



**HAL**  
open science

# Détection de la virulence bactérienne : caractérisation de la réponse immunitaire anti-virulence déclenchée par la toxine CNF1 d'Escherichia coli

Elsa Garcia

► **To cite this version:**

Elsa Garcia. Détection de la virulence bactérienne : caractérisation de la réponse immunitaire anti-virulence déclenchée par la toxine CNF1 d'Escherichia coli. Sciences agricoles. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2017. Français. NNT : 2017AZUR4071 . tel-03793796

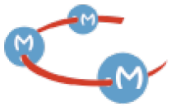
**HAL Id: tel-03793796**

**<https://theses.hal.science/tel-03793796>**

Submitted on 2 Oct 2022

**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.



Université Côte d'Azur – Faculté des Sciences  
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé (ED85)

## Thèse de Doctorat

Présentée pour l'obtention du titre de  
Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé  
Spécialité : Immunologie & Microbiologie

Par

**Elsa GARCIA**

---

Détection de la virulence bactérienne :  
Caractérisation de la réponse immunitaire anti-virulence  
déclenchée par la toxine CNF1 d'*Escherichia coli*

---

Soutenue le 26 septembre 2017  
Amphithéâtre Rampal, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire à Nice  
INSERM U1065

Devant le jury composé de :

Dr. AUBERGER Patrick  
Dr. PY Bénédicte  
Dr. GHIGO Éric  
Dr. KELLER Harald  
Dr. MERESSE Stéphane  
Dr. BOYER Laurent

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse



*A papa, mon père  
A mon Touillou*

## Résumé de thèse

Le système immunitaire détecte les microorganismes via des récepteurs de l'hôte appelés PRRs qui reconnaissent des molécules partagées par tous les microorganismes mais absents de l'hôte, appelées MAMPs (Janeway, 1989). Etant donné que les MAMPs sont exprimés par tous les microorganismes indépendamment de leur potentiel pathogène, ce mécanisme n'explique pas comment le système immunitaire distingue les microorganismes pathogènes des non-pathogènes. La détection de l'activité des facteurs de virulence encodés par les microorganismes pathogènes est un mécanisme de défense clairement établi chez la plante, appelé ETI (Jones and Dangl, 2006). De récents travaux ont mis en évidence chez l'animal un mécanisme similaire de détection de l'activité des facteurs de virulence bactériens qui conduit à une réponse immunitaire de l'hôte dirigée contre les pathogènes (Stuart et al., 2013).

Afin d'étudier ce mécanisme, notre laboratoire utilise la toxine CNF1 d'*Escherichia coli* qui active les Rho GTPases, des molécules régulatrices du cytosquelette. En utilisant la drosophile, le Dr. Laurent Boyer a montré que CNF1 induisait une réponse immunitaire innée conservée chez le mammifère via l'activation anormale de la Rho GTPase Rac2 et le recrutement de la protéine IMD et de ses homologues mammifères de la famille RIP (Boyer et al., 2011). Nous avons démontré chez le mammifère que l'activation de NF- $\kappa$ B par CNF1 passe par l'ubiquitination de RIP1 induite par l'activation de Rac2. De plus, nous avons identifié la protéine FLII comme partenaire de la forme active de Rac2 et comme un régulateur de l'ubiquitination de RIP1.

Nous avons par la suite évalué le rôle de la réponse immunitaire innée induite par la détection de la toxine CNF1 au cours de la bactériémie chez la souris. Nous avons démontré le rôle central de la cytokine IL-1 $\beta$  dans l'élimination des bactéries en réponse à la détection de CNF1 (Diabate et al., 2015). Des expériences *in vitro* nous ont permis de mettre en évidence l'effet synergique du CNF1 et du LPS dans la maturation de l'IL-1 $\beta$ , ainsi que l'implication des protéines Rac2, ASC et caspase-1. Ces résultats nous ont par la suite permis d'identifier l'inflammasome NLRP3 comme responsable de l'activation de la caspase-1 et du clivage de l'IL-1 $\beta$ . De manière intéressante, la toxine CNF1 est toujours co-exprimée avec la toxine hémolysine- $\alpha$  (HlyA) dans les souches pathogènes d'*Escherichia coli* (Landraud et al., 2003). En outre, nous avons découvert que l'HlyA bloquait l'élimination des bactéries induite par CNF1 au cours de la bactériémie et inhibait la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  (Diabate et al., 2015). Ici, nous avons rapporté le premier exemple d'immunité induite par une toxine (CNF1) et contrecarrée par une autre (HlyA).

# Sommaire

# Sommaire

<b>Résumé de thèse</b> .....	<b>4</b>
<b>Sommaire</b> .....	<b>5</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>8</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>9</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>17</b>
<b>I. Les facteurs de virulence et toxines bactériennes des <i>Escherichia coli</i> uropathogènes</b> .....	<b>18</b>
A. Notion de virulence.....	18
B. Les <i>Escherichia coli</i> uropathogènes (UPEC) .....	18
C. L'hémolