y., Chen, R., and Zhang, G. (2018). Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with bronchiectasis: prevalence, risk factors and prognostic implications. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* *13*, 237–246.
- Garcia, M., Morello, E., Garnier, J., Barrault, C., Garnier, M., Burucoa, C., Lecron, J.-C., Si-Tahar, M., Bernard, F.-X., and Bodet, C. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* flagellum is critical for invasion, cutaneous persistence and induction of inflammatory response of skin epidermis. *Virulence* *9*, 1163–1175.
- 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.
- Gaullier, J.M., Simonsen, A., D'Arrigo, A., Bremnes, B., Stenmark, H., and Aasland, R. (1998). FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature* *394*, 432–433.
- Geissler, B., Tungekar, R., and Satchell, K.J.F. (2010). Identification of a conserved membrane localization domain within numerous large bacterial protein toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 5581–5586.
- Geissler, B., Ahrens, S., and Satchell, K.J.F. (2012). Plasma membrane association of three classes of bacterial toxins is mediated by a basic-hydrophobic motif. *Cell. Microbiol.* *14*, 286–298.
- Gellatly, S.L., and Hancock, R.E.W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog. Dis.* *67*, 159–173.
- Gendrin, C., Contreras-Martel, C., Bouillot, S., Elsen, S., Lemaire, D., Skoufias, D.A., Huber, P., Attree, I., and Dessen, A. (2012). Structural basis of cytotoxicity mediated by the type III secretion toxin ExoU from *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* *8*, e1002637.
- Gessard, C. (1984). On the Blue and Green Coloration that Appears on Bandages. *Rev. Infect. Dis.* *6*, S775–S776.
- Gloag, E.S., Turnbull, L., Huang, A., Vallotton, P., Wang, H., Nolan, L.M., Mililli, L., Hunt, C., Lu, J., Osvath, S.R., et al. (2013). Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 11541–11546.
- Godi, A., Campli, A.D., Konstantakopoulos, A., Tullio, G.D., Alessi, D.R., Kular, G.S., Daniele, T., Marra, P., Lucocq, J.M., and Matteis, M.A.D. (2004). FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P. *Nat. Cell Biol.* *6*, 393–404.

- Golebiewska, U., Nyako, M., Woturski, W., Zaitseva, I., and McLaughlin, S. (2008). Diffusion coefficient of fluorescent phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the plasma membrane of cells. *Mol. Biol. Cell* 19, 1663–1669.
- Golovkine, G., Faudry, E., Bouillot, S., Voulhoux, R., Attrée, I., and Huber, P. (2014). VE-Cadherin Cleavage by LasB Protease from *Pseudomonas aeruginosa* Facilitates Type III Secretion System Toxicity in Endothelial Cells. *PLOS Pathog.* 10, e1003939.
- Golovkine, G., Faudry, E., Bouillot, S., Elsen, S., Attrée, I., and Huber, P. (2016a). *Pseudomonas aeruginosa* Transmigrates at Epithelial Cell-Cell Junctions, Exploiting Sites of Cell Division and Senescent Cell Extrusion. *PLOS Pathog.* 12, e1005377.
- Golovkine, G., Lemelle, L., Burny, C., Vaillant, C., Paliérne, J.-F., Place, C., and Huber, P. (2016b). Host cell surfaces induce a Type IV pili-dependent alteration of bacterial swimming. *Sci. Rep.* 6, 38950.
- Golovkine, G., Reboud, E., and Huber, P. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* Takes a Multi-Target Approach to Achieve Junction Breach. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7.
- Golub, T., and Caroni, P. (2005). PI(4,5)P₂-dependent microdomain assemblies capture microtubules to promote and control leading edge motility. *J. Cell Biol.* 169, 151–165.
- Goure, J., Pastor, A., Faudry, E., Chabert, J., Dessen, A., and Attree, I. (2004). The V Antigen of *Pseudomonas aeruginosa* Is Required for Assembly of the Functional PopB/PopD Translocation Pore in Host Cell Membranes. *Infect. Immun.* 72, 4741–4750.
- Greaves, J., Lemonidis, K., Gorleku, O.A., Cruchaga, C., Grefen, C., and Chamberlain, L.H. (2012). Palmitoylation-induced Aggregation of Cysteine-string Protein Mutants That Cause Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. *J. Biol. Chem.* 287, 37330–37339.
- Green, E.R., and Meccas, J. (2016). Bacterial Secretion Systems – An overview. *Microbiol. Spectr.* 4.
- Green, M., Apel, A., and Stapleton, F. (2008). Risk factors and causative organisms in microbial keratitis. *Cornea* 27, 22–27.
- Gundersen, C.B. (2020). Cysteine string proteins. *Prog. Neurobiol.* 188, 101758.
- Gupta, S.K., Berk, R.S., Masinick, S., and Hazlett, L.D. (1994). Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1. *Infect. Immun.* 62, 4572–4579.
- Haas, B., Kraut, J., Marks, J., Zanker, S.C., and Castignetti, D. (1991). Siderophore presence in sputa of cystic fibrosis patients. *Infect. Immun.* 59, 3997–4000.
- Hajjar, A.M., Ernst, R.K., Tsai, J.H., Wilson, C.B., and Miller, S.I. (2002). Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat. Immunol.* 3, 354–359.
- Halavaty, A.S., Borek, D., Tyson, G.H., Veessenmeyer, J.L., Shuvalova, L., Minasov, G., Otwinowski, Z., Hauser, A.R., and Anderson, W.F. (2012). Structure of the Type III Secretion Effector Protein ExoU in Complex with Its Chaperone SpcU. *PLoS ONE* 7.
- Halder, P.K., Roy, C., and Datta, S. (2019). Structural and functional characterization of type three secretion system ATPase PscN and its regulator PscL from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 87, 276–288.
- Harris, A.A., Goodman, L., and Levin, S. (1984). Community-acquired *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia associated with the use of a home humidifier. *West. J. Med.* 141, 521–523.
- Hatchette, T.F., Gupta, R., and Marrie, T.J. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* community-acquired pneumonia in previously healthy adults: case report and review of the literature. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 31, 1349–1356.

- Haug, G., Leemhuis, J., Tiemann, D., Meyer, D.K., Aktories, K., and Barth, H. (2003). The Host Cell Chaperone Hsp90 Is Essential for Translocation of the Binary Clostridium botulinum C2 Toxin into the Cytosol. *J. Biol. Chem.* *278*, 32266–32274.
- Hauser, A.R. (2009). The Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*: Infection by Injection. *Nat. Rev. Microbiol.* *7*, 654–665.
- Hauser, A.R., and Engel, J.N. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* Induces Type-III-Secretion-Mediated Apoptosis of Macrophages and Epithelial Cells. *Infect. Immun.* *67*, 5530–5537.
- Hauser, A.R., and Ozer, E.A. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. Rev. Microbiol.* *9*.
- Hauser, A.R., Kang, P.J., and Engel, J.N. (1998). PepA, a secreted protein of *Pseudomonas aeruginosa*, is necessary for cytotoxicity and virulence. *Mol. Microbiol.* *27*, 807–818.
- Hauser, A.R., Cobb, E., Bodí, M., Mariscal, D., Vallés, J., Engel, J.N., and Rello, J. (2002). Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Read Online Crit. Care Med. Soc. Crit. Care Med.* *30*, 521–528.
- Hayashi, N., Nishizawa, H., Kitao, S., Deguchi, S., Nakamura, T., Fujimoto, A., Shikata, M., and Gotoh, N. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* injects type III effector ExoS into epithelial cells through the function of type IV pili. *FEBS Lett.* *589*, 890–896.
- He, C., Zhou, Y., Liu, F., Liu, H., Tan, H., Jin, S., Wu, W., and Ge, B. (2017). Bacterial Nucleotidyl Cyclase Inhibits the Host Innate Immune Response by Suppressing TAK1 Activation. *Infect. Immun.* *85*.
- He, J., Baldini, R.L., Déziel, E., Saucier, M., Zhang, Q., Liberati, N.T., Lee, D., Urbach, J., Goodman, H.M., and Rahme, L.G. (2004). The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 2530–2535.
- Heiniger, R.W., Winther-Larsen, H.C., Pickles, R.J., Koomey, M., and Wolfgang, M.C. (2010). Infection of human mucosal tissue by *Pseudomonas aeruginosa* requires sequential and mutually dependent virulence factors and a novel pilus-associated adhesin. *Cell. Microbiol.* *12*, 1158–1173.
- Henderson, W.R. (1987). Eicosanoids and Lung Inflammation. *Am. Rev. Respir. Dis.* *135*, 1176–1185.
- Henmi, Y., Morikawa, Y., Oe, N., Ikeda, N., Fujita, A., Takei, K., Minogue, S., and Tanabe, K. (2016). PtdIns4KII α generates endosomal PtdIns(4)P and is required for receptor sorting at early endosomes. *Mol. Biol. Cell* *27*, 990–1001.
- Hennessy, F., Cheetham, M.E., Dirr, H.W., and Blatch, G.L. (2000). Analysis of the levels of conservation of the J domain among the various types of DnaJ-like proteins. *Cell Stress Chaperones* *5*, 347–358.
- Henriksson, M.L., Rosqvist, R., Telepnev, M., Wolf-Watz, H., and Hallberg, B. (2000a). Ras effector pathway activation by epidermal growth factor is inhibited in vivo by exoenzyme S ADP-ribosylation of Ras. *Biochem. J.* *347*, 217–222.
- Henriksson, M.L., Trollér, U., and Hallberg, B. (2000b). 14-3-3 proteins are required for the inhibition of Ras by exoenzyme S. *Biochem. J.* *349*, 697–701.
- Henry, R.L., Mellis, C.M., and Petrovic, L. (1992). Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* is a marker of poor survival in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* *12*, 158–161.
- Heo, W.D., Inoue, T., Park, W.S., Kim, M.L., Park, B.O., Wandless, T.J., and Meyer, T. (2006). PI(3,4,5)P3 and PI(4,5)P2 Lipids Target Proteins with Polybasic Clusters to the Plasma Membrane. *Science* *314*, 1458–1461.
- Hertle, R. (2005). The family of Serratia type pore forming toxins. *Curr. Protein Pept. Sci.* *6*, 313–325.
- Heyland, D.K., Cook, D.J., Griffith, L., Keenan, S.P., and Brun-Buisson, C. (1999). The Attributable Morbidity and Mortality of Ventilator-Associated Pneumonia in the Critically Ill Patient. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *159*,

1249–1256.

Hogardt, M., and Heesemann, J. (2010). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 300, 557–562.

Holm, B.A., Keicher, L., Liu, M.Y., Sokolowski, J., and Enhorning, G. (1991). Inhibition of pulmonary surfactant function by phospholipases. *J. Appl. Physiol.* 71, 317–321.

Holm, J.P.Y., Hilberg, O., Noerskov-Lauritsen, N., and Bendstrup, E. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* in patients without cystic fibrosis is strongly associated with chronic obstructive lung disease. *Dan. Med. J.* 60, A4636.

Hong, Y., and Ghebrehiwet, B. (1992). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 62, 133–138.

Hood, R.D., Singh, P., Hsu, F., Güvener, T., Carl, M.A., Trinidad, R.R.S., Silverman, J.M., Ohlson, B.B., Hicks, K.G., Plemel, R.L., et al. (2010). A Type VI Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Targets a Toxin to Bacteria. *Cell Host Microbe* 7, 25–37.

Howell, H.A., Logan, L.K., and Hauser, A.R. (2013). Type III Secretion of ExoU Is Critical during Early *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *MBio* 4.

Huber, P., Bouillot, S., Elsen, S., and Attrée, 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.

Hurley, J.H., Lee, S., and Prag, G. (2006). Ubiquitin-binding domains. *Biochem. J.* 399, 361–372.

Hwang, W., and Yoon, S.S. (2019). Virulence Characteristics and an Action Mode of Antibiotic Resistance in Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* 9.

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

Ince, D., Sutterwala, F.S., and Yahr, T.L. (2015). Secretion of Flagellar Proteins by the *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion-Injectisome System. *J. Bacteriol.* 197, 2003–2011.

Ingólfsson, H.I., Melo, M.N., van Eerden, F.J., Arnarez, C., Lopez, C.A., Wassenaar, T.A., Periolo, X., de Vries, A.H., Tieleman, D.P., and Marrink, S.J. (2014). Lipid organization of the plasma membrane. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 14554–14559.

Jander, G., Rahme, L.G., and Ausubel, F.M. (2000). Positive Correlation between Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Mutants in Mice and Insects. *J. Bacteriol.* 182, 3843–3845.

Jensen, P.Ø., Bjarnsholt, T., Phipps, R., Rasmussen, T.B., Calum, H., Christoffersen, L., Moser, C., Williams, P., Pressler, T., Givskov, M., et al. (2007). Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Read. Engl.* 153, 1329–1338.

Jeon, J., Kim, Y.-J., Shin, H., and Ha, U.-H. (2017). T3SS effector ExoY reduces inflammasome-related responses by suppressing bacterial motility and delaying activation of NF- κ B and caspase-1. *FEBS J.* 284, 3392–3403.

Jia, J., Alaoui-El-Azher, M., Chow, M., Chambers, T.C., Baker, H., and Jin, S. (2003). c-Jun NH2-Terminal Kinase-Mediated Signaling Is Essential for *Pseudomonas aeruginosa* ExoS-Induced Apoptosis. *Infect. Immun.* 71, 3361–3370.

Jiang, F., Waterfield, N.R., Yang, J., Yang, G., and Jin, Q. (2014). A *Pseudomonas aeruginosa* Type VI Secretion Phospholipase D Effector Targets Both Prokaryotic and Eukaryotic Cells. *Cell Host Microbe* 15, 600–610.

Jiménez-Atiénzar, M., Cabanes, J., Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F., and Pérez-Gilabert, M.

- (2003). Determination of the phospholipase activity of patatin by a continuous spectrophotometric assay. *Lipids* 38, 677–682.
- Johnson, K.A., Taghon, G.J.F., Scott, J.L., and Stahelin, R.V. (2016). The Ebola Virus matrix protein, VP40, requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) for extensive oligomerization at the plasma membrane and viral egress. *Sci. Rep.* 6.
- Johnson, M.D.L., Garrett, C.K., Bond, J.E., Coggan, K.A., Wolfgang, M.C., and Redinbo, M.R. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* PilY1 Binds Integrin in an RGD- and Calcium-Dependent Manner. *PLoS ONE* 6.
- Joseph, R., Naugolny, A., Feldman, M., Herzog, I.M., Fridman, M., and Cohen, Y. (2016). Cationic Pillararenes Potently Inhibit Biofilm Formation without Affecting Bacterial Growth and Viability. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 754–757.
- Jun, S.-R., Wassenaar, T.M., Nookaew, I., Hauser, L., Wanchai, V., Land, M., Timm, C.M., Lu, T.-Y.S., Schadt, C.W., Doktycz, M.J., et al. (2016). Diversity of *Pseudomonas* Genomes, Including Populus-Associated Isolates, as Revealed by Comparative Genome Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 375–383.
- Jyot, J., Balloy, V., Jouvion, G., Verma, A., Touqui, L., Huerre, M., Chignard, M., and Ramphal, R. (2011). Type II Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*: In Vivo Evidence of a Significant Role in Death Due to Lung Infection. *J. Infect. Dis.* 203, 1369–1377.
- Kale, S.D., Gu, B., Capelluto, D.G.S., Dou, D., Feldman, E., Rumore, A., Arredondo, F.D., Hanlon, R., Fudal, I., Rouxel, T., et al. (2010). External lipid PI3P mediates entry of eukaryotic pathogen effectors into plant and animal host cells. *Cell* 142, 284–295.
- Kanthakumar, K., Taylor, G.W., Cundell, D.R., Dowling, R.B., Johnson, M., Cole, P.J., and Wilson, R. (1996). The effect of bacterial toxins on levels of intracellular adenosine nucleotides and human ciliary beat frequency. *Pulm. Pharmacol.* 9, 223–230.
- Karlberg, T., Hornyak, P., Pinto, A.F., Milanova, S., Ebrahimi, M., Lindberg, M., Püllen, N., Nordström, A., Löverli, E., Caraballo, R., et al. (2018). 14-3-3 proteins activate *Pseudomonas* exotoxins-S and -T by chaperoning a hydrophobic surface. *Nat. Commun.* 9, 3785.
- Katan, M., and Williams, R.L. (1997). Phosphoinositide-specific phospholipase C: structural basis for catalysis and regulatory interactions. *Semin. Cell Dev. Biol.* 8, 287–296.
- Kato, J., Kim, H.-E., Takiguchi, N., Kuroda, A., and Ohtake, H. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* as a model microorganism for investigation of chemotactic behaviors in ecosystem. *J. Biosci. Bioeng.* 106, 1–7.
- Kaufman, M.R., Jia, J., Zeng, L., Ha, U., Chow, M., and Jin, S. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* mediated apoptosis requires the ADP-ribosylating activity of ExoS. *Microbiology*, 146, 2531–2541.
- Kawahara, K., Hohjoh, H., Inazumi, T., Tsuchiya, S., and Sugimoto, Y. (2015). Prostaglandin E₂-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1851, 414–421.
- Kazmierczak, B.I., and Engel, J.N. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* ExoT Acts In Vivo as a GTPase-Activating Protein for RhoA, Rac1, and Cdc42. *Infect. Immun.* 70, 2198–2205.
- Kearns, D.B., Robinson, J., and Shimkets, L.J. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* Exhibits Directed Twitching Motility Up Phosphatidylethanolamine Gradients. *J. Bacteriol.* 183, 763–767.
- Kellner, A., Taylor, M., Banerjee, T., Britt, C.B.T., and Teter, K. (2019). A binding motif for Hsp90 in the A chains of ADP-ribosylating toxins that move from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell. Microbiol.* 21, e13074.
- Kerem, E., Corey, M., Gold, R., and Levison, H. (1990). Pulmonary function and clinical course in patients with cystic fibrosis after pulmonary colonization with *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Pediatr.* 116, 714–719.

- Kessler, E., Safrin, M., Abrams, W.R., Rosenbloom, J., and Ohman, D.E. (1997). Inhibitors and specificity of *Pseudomonas aeruginosa* LasA. *J. Biol. Chem.* *272*, 9884–9889.
- Khanppnavar, B., and Datta, S. (2018). Crystal structure and substrate specificity of ExoY, a unique T3SS mediated secreted nucleotidyl cyclase toxin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1862*, 2090–2103.
- Kheir, S., Villeret, B., Serafini, N., Voulhoux, R., Verdugo, I.G., Santo, J.D., and Sallenave, J.-M. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* LasB subverts innate immunity in alveolar macrophages and epithelial cells. *Eur. Respir. J.* *52*.
- Kida, Y., Higashimoto, Y., Inoue, H., Shimizu, T., and Kuwano, K. (2008). A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF- κ B through protease-activated receptors. *Cell. Microbiol.* *10*, 1491–1504.
- Kida, Y., Shimizu, T., and Kuwano, K. (2011). Cooperation between LepA and PlcH Contributes to the In Vivo Virulence and Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in Mice. *Infect. Immun.* *79*, 211–219.
- Kim, D., Baek, J., Song, J., Byeon, H., Min, H., and Min, K.H. (2014). Identification of arylsulfonamides as ExoU inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *24*, 3823–3825.
- Kim, J., Ahn, K., Min, S., Jia, J., Ha, U., Wu, D., and Jin, S. (2005). Factors triggering type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, *151*, 3575–3587.
- Kipnis, E., Sawa, T., and Wiener-Kronish, J. (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Médecine Mal. Infect.* *36*, 78–91.
- Kirmusaoglu, S., Yurdugül, S., Metin, A., and Vehid, S. (2017). The Effect of Urinary Catheters on Microbial Biofilms and Catheter Associated Urinary Tract Infections. *Urol. J.* *14*, 3028–3034.
- Klausen, M., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., and Tolker-Nielsen, T. (2003). Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol. Microbiol.* *50*, 61–68.
- Köhler, T., Curty, L.K., Barja, F., Delden, C. van, and Pechère, J.-C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* Is Dependent on Cell-to-Cell Signaling and Requires Flagella and Pili. *J. Bacteriol.* *182*, 5990–5996.
- König, B., Vasil, M.L., and König, W. (1997). Role of Hemolytic and Nonhemolytic Phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* for Inflammatory Mediator Release from Human Granulocytes. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *112*, 115–124.
- Koulenti, D., Lisboa, T., Brun-Buisson, C., Krueger, W., Macor, A., Sole-Violan, J., Diaz, E., Topeli, A., DeWaele, J., Carneiro, A., et al. (2009). Spectrum of practice in the diagnosis of nosocomial pneumonia in patients requiring mechanical ventilation in European intensive care units. *Crit. Care Med.* *37*, 2360–2368.
- Kuang, Z., Hao, Y., Walling, B.E., Jeffries, J.L., Ohman, D.E., and Lau, G.W. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* Elastase Provides an Escape from Phagocytosis by Degrading the Pulmonary Surfactant Protein-A. *PLoS ONE* *6*.
- Kube, D., Sontich, U., Fletcher, D., and Davis, P.B. (2001). Proinflammatory cytokine responses to *P. aeruginosa* infection in human airway epithelial cell lines. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* *280*, L493–L502.
- Kurahashi, K., Kajikawa, O., Sawa, T., Ohara, M., Gropper, M.A., Frank, D.W., Martin, T.R., and Wiener-Kronish, J.P. (1999). Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J. Clin. Invest.* *104*, 743–750.
- Laarman, A.J., Bardoel, B.W., Ruyken, M., Fernie, J., Milder, F.J., Strijp, J.A.G. van, and Rooijackers, S.H.M. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease Blocks Complement Activation via the Classical and Lectin Pathways. *J. Immunol.* *188*, 386–393.
- Lakkis, C., and Fleiszig, S.M.J. (2001). Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Hydrogel Contact Lens Disinfection Correlates with Cytotoxic Activity. *J. Clin. Microbiol.* *39*, 1477–1486.

- Lamas Ferreira, J.L., Álvarez Otero, J., González González, L., Novoa Lamazares, L., Arca Blanco, A., Bermúdez Sanjurjo, J.R., Rodríguez Conde, I., Fernández Soneira, M., and de la Fuente Aguado, J. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infections in hospitalized patients: Mortality and prognostic factors. *PLoS ONE* *12*.
- Lambeau, G., and Gelb, M.H. (2008). Biochemistry and Physiology of Mammalian Secreted Phospholipases A2. *Annu. Rev. Biochem.* *77*, 495–520.
- Lamont, I.L., Beare, P.A., Ochsner, U., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (2002). Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 7072–7077.
- Landgraf, K.E., Malmberg, N.J., and Falke, J.J. (2008). Effect of PIP2 Binding on the Membrane Docking Geometry of PKC α C2 Domain: An EPR Site-Directed Spin-Labeling and Relaxation Study. *Biochemistry* *47*, 8301–8316.
- Lau, G.W., Ran, H., Kong, F., Hassett, D.J., and Mavrodi, D. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* Pyocyanin Is Critical for Lung Infection in Mice. *Infect. Immun.* *72*, 4275–4278.
- Laventie, B.-J., Sangermani, M., Estermann, F., Manfredi, P., Planes, R., Hug, I., Jaeger, T., Meunier, E., Broz, P., and Jenal, U. (2019). A Surface-Induced Asymmetric Program Promotes Tissue Colonization by *Pseudomonas aeruginosa*. *Cell Host Microbe* *25*, 140-152.e6.
- 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 Berre, L., Takano, T., Papillon, J., Lemay, S., and Cybulsky, A.V. (2006). Role of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the activation of cytosolic phospholipase A2- α . *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* *81*, 113–125.
- Le Berre, R., Nguyen, S., Nowak, E., Kipnis, E., Pierre, M., Quenee, L., Ader, F., Lancel, S., Courcol, R., Guery, B.P., et al. (2011). Relative contribution of three main virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia*. *Read Online Crit. Care Med. Soc. Crit. Care Med.* *39*, 2113–2120.
- Lee, D.G., Urbach, J.M., Wu, G., Liberati, N.T., Feinbaum, R.L., Miyata, S., Diggins, L.T., He, J., Saucier, M., Déziel, E., et al. (2006). Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol.* *7*, R90.
- Lee, E.J., Cowell, B.A., Evans, D.J., and Fleiszig, S.M.J. (2003). Contribution of ExsA-Regulated Factors to Corneal Infection by Cytotoxic and Invasive *Pseudomonas aeruginosa* in a Murine Scarification Model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *44*, 3892–3898.
- Lee, J.-G., Takahama, S., Zhang, G., Tomarev, S.I., and Ye, Y. (2016). Unconventional secretion of misfolded proteins promotes adaptation to proteasome dysfunction in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* *18*, 765–776.
- Lee, V.T., Smith, R.S., Tümmler, B., and Lory, S. (2005). Activities of *Pseudomonas aeruginosa* Effectors Secreted by the Type III Secretion System In Vitro and during Infection. *Infect. Immun.* *73*, 1695–1705.
- Lee, V.T., Pukatzki, S., Sato, H., Kikawada, E., Kazimirova, A.A., Huang, J., Li, X., Arm, J.P., Frank, D.W., and Lory, S. (2007). Pseudolipasin A Is a Specific Inhibitor for Phospholipase A2 Activity of *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxin ExoU. *Infect. Immun.* *75*, 1089–1098.
- Legate, K.R., Takahashi, S., Bonakdar, N., Fabry, B., Boettiger, D., Zent, R., and Fässler, R. (2011). Integrin adhesion and force coupling are independently regulated by localized PtdIns(4,5)2 synthesis. *EMBO J.* *30*, 4539–4553.
- Lemmon, M.A. (2003). Phosphoinositide Recognition Domains. *Traffic* *4*, 201–213.
- Lillehoj, E.P., Kim, B.T., and Kim, K.C. (2002). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* *282*, L751–L756.
- Lister, P.D., Wolter, D.J., and Hanson, N.D. (2009). Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical

- Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 582–610.
- Lovewell, R.R., Collins, R.M., Acker, J.L., O'Toole, G.A., Wargo, M.J., and Berwin, B. (2011). Step-Wise Loss of Bacterial Flagellar Torsion Confers Progressive Phagocytic Evasion. *PLoS Pathog.* 7.
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., and Ohashi, P.S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42, 145–151.
- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., and Pier, G.B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist*Address for correspondence: Channing Laboratory, 181 Longwood Avenue, Boston, MA 02115, USA. *Microbes Infect.* 2, 1051–1060.
- Mahenthalingam, E., Campbell, M.E., and Speert, D.P. (1994). Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect. Immun.* 62, 596–605.
- Malmberg, N.J., Van Buskirk, D.R., and Falke, J.J. (2003). Membrane-Docking Loops of the cPLA2 C2 Domain: Detailed Structural Analysis of the Protein-Membrane Interface via Site-Directed Spin-Labeling. *Biochemistry* 42, 13227–13240.
- Mansoor, T., Musani, M.A., Khalid, G., and Kamal, M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* in chronic suppurative otitis media: sensitivity spectrum against various antibiotics in Karachi. *J. Ayub Med. Coll. Abbottabad JAMC* 21, 120–123.
- Maqbool, M., Shabir, A., Naqash, H., Amin, A., Koul, R.K., and Shah, P.A. (2017). Ventilator Associated Pneumonia-Incidence and Outcome in Adults in Medical Intensive Care Unit of a Tertiary Care Hospital of North India. *Vent. Assoc. Pneumonia* 4, 4.
- Maresso, A.W., Baldwin, M.R., and Barbieri, J.T. (2004). Ezrin/Radixin/Moesin Proteins Are High Affinity Targets for ADP-ribosylation by *Pseudomonas aeruginosa* ExoS. *J. Biol. Chem.* 279, 38402–38408.
- Maresso, A.W., Deng, Q., Pereckas, M.S., Wakim, B.T., and Barbieri, J.T. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* ExoS ADP-ribosyltransferase inhibits ERM phosphorylation. *Cell. Microbiol.* 9, 97–105.
- Mariencheck, W.I., Alcorn, J.F., Palmer, S.M., and Wright, J.R. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* Elastase Degrades Surfactant Proteins A and D. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28, 528–537.
- Marko, V.A., Kilmury, S.L.N., MacNeil, L.T., and Burrows, L.L. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* type IV minor pilins and PilY1 regulate virulence by modulating FimS-AlgR activity. *PLOS Pathog.* 14, e1007074.
- Martin, T.F.J. (2001). PI(4,5)P2 regulation of surface membrane traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 493–499.
- Martínez, A., Ostrovsky, P., and Nunn, D.N. (1999). LipC, a second lipase of *Pseudomonas aeruginosa*, is LipB and Xcp dependent and is transcriptionally regulated by pilus biogenesis components. *Mol. Microbiol.* 34, 317–326.
- Martínez-Solano, L., Macia, M.D., Fajardo, A., Oliver, A., and Martinez, J.L. (2008). Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clin. Infect. Dis.* 47, 1526–1533.
- Masters, S.C., Pederson, K.J., Zhang, L., Barbieri, J.T., and Fu, H. (1999). Interaction of 14-3-3 with a Nonphosphorylated Protein Ligand, Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 38, 5216–5221.
- Matilla, M.A., and Krell, T. (2018). The effect of bacterial chemotaxis on host infection and pathogenicity. *FEMS Microbiol. Rev.* 42.
- Mattei, P.-J., Faudry, E., Job, V., Izoré, T., Attree, I., and Dessen, A. (2011). Membrane targeting and pore formation by the type III secretion system translocon. *FEBS J.* 278, 414–426.
- Mattick, J.S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 289–314.

- Mattos Saliba, A., Nishi, R., Cristina Assis, M., and Cristina Plotkowski, M. (2003). ExoU contributes to late killing of *Pseudomonas aeruginosa* - infected endothelial cells. *Braz J Microbiol.*
- McCallum, M., Tammam, S., Little, D.J., Robinson, H., Koo, J., Shah, M., Calmettes, C., Moraes, T.F., Burrows, L.L., and Howell, P.L. (2016). PilN Binding Modulates the Structure and Binding Partners of the *Pseudomonas aeruginosa* Type IVa Pilus Protein PilM. *J. Biol. Chem.* *291*, 11003–11015.
- McClure, C.D., and Schiller, N.L. (1996). Inhibition of Macrophage Phagocytosis by *Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipids In Vitro and In Vivo. *Curr. Microbiol.* *33*, 109–117.
- McCue, H.V., Chen, X., Barclay, J.W., Morgan, A., and Burgoyne, R.D. (2015). Expression profile of a *Caenorhabditis elegans* model of adult neuronal ceroid lipofuscinosis reveals down regulation of ubiquitin E3 ligase components. *Sci. Rep.* *5*.
- McLaughlin, S., Wang, J., Gambhir, A., and Murray, D. (2002). PIP2 and Proteins: Interactions, Organization, and Information Flow. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *31*, 151–175.
- McMackin, E.A.W., Djapgne, L., Corley, J.M., and Yahr, T.L. (2019). Fitting Pieces into the Puzzle of *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System Gene Expression. *J. Bacteriol.* *201*.
- McMorran, B., Town, L., Costelloe, E., Palmer, J., Engel, J., Hume, D., and Wainwright, B. (2003). Effector ExoU from the Type III Secretion System Is An Important Modulator of Gene Expression in Lung Epithelial Cells in Response to *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *Infect. Immun.* *71*, 7240.
- Merz, A.J., So, M., and Sheetz, M.P. (2000). Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* *407*, 98–102.
- Micek, S.T., Lloyd, A.E., Ritchie, D.J., Reichley, R.M., Fraser, V.J., and Kollef, M.H. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infection: Importance of Appropriate Initial Antimicrobial Treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* *49*, 1306–1311.
- Michalska, M., and Wolf, P. (2015). *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. *Front. Microbiol.* *6*.
- Mikkelsen, H., Sivaneson, M., and Filloux, A. (2011). Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* *13*, 1666–1681.
- Miller, R.A., Rasmussen, G.T., Cox, C.D., and Britigan, B.E. (1996). Protease cleavage of iron-transferrin augments pyocyanin-mediated endothelial cell injury via promotion of hydroxyl radical formation. *Infect. Immun.* *64*, 182–188.
- Mittal, R., Aggarwal, S., Sharma, S., Chhibber, S., and Harjai, K. (2009). Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: A minireview. *J. Infect. Public Health* *2*, 101–111.
- Miyazaki, S., Matsumoto, T., Tateda, K., Ohno, A., and Yamaguchi, K. (1995). Role of exotoxin A in inducing severe *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice. *J. Med. Microbiol.* *43*, 169–175.
- Mohamed, F.B., Garcia-Verdugo, I., Medina, M., Balloy, V., Chignard, M., Ramphal, R., and Touqui, L. (2012). A Crucial Role of Flagellin in the Induction of Airway Mucus Production by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* *7*.
- Moore, E.R.B., Tindall, B.J., Santos, V.A.P.M.D., Pieper, D.H., Ramos, J.-L., and Palleroni, N.J. (2006). Nonmedical: *Pseudomonas*. In *The Prokaryotes*, (Springer, New York, NY), pp. 646–703.
- Morrison, A.J., and Wenzel, R.P. (1984). Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.* *6 Suppl 3*, S627-642.
- Mosior, M., Six, D.A., and Dennis, E.A. (1998). Group IV Cytosolic Phospholipase A2 Binds with High Affinity and Specificity to Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Resulting in Dramatic Increases in Activity. *J. Biol.*

Chem. 273, 2184–2191.

Mougous, J.D., Cuff, M.E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C.A., Goodman, A.L., Joachimiak, G., Ordoñez, C.L., Lory, S., et al. (2006). A Virulence Locus of *Pseudomonas aeruginosa* Encodes a Protein Secretion Apparatus. *Science* 312, 1526–1530.

Mowat, E., Paterson, S., Fothergill, J.L., Wright, E.A., Ledson, M.J., Walshaw, M.J., Brockhurst, M.A., and Winstanley, C. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* population diversity and turnover in cystic fibrosis chronic infections. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183, 1674–1679.

Mulcahy, L.R., Isabella, V.M., and Lewis, K. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb. Ecol.* 68, 1–12.

Murray, T.S., and Kazmierczak, B.I. (2006). FlhF Is Required for Swimming and Swarming in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188, 6995–7004.

Murray, T.S., and Kazmierczak, B.I. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* Exhibits Sliding Motility in the Absence of Type IV Pili and Flagella. *J. Bacteriol.* 190, 2700–2708.

Neeld, D., Jin, Y., Bichsel, C., Jia, J., Guo, J., Bai, F., Wu, W., Ha, U.-H., Terada, N., and Jin, S. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* injects NDK into host cells through a type III secretion system. *Microbiology* 160, 1417–1426.

Ngo, T.-D., Plé, S., Thomas, A., Barette, C., Fortuné, A., Bouzidi, Y., Fauvarque, M.-O., Pereira de Freitas, R., Francisco Hilário, F., Attree, I., et al. (2019). Chimeric Protein–Protein Interface Inhibitors Allow Efficient Inhibition of Type III Secretion Machinery and *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *ACS Infect. Dis.*

Nguyen, A.T., Jones, J.W., Ruge, M.A., Kane, M.A., and Oglesby-Sherrouse, A.G. (2015). Iron Depletion Enhances Production of Antimicrobials by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 197, 2265–2275.

Nomura, K., Obata, K., Keira, T., Miyata, R., Hirakawa, S., Takano, K., Kohno, T., Sawada, N., Himi, T., and Kojima, T. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* elastase causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells. *Respir. Res.* 15, 21.

Ochoa, C.D., Alexeyev, M., Pastukh, V., Balczon, R., and Stevens, T. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin Y Is a Promiscuous Cyclase That Increases Endothelial Tau Phosphorylation and Permeability. *J. Biol. Chem.* 287, 25407–25418.

Ohara, T., and Itoh, K. (2003). Significance of *Pseudomonas aeruginosa* Colonization of the Gastrointestinal Tract. *Intern. Med.* 42, 1072–1076.

Ostroff, R.M., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (1990). Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 172, 5915–5923.

Ottmann, C., Yasmin, L., Weyand, M., Veessenmeyer, J.L., Diaz, M.H., Palmer, R.H., Francis, M.S., Hauser, A.R., Wittinghofer, A., and Hallberg, B. (2007). Phosphorylation-independent interaction between 14-3-3 and exoenzyme S: from structure to pathogenesis. *EMBO J.* 26, 902–913.

Ozer, E.A., Nnah, E., Didelot, X., Whitaker, R.J., and Hauser, A.R. (2019). The Population Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Is Characterized by Genetic Isolation of exoU+ and exoS+ Lineages. *Genome Biol. Evol.* 11, 1780–1796.

Pachori, P., Gothwal, R., and Gandhi, P. (2019). Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes Dis.* 6, 109–119.

Pallen, M.J., and Matzke, N.J. (2006). From The Origin of Species to the origin of bacterial flagella. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 784–790.

Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B.R., Lin, T.-J., and Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.* 37, 177–192.

- Pankhaniya, R.R., Tamura, M., Allmond, L.R., Moriyama, K., Ajayi, T., Wiener-Kronish, J.P., and Sawa, T. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* causes acute lung injury via the catalytic activity of the patatin-like phospholipase domain of ExoU*. *Read Online Crit. Care Med. Soc. Crit. Care Med.* *32*, 2293–2299.
- Park, M.-H., Kim, S.Y., Roh, E.Y., and Lee, H.S. (2017). Difference of Type 3 secretion system (T3SS) effector gene genotypes (*exoU* and *exoS*) and its implication to antibiotics resistances in isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from chronic otitis media. *Auris. Nasus. Larynx* *44*, 258–265.
- Parmely, M., Gale, A., Clabaugh, M., Horvat, R., and Zhou, W.W. (1990). Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* *58*, 3009–3014.
- Parsot, C., Hamiaux, C., and Page, A.-L. (2003). The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr. Opin. Microbiol.* *6*, 7–14.
- Pastor, A., Chabert, J., Louwagie, M., Garin, J., and Attree, I. (2005). PscF is a major component of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion needle. *FEMS Microbiol. Lett.* *253*, 95–101.
- Patel, P., Prescott, G.R., Burgoyne, R.D., Lian, L.-Y., and Morgan, A. (2016). Phosphorylation of Cysteine String Protein Triggers a Major Conformational Switch. *Struct. England* *24*, 1380–1386.
- Patriquin, G.M., Banin, E., Gilmour, C., Tuchman, R., Greenberg, E.P., and Poole, K. (2008). Influence of Quorum Sensing and Iron on Twitching Motility and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *190*, 662–671.
- Pazos, M.A., Lanter, B.B., Yonker, L.M., Eaton, A.D., Pirzai, W., Gronert, K., Bonventre, J.V., and Hurley, B.P. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* ExoU augments neutrophil transepithelial migration. *PLOS Pathog.* *13*, e1006548.
- Pederson, K.J., and Barbieri, J.T. (1998). Intracellular expression of the ADP-ribosyltransferase domain of *Pseudomonas* exoenzyme S is cytotoxic to eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.* *30*, 751–759.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M.-H., and Velázquez, E. (2009). Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* *9*, 1132–1147.
- Pellett, S., Bigley, D.V., and Grimes, D.J. (1983). Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in a riverine ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* *45*, 328–332.
- Pena, R.T., Blasco, L., Ambroa, A., González-Pedrajo, B., Fernández-García, L., López, M., Bleriot, I., Bou, G., García-Contreras, R., Wood, T.K., et al. (2019). Relationship Between Quorum Sensing and Secretion Systems. *Front. Microbiol.* *10*.
- Pernet, E., Guillemot, L., Burgel, P.-R., Martin, C., Lambeau, G., Sermet-Gaudelus, I., Sands, D., Leduc, D., Morand, P.C., Jeammet, L., et al. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* eradicates *Staphylococcus aureus* by manipulating the host immunity. *Nat. Commun.* *5*, 1–11.
- Persat, A., Inclan, Y.F., Engel, J.N., Stone, H.A., and Gitai, Z. (2015). Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 7563–7568.
- Peters, J.E., and Galloway, D.R. (1990). Purification and characterization of an active fragment of the LasA protein from *Pseudomonas aeruginosa*: enhancement of elastase activity. *J. Bacteriol.* *172*, 2236–2240.
- Phan, T.K., Williams, S.A., Bindra, G.K., Lay, F.T., Poon, I.K.H., and Hulett, M.D. (2019). Phosphoinositides: multipurpose cellular lipids with emerging roles in cell death. *Cell Death Differ.* *26*, 781–793.
- Phillips, R.M., Six, D.A., Dennis, E.A., and Ghosh, P. (2003). In Vivo Phospholipase Activity of the *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxin ExoU and Protection of Mammalian Cells with Phospholipase A2 Inhibitors. *J. Biol. Chem.* *278*, 41326–41332.
- Pikaar, J.C., Voorhout, W.F., van Golde, L.M., Verhoef, J., Van Strijp, J.A., and van Iwaarden, J.F. (1995). Opsonic activities of surfactant proteins A and D in phagocytosis of gram-negative bacteria by alveolar

- macrophages. *J. Infect. Dis.* *172*, 481–489.
- Pollack, M. (1984). The virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.* *6 Suppl 3*, S617–626.
- Pukatzki, S., Kessin, R.H., and Mekalanos, J.J. (2002). The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 3159–3164.
- Qiu, X., Gurkar, A.U., and Lory, S. (2006). Interstrain transfer of the large pathogenicity island (PAPI-1) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 19830–19835.
- Rabin, S.D.P., and Hauser, A.R. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, a Toxin Transported by the Type III Secretion System, Kills *Saccharomyces cerevisiae*. *Infect. Immun.* *71*, 4144–4150.
- Rabin, S.D.P., and Hauser, A.R. (2005). Functional Regions of the *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxin ExoU. *Infect. Immun.* *73*, 573–582.
- Rabin, S.D.P., Veessenmeyer, J.L., Biegling, K.T., and Hauser, A.R. (2006). A C-Terminal Domain Targets the *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxin ExoU to the Plasma Membrane of Host Cells. *Infect. Immun.* *74*, 2552–2561.
- Rada, B., and Leto, T.L. (2013). Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. *Trends Microbiol.* *21*, 73–81.
- Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G., and Ausubel, F.M. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* *268*, 1899–1902.
- Rangel, S.M., Logan, L.K., and Hauser, A.R. (2014). The ADP-Ribosyltransferase Domain of the Effector Protein ExoS Inhibits Phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* during Pneumonia. *MBio* *5*.
- Rashid, M.H., and Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 4885–4890.
- Raucher, D., Stauffer, T., Chen, W., Shen, K., Guo, S., York, J.D., Sheetz, M.P., and Meyer, T. (2000). Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Functions as a Second Messenger that Regulates Cytoskeleton–Plasma Membrane Adhesion. *Cell* *100*, 221–228.
- Reboud, E., Elsen, S., Bouillot, S., Golovkine, G., Basso, P., Jeannot, K., Attrée, I., and Huber, P. (2016). Phenotype and toxicity of the recently discovered exlA-positive *Pseudomonas aeruginosa* strains collected worldwide. *Environ. Microbiol.* *18*, 3425–3439.
- Reboud, E., Basso, P., Maillard, A.P., Huber, P., and Attrée, I. (2017a). Exolysin Shapes the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Clonal Outliers. *Toxins* *9*.
- Reboud, E., Bouillot, S., Patot, S., Béganton, B., Attrée, I., and Huber, P. (2017b). *Pseudomonas aeruginosa* ExlA and *Serratia marcescens* ShlA trigger cadherin cleavage by promoting calcium influx and ADAM10 activation. *PLOS Pathog.* *13*, e1006579.
- Ricciotti Emanuela, and FitzGerald Garret A. (2011). Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *31*, 986–1000.
- Rivera, R., and Chun, J. (2008). Biological effects of lysophospholipids. In *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*, (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 25–46.
- Rocha, C.L., Coburn, J., Rucks, E.A., and Olson, J.C. (2003). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Exoenzyme S as a Bifunctional Enzyme in J774A.1 Macrophages. *Infect. Immun.* *71*, 5296–5305.
- Rollet, C., Gal, L., and Guzzo, J. (2009). Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* *290*, 135–142.

- Rosell, A., Monsó, E., Soler, N., Torres, F., Angrill, J., Riise, G., Zalacaín, R., Morera, J., and Torres, A. (2005). Microbiologic Determinants of Exacerbation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Arch. Intern. Med.* *165*, 891–897.
- Rossol, M., Heine, H., Meusch, U., Quandt, D., Klein, C., Sweet, M.J., and Hauschildt, S. (2011). LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit. Rev. Immunol.* *31*, 379–446.
- Row, P.E., Liu, H., Hayes, S., Welchman, R., Charalabous, P., Hofmann, K., Clague, M.J., Sanderson, C.M., and Urbé, S. (2007). The MIT Domain of UBPY Constitutes a CHMP Binding and Endosomal Localization Signal Required for Efficient Epidermal Growth Factor Receptor Degradation. *J. Biol. Chem.* *282*, 30929–30937.
- Roy, P.H., Tetu, S.G., Larouche, A., Elbourne, L., Tremblay, S., Ren, Q., Dodson, R., Harkins, D., Shay, R., Watkins, K., et al. (2010). Complete Genome Sequence of the Multiresistant Taxonomic Outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PLoS ONE* *5*.
- Roy-Burman, A., Savel, R.H., Racine, S., Swanson, B.L., Revadigar, N.S., Fujimoto, J., Sawa, T., Frank, D.W., and Wiener-Kronish, J.P. (2001). Type III Protein Secretion Is Associated with Death in Lower Respiratory and Systemic *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J. Infect. Dis.* *183*, 1767–1774.
- Russell, A.B., LeRoux, M., Hathazi, K., Agnello, D.M., Ishikawa, T., Wiggins, P.A., Wai, S.N., and Mougous, J.D. (2013). Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature* *496*, 508–512.
- Rutherford, V., Yom, K., Ozer, E.A., Pura, O., Hughes, A., Murphy, K.R., Cudzilo, L., Mitchel, D., and Hauser, A.R. (2018). Environmental Reservoirs for *exoS*⁺ and *exoU*⁺ strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol. Rep.* *10*, 485–492.
- Saint-Criq, V., Villeret, B., Bastaert, F., Kheir, S., Hatton, A., Cazes, A., Xing, Z., Sermet-Gaudelus, I., Garcia-Verdugo, I., Edelman, A., et al. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* LasB protease impairs innate immunity in mice and humans by targeting a lung epithelial cystic fibrosis transmembrane regulator–IL-6–antimicrobial–repair pathway. *Thorax* *73*, 49–61.
- Salacha, R., Kovačić, F., Brochier-Armanet, C., Wilhelm, S., Tommassen, J., Filloux, A., Voulhoux, R., and Bleves, S. (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* patatin-like protein PlpD is the archetype of a novel Type V secretion system. *Environ. Microbiol.* *12*, 1498–1512.
- Saliba, A.M., Nascimento, D.O., Silva, M.C.A., Assis, M.C., Gayer, C.R.M., Raymond, B., Coelho, M.G.P., Marques, E.A., Touqui, L., Albano, R.M., et al. (2005). Eicosanoid-mediated proinflammatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU. *Cell. Microbiol.* *7*, 1811–1822.
- Sampedro, I., Parales, R.E., Krell, T., and Hill, J.E. (2015). *Pseudomonas* chemotaxis. *FEMS Microbiol. Rev.* *39*, 17–46.
- Sana, T.G., Berni, B., and Bleves, S. (2016). The T6SSs of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 and Their Effectors: Beyond Bacterial-Cell Targeting. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *6*.
- Santé Publique France (2017). Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, mai-juin 2017.
- Sato, H., and Frank, D.W. (2004). ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Mol. Microbiol.* *53*, 1279–1290.
- Sato, H., and Frank, D.W. (2014). Intoxication of Host Cells by the T3SS Phospholipase ExoU: PI(4,5)P₂-Associated, Cytoskeletal Collapse and Late Phase Membrane Blebbing. *PLoS ONE* *9*.
- Sato, H., Frank, D.W., Hillard, C.J., Feix, J.B., Pankhaniya, R.R., Moriyama, K., Finck-Barbançon, V., Buchaklian, A., Lei, M., Long, R.M., et al. (2003). The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J.* *22*, 2959–2969.
- Sato, H., Feix, J.B., Hillard, C.J., and Frank, D.W. (2005). Characterization of Phospholipase Activity of the *Pseudomonas aeruginosa* Type III Cytotoxin, ExoU. *J. Bacteriol.* *187*, 1192–1195.

- Sato, H., Feix, J.B., and Frank, D.W. (2006). Identification of Superoxide Dismutase as a Cofactor for the Pseudomonas Type III Toxin, ExoU. *Biochemistry* 45, 10368–10375.
- Sawa, T., Shimizu, M., Moriyama, K., and Wiener-Kronish, J.P. (2014). Association between Pseudomonas aeruginosa type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. *Crit. Care* 18, 668.
- Sawa, T., Hamaoka, S., Kinoshita, M., Kainuma, A., Naito, Y., Akiyama, K., and Kato, H. (2016). Pseudomonas aeruginosa Type III Secretory Toxin ExoU and Its Predicted Homologs. *Toxins* 8.
- Sayner Sarah L., Frank Dara W., King Judy, Chen Hairu, VandeWaa John, and Stevens Troy (2004). Paradoxical cAMP-Induced Lung Endothelial Hyperpermeability Revealed by Pseudomonas aeruginosa ExoY. *Circ. Res.* 95, 196–203.
- Scales, B.S., Dickson, R.P., LiPuma, J.J., and Huffnagle, G.B. (2014). Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the Pseudomonas fluorescens Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 927–948.
- Schaefer, P., and Baugh, R.F. (2012). Acute Otitis Externa: An Update. *Am. Fam. Physician* 86, 1055–1061.
- Schaloske, R.H., and Dennis, E.A. (2006). The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1761, 1246–1259.
- Scharfman, A., Arora, S.K., Delmotte, P., Van Brussel, E., Mazurier, J., Ramphal, R., and Roussel, P. (2001). Recognition of Lewis x Derivatives Present on Mucins by Flagellar Components of Pseudomonas aeruginosa. *Infect. Immun.* 69, 5243–5248.
- Schmalzer, K.M., Benson, M.A., and Frank, D.W. (2010). Activation of ExoU Phospholipase Activity Requires Specific C-Terminal Regions. *J. Bacteriol.* 192, 1801–1812.
- Schroeder, T.H., Lee, M.M., Yacono, P.W., Cannon, C.L., Gerçeker, A.A., Golan, D.E., and Pier, G.B. (2002). CFTR is a pattern recognition molecule that extracts Pseudomonas aeruginosa LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-κB translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6907–6912.
- Schulert, G.S., Feltman, H., Rabin, S.D.P., Martin, C.G., Battle, S.E., Rello, J., and Hauser, A.R. (2003). Secretion of the Toxin ExoU Is a Marker for Highly Virulent Pseudomonas aeruginosa Isolates Obtained from Patients with Hospital-Acquired Pneumonia. *J. Infect. Dis.* 188, 1695–1706.
- Schwarzer, C., Fischer, H., and Machen, T.E. (2016). Chemotaxis and Binding of Pseudomonas aeruginosa to Scratch-Wounded Human Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. *PLoS ONE* 11.
- Sechi, A.S., and Wehland, J. (2000). The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J. Cell Sci.* 113, 3685–3695.
- Senju, Y., and Lappalainen, P. (2019). Regulation of actin dynamics by PI(4,5)P2 in cell migration and endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 56, 7–13.
- Serra, R., Grande, R., Butrico, L., Rossi, A., Settimio, U.F., Caroleo, B., Amato, B., Gallelli, L., and Franciscis, S. de (2015). Chronic wound infections: the role of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 13, 605–613.
- Shaver, C.M., and Hauser, A.R. (2004). Relative Contributions of Pseudomonas aeruginosa ExoU, ExoS, and ExoT to Virulence in the Lung. *Infect. Immun.* 72, 6969–6977.
- Sheth, H.B., Lee, K.K., Wong, W.Y., Srivastava, G., Hindsgaul, O., Hodges, R.S., Paranchych, W., and Irvin, R.T. (1994). The pili of Pseudomonas aeruginosa strains PAK and PAO bind specifically to the carbohydrate sequence βGalNAc(1–4)βGal found in glycosphingolipids asialo-GM1 and asialo-GM2. *Mol. Microbiol.* 11, 715–723.
- Shukla, S., Jin, R., Robustelli, J., Zimmerman, Z.E., and Baumgart, T. (2019). PIP2 Reshapes Membranes through Asymmetric Desorption. *Biophys. J.* 117, 962–974.

- Siryaporn, A., Kuchma, S.L., O'Toole, G.A., and Gitai, Z. (2014). Surface attachment induces *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 16860–16865.
- Skopelja-Gardner, S., Theprungsirikul, J., Lewis, K.A., Hammond, J.H., Carlson, K.M., Hazlett, H.F., Nymon, A., Nguyen, D., Berwin, B.L., Hogan, D.A., et al. (2019). Regulation of *Pseudomonas aeruginosa*-Mediated Neutrophil Extracellular Traps. *Front. Immunol.* *10*.
- Smith, E.E., Buckley, D.G., Wu, Z., Saenphimmachak, C., Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A., Miller, S.I., Ramsey, B.W., Speert, D.P., Moskowitz, S.M., et al. (2006). Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 8487–8492.
- Song, J.-J., Lee, B.D., Lee, K.H., Lee, J.D., Park, Y.J., and Park, M.K. (2016). Changes in antibiotic resistance in recurrent *Pseudomonas aeruginosa* infections of chronic suppurative otitis media. *Ear. Nose. Throat J.* *95*, 446–451.
- Soong, G., Reddy, B., Sokol, S., Adamo, R., and Prince, A. (2004). TLR2 is mobilized into an apical lipid raft receptor complex to signal infection in airway epithelial cells. *J. Clin. Invest.* *113*, 1482–1489.
- Soong, G., Parker, D., Magargee, M., and Prince, A.S. (2008). The Type III Toxins of *Pseudomonas aeruginosa* Disrupt Epithelial Barrier Function. *J. Bacteriol.* *190*, 2814–2821.
- Springer, T.I., Reid, T.-E., Gies, S.L., and Feix, J.B. (2019). Interactions of the effector ExoU from *Pseudomonas aeruginosa* with short-chain phosphatidylinositides provide insights into ExoU targeting to host membranes. *J. Biol. Chem.* jbc.RA119.010278.
- Stauffer, T.P., Ahn, S., and Meyer, T. (1998). Receptor-induced transient reduction in plasma membrane PtdIns(4,5)P₂ concentration monitored in living cells. *Curr. Biol.* *8*, 343–346.
- Stevens, T.C., Ochoa, C.D., Morrow, K.A., Robson, M.J., Prasain, N., Zhou, C., Alvarez, D.F., Frank, D.W., Balczon, R., and Stevens, T. (2014). The *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme Y impairs endothelial cell proliferation and vascular repair following lung injury. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* *306*, L915–L924.
- Stirling, F.R., Cuzick, A., Kelly, S.M., Oxley, D., and Evans, T.J. (2006). Eukaryotic localization, activation and ubiquitinylation of a bacterial type III secreted toxin. *Cell. Microbiol.* *8*, 1294–1309.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S.L., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., et al. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* *406*, 959–964.
- Strahl, T., and Thorner, J. (2007). Synthesis and Function of Membrane Phosphoinositides in Budding Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* *1771*, 353–404.
- Subedi, D., Vijay, A.K., Kohli, G.S., Rice, S.A., and Willcox, M. (2018). Association between possession of ExoU and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS ONE* *13*, e0204936.
- Suh, B.-C., and Hille, B. (2008). PIP₂ is a necessary cofactor for ion channel function: How and why? *Annu. Rev. Biophys.* *37*, 175–195.
- Sun, J., and Barbieri, J.T. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* ExoT ADP-ribosylates CT10 Regulator of Kinase (Crk) Proteins. *J. Biol. Chem.* *278*, 32794–32800.
- Sun, Y., Karmakar, M., Taylor, P.R., Rietsch, A., and Pearlman, E. (2012). ExoS and ExoT ADP-ribosyltransferase activities mediate *Pseudomonas aeruginosa* keratitis by promoting neutrophil apoptosis and bacterial survival. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 1884–1895.
- Sundin, C., Wolfgang, M.C., Lory, S., Forsberg, A., and Frithz-Lindsten, E. (2002). Type IV pili are not specifically required for contact dependent translocation of exoenzymes by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Pathog.* *33*, 265–277.

- Sutterwala, F.S., Mijares, L.A., Li, L., Ogura, Y., Kazmierczak, B.I., and Flavell, R.A. (2007). Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *J. Exp. Med.* *204*, 3235–3245.
- Swayne, L.A., Blattler, C., Kay, J.G., and Braun, J.E.A. (2003). Oligomerization characteristics of cysteine string protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *300*, 921–926.
- Talà, L., Fineberg, A., Kukura, P., and Persat, A. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* orchestrates twitching motility by sequential control of type IV pili movements. *Nat. Microbiol.* *4*, 774–780.
- Tall, E.G., Spector, I., Pentylala, S.N., Bitter, I., and Rebecchi, M.J. (2000). Dynamics of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in actin-rich structures. *Curr. Biol.* *10*, 743–746.
- Tamura, M., Ajayi, T., Allmond, L.R., Moriyama, K., Wiener-Kronish, J.P., and Sawa, T. (2004). Lysophospholipase A activity of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretory toxin ExoU. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *316*, 323–331.
- Tan, M.-W., Mahajan-Miklos, S., and Ausubel, F.M. (1999). Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 715–720.
- Tan, X., Thapa, N., Choi, S., and Anderson, R.A. (2015). Emerging roles of PtdIns(4,5)P₂ – beyond the plasma membrane. *J. Cell Sci.* *128*, 4047–4056.
- Tang, H., Kays, M., and Prince, A. (1995). Role of *Pseudomonas aeruginosa* pili in acute pulmonary infection. *Infect. Immun.* *63*, 1278–1285.
- Telezhkin, V., Reilly, J.M., Thomas, A.M., Tinker, A., and Brown, D.A. (2012). Structural Requirements of Membrane Phospholipids for M-type Potassium Channel Activation and Binding. *J. Biol. Chem.* *287*, 10001–10012.
- Terada, L.S., Johansen, K.A., Nowbar, S., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* Hemolytic Phospholipase C Suppresses Neutrophil Respiratory Burst Activity. *Infect. Immun.* *67*, 2371–2376.
- Tessmer, M.H., Anderson, D.M., Buchaklian, A., Frank, D.W., and Feix, J.B. (2017). Cooperative Substrate-Cofactor Interactions and Membrane Localization of the Bacterial Phospholipase A₂ (PLA₂) Enzyme, ExoU. *J. Biol. Chem.* *292*, 3411–3419.
- Tessmer, M.H., Anderson, D.M., Pickrum, A.M., Riegert, M.O., Moretti, R., Meiler, J., Feix, J.B., and Frank, D.W. (2018). Identification of a ubiquitin-binding interface using Rosetta and DEER. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, 525–530.
- Tessmer, M.H., Anderson, D.M., Pickrum, A.M., Riegert, M.O., and Frank, D.W. (2019). Identification and Verification of Ubiquitin-Activated Bacterial Phospholipases. *J. Bacteriol.* *201*.
- Thapa, N., and Anderson, R.A. (2012). PIP₂ signaling, an integrator of cell polarity and vesicle trafficking in directionally migrating cells. *Cell Adhes. Migr.* *6*, 409–412.
- Thapa, N., Sun, Y., Schramp, M., Choi, S., Ling, K., and Anderson, R.A. (2012). Phosphoinositide Signaling Regulates the Exocyst Complex and Polarized Integrin Trafficking in Directionally Migrating Cells. *Dev. Cell* *22*, 116–130.
- Titécat, M., Senneville, E., Wallet, F., Dezèque, H., Migaud, H., Courcol, R.-J., and Loiez, C. (2013). Bacterial epidemiology of osteoarticular infections in a referent center: 10-year study. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* *99*, 653–658.
- Tyson, G.H., and Hauser, A.R. (2013). Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Is a Novel Coactivator of the *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxin ExoU. *Infect. Immun.* *81*, 2873–2881.
- Tyson, G.H., Halavaty, A.S., Kim, H., Geissler, B., Agard, M., Satchell, K.J., Cho, W., Anderson, W.F., and Hauser, A.R. (2015). A Novel Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Binding Domain Mediates Plasma Membrane Localization of ExoU and Other Patatin-like Phospholipases. *J. Biol. Chem.* *290*, 2919–2937.

- Van Der Goot, G., and Young, J.A.T. (2009). Receptors of anthrax toxin and cell entry. *Mol. Aspects Med.* *30*, 406–412.
- Van Gennip, M., Christensen, L.D., Alhede, M., Phipps, R., Jensen, P.Ø., Christophersen, L., Pamp, S.J., Moser, C., Mikkelsen, P.J., Koh, A.Y., et al. (2009). Inactivation of the *rhlA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* *117*, 537–546.
- Vasil, M.L., Stonehouse, M.J., Vasil, A.I., Wadsworth, S.J., Goldfine, H., Bolcome, R.E., and Chan, J. (2009). A Complex Extracellular Sphingomyelinase of *Pseudomonas aeruginosa* Inhibits Angiogenesis by Selective Cytotoxicity to Endothelial Cells. *PLoS Pathog.* *5*.
- Veesenmeyer, J.L., Howell, H., Halavaty, A.S., Ahrens, S., Anderson, W.F., and Hauser, A.R. (2010). Role of the Membrane Localization Domain of the *Pseudomonas aeruginosa* Effector Protein ExoU in Cytotoxicity. *Infect. Immun.* *78*, 3346–3357.
- Ventre, I., Goodman, A.L., Vallet-Gely, I., Vasseur, P., Soscia, C., Molin, S., Bleves, S., Lazdunski, A., Lory, S., and Filloux, A. (2006). Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 171–176.
- Vermeer, J.E.M., Leeuwen, W. van, Tobeña-Santamaria, R., Laxalt, A.M., Jones, D.R., Divecha, N., Gadella, T.W.J., and Munnik, T. (2006). Visualization of PtdIns3P dynamics in living plant cells. *Plant J.* *47*, 687–700.
- Vicinanza, M., D'Angelo, G., Di Campli, A., and De Matteis, M.A. (2008). Function and dysfunction of the PI system in membrane trafficking. *EMBO J.* *27*, 2457–2470.
- Volkmar, N., Fenech, E., and Christianson, J.C. (2016). New MAPS for misfolded proteins. *Nat. Cell Biol.* *18*, 724–726.
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M.L., Lazdunski, A., Wu, L.-F., and Filloux, A. (2001). Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J.* *20*, 6735–6741.
- Wallroth, A., and Haucke, V. (2018). Phosphoinositide conversion in endocytosis and the endolysosomal system. *J. Biol. Chem.* *293*, 1526–1535.
- Wandersman, C., and Delepelaire, P. (2004). Bacterial Iron Sources: From Siderophores to Hemophores. *Annu. Rev. Microbiol.* *58*, 611–647.
- Wang, Q., Li, H., Zhou, J., Zhong, M., Zhu, D., Feng, N., Liu, F., Bai, C., and Song, Y. (2014). PcrV antibody protects multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* induced acute lung injury. *Respir. Physiol. Neurobiol.* *193*, 21–28.
- Wang, T., Hou, Y., and Wang, R. (2019). A case report of community-acquired *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia complicated with MODS in a previously healthy patient and related literature review. *BMC Infect. Dis.* *19*, 130.
- Wang, X., Gong, L., Liang, S., Han, X., Zhu, C., and Li, Y. (2005). Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Harmful Algae* *4*, 433–443.
- Warren, A.E., Boulianne-Larsen, C.M., Chandler, C.B., Chiotti, K., Kroll, E., Miller, S.R., Taddei, F., Sermet-Gaudelus, I., Ferroni, A., McInnerney, K., et al. (2011). Genotypic and phenotypic variation in *Pseudomonas aeruginosa* reveals signatures of secondary infection and mutator activity in certain cystic fibrosis patients with chronic lung infections. *Infect. Immun.* *79*, 4802–4818.
- Warrener, P., Varkey, R., Bonnell, J.C., DiGiandomenico, A., Camara, M., Cook, K., Peng, L., Zha, J., Chowdury, P., Sellman, B., et al. (2014). A Novel Anti-PcrV Antibody Providing Enhanced Protection against *Pseudomonas aeruginosa* in Multiple Animal Infection Models. *Antimicrob. Agents Chemother.* *58*, 4384–4391.
- Watt, S.A., Kular, G., Fleming, I.N., Downes, C.P., and Lucocq, J.M. (2002). Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C delta1. *Biochem.*

J. 363, 657–666.

Wehbi, H., Portillo, E., Harvey, H., Shimkoff, A.E., Scheurwater, E.M., Howell, P.L., and Burrows, L.L. (2011). The Peptidoglycan-Binding Protein FimV Promotes Assembly of the *Pseudomonas aeruginosa* Type IV Pilus Secretin. *J. Bacteriol.* 193, 540–550.

Wen, P.J., Osborne, S.L., Zanin, M., Low, P.C., Wang, H.-T.A., Schoenwaelder, S.M., Jackson, S.P., Wedlich-Söldner, R., Vanhaesebroeck, B., Keating, D.J., et al. (2011). Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate coordinates actin-mediated mobilization and translocation of secretory vesicles to the plasma membrane of chromaffin cells. *Nat. Commun.* 2, 491.

Wesselkamper, S.C., Eppert, B.L., Motz, G.T., Lau, G.W., Hasset, D.J., and Borchers, M.T. (2008). NKG2D Is Critical for NK Cell Activation in Host Defense Against *Pseudomonas aeruginosa* Respiratory Infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 5481.

Whitchurch, C.B., Alm, R.A., and Mattick, J.S. (1996). The alginate regulator AlgR and an associated sensor FimS are required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 9839–9843.

Whiteley, M., Banger, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S., and Greenberg, E.P. (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 413, 860–864.

Wilhelm, S., Gdynia, A., Tielen, P., Rosenau, F., and Jaeger, K.-E. (2007). The Autotransporter Esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* Is Required for Rhamnolipid Production, Cell Motility, and Biofilm Formation. *J. Bacteriol.* 189, 6695–6703.

Williams, B.J., Dehnbostel, J., and Blackwell, T.S. (2010). *Pseudomonas aeruginosa*: Host defence in lung diseases. *Respirology* 15, 1037–1056.

Wisplinghoff, H., and Seifert, H. (2010). *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. and miscellaneous Gram-negative bacilli. In *Infectious Diseases: Third Edition*, pp. 1704–1727.

Wolfgang, M.C., Kulasekara, B.R., Liang, X., Boyd, D., Wu, K., Yang, Q., Miyada, C.G., and Lory, S. (2003). Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8484–8489.

Wolfgang, M.C., Jyot, J., Goodman, A.L., Ramphal, R., and Lory, S. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid from cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6664–6668.

Wood, S., Goldufsky, J., and Shafikhani, S.H. (2015a). *Pseudomonas aeruginosa* ExoT Induces Atypical Anoikis Apoptosis in Target Host Cells by Transforming Crk Adaptor Protein into a Cytotoxin. *PLoS Pathog.* 11.

Wood, S.J., Goldufsky, J.W., Bello, D., Masood, S., and Shafikhani, S.H. (2015b). *Pseudomonas aeruginosa* ExoT Induces Mitochondrial Apoptosis in Target Host Cells in a Manner That Depends on Its GTPase-activating Protein (GAP) Domain Activity. *J. Biol. Chem.* 290, 29063–29073.

Xu, W., Yi, L., Feng, Y., Chen, L., and Liu, J. (2009). Structural Insight into the Activation Mechanism of Human Pancreatic Phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 284, 16659–16666.

Xu, Y., Cui, L., Dibello, A., Wang, L., Lee, J., Saidi, L., Lee, J.-G., and Ye, Y. (2018). DNAJC5 facilitates USP19-dependent unconventional secretion of misfolded cytosolic proteins. *Cell Discov.* 4, 1–18.

Yahr, T.L., and Wolfgang, M.C. (2006). Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol. Microbiol.* 62, 631–640.

Yahr, T.L., Vallis, A.J., Hancock, M.K., Barbieri, J.T., and Frank, D.W. (1998). ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13899–13904.

Yasmin, L., Jansson, A.L., Panahandeh, T., Palmer, R.H., Francis, M.S., and Hallberg, B. (2006). Delineation of exoenzyme S residues that mediate the interaction with 14-3-3 and its biological activity. *FEBS J.* 273, 638–646.

- Yasmin, L., Veesenmeyer, J.L., Diaz, M.H., Francis, M.S., Palmer, R.H., Hauser, A.R., and Hallberg, B. (2010). Electrostatic interactions play a minor role in the binding of ExoS to 14-3-3. *Biochem. J.* *427*, 217–224.
- Ye, Y. (2018). Regulation of protein homeostasis by unconventional protein secretion in mammalian cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* *83*, 29–35.
- Zhang, A., Veesenmeyer, J.L., and Hauser, A.R. (2017). Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate-Dependent Oligomerization of the *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxin ExoU. *Infect. Immun.* *86*.
- Zhang, H., Xu, S., Wang, Q., Song, S., Shu, Y., and Lin, Z. (2002). Structure of a cardiotoxic phospholipase A2 from *Ophiophagus hannah* with the “pancreatic loop.” *J. Struct. Biol.* *138*, 207–215.
- Zhang, Q., Illing, R., Hui, C.K., Downey, K., Carr, D., Stearn, M., Alshafi, K., Menzies-Gow, A., Zhong, N., and Fan Chung, K. (2012). Bacteria in sputum of stable severe asthma and increased airway wall thickness. *Respir. Res.* *13*, 35.
- Zhang, S., McCormack, F.X., Levesque, R.C., O’Toole, G.A., and Lau, G.W. (2007). The Flagellum of *Pseudomonas aeruginosa* Is Required for Resistance to Clearance by Surfactant Protein A. *PLoS ONE* *2*.
- Zhao, K., Li, W., Li, J., Ma, T., Wang, K., Yuan, Y., Li, J.S., Xie, R., Huang, T., Zhang, Y., et al. (2019). TesG is a type I secretion effector of *Pseudomonas aeruginosa* that suppresses the host immune response during chronic infection. *Nat. Microbiol.* *4*, 459–469.
- Zichichi, L., Asta, G., and Noto, G. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* folliculitis after shower/bath exposure. *Int. J. Dermatol.* *39*, 270–273.
- Zolfaghar, I., Evans, D.J., and Fleiszig, S.M.J. (2003). Twitching Motility Contributes to the Role of Pili in Corneal Infection Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* *71*, 5389–5393.
- Zuin, A., Isasa, M., and Crosas, B. (2014). Ubiquitin Signaling: Extreme Conservation as a Source of Diversity. *Cells* *3*, 690–701.
- Zulianello, L., Canard, C., Köhler, T., Caille, D., Lacroix, J.-S., and Meda, P. (2006). Rhamnolipids Are Virulence Factors That Promote Early Infiltration of Primary Human Airway Epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* *74*, 3134–3147.

Identification d'une nouvelle protéine eucaryote essentielle pour la localisation membranaire de la toxine ExoU de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie Gram-négative opportuniste, responsable de différents types d'infections, et notamment de maladies nosocomiales. Les infections aiguës causées par ce pathogène sont dues à un large panel de facteurs de virulence, dont le plus agressif est un système de sécrétion de type III. Parmi les quatre effecteurs injectés par ce système dans le cytoplasme des cellules cibles, ExoU est le plus cytotoxique. Les souches ExoU⁺ sont associées aux pathologies les plus sévères et à une multirésistance aux antibiotiques plus élevée. La toxine possède une activité phospholipase qui induit une nécrose cellulaire après rupture de la membrane plasmique. Cependant, le trafic de la toxine dans les cellules hôtes pour atteindre la membrane plasmique n'est pas connu.

Dans ce travail, j'ai recherché des partenaires eucaryotes d'ExoU en réalisant un criblage génétique sur l'ensemble du génome humain, mettant en œuvre le système CRISPR-Cas9. J'ai ainsi identifié le gène codant pour une protéine co-chaperone appelée DNAJC5. Cette protéine, localisée à la surface des endosomes tardifs, est impliquée dans un système de sécrétion non-conventionnel permettant le relargage de protéines cytosoliques mal repliées. Nous démontrons dans des modèles cellulaires et chez la drosophile, que l'absence de DNAJC5 confère une résistance à la nécrose induite par des souches ExoU⁺. Dans le cytoplasme, la toxine est localisée à la membrane des vésicules DNAJC5⁺. Des mutations dans le gène *DNAJC5*, empêchant le trafic des endosomes tardifs DNAJC5⁺ vers la membrane plasmique, entravent également la localisation d'ExoU à ce niveau et inhibent sa cytotoxicité. Nous concluons, qu'une fois administrée dans le cytoplasme de la cellule hôte, ExoU utilise des vésicules DNAJC5⁺, pour être transportée à la membrane plasmique, un processus strictement nécessaire à la nécrose cellulaire induite par la toxine.

Mots clés: *Pseudomonas aeruginosa*, infection, T3SS, ExoU, DNAJC5 (CSP α)

Identification of a new eukaryotic protein essential for the membrane localization of ExoU toxin from *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic Gram-negative bacterium, responsible for different types of infection, in particular for nosocomial diseases. The acute infections caused by this pathogen are promoted by a broad panel of virulence factors; the most aggressive one being the Type III Secretion System. Among the four effectors injected by this system into the cytoplasm of target cells, ExoU is the most cytotoxic one. ExoU⁺ strains are associated with the most severe pathologies and to higher multiresistance to antibiotics. The toxin possesses a phospholipase activity inducing cell necrosis upon plasma membrane rupture. However, the trafficking of the toxin in host cells to reach the plasma membrane is unknown.

In this study, I aimed at identifying ExoU host partners, using a genome-wide screen employing the CRISPR-Cas9 system. Likewise, I identified the gene encoding a co-chaperone protein, named DNAJC5. This protein, located at the surface of late endosomes, is involved in an unconventional secretion pathway required for the release of misfolded cytosolic proteins. Using human cellular models, as well as *Drosophila*, we demonstrate that lack of DNAJC5 confers resistance to ExoU⁺ strain infection. In the host cytoplasm, the toxin localizes at the surface of DNAJC5⁺ vesicles. Mutations in *DNAJC5* gene, preventing vesicle trafficking to the plasma membrane, also impede ExoU targeting to the plasma membrane and inhibit its cytotoxicity. We conclude that, once delivered into the host cell cytoplasm, ExoU uses DNAJC5⁺ vesicles to be transported to the plasma membrane, a process strictly required for ExoU-induced cell necrosis.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, infection, T3SS, ExoU, DNAJC5 (CSP α)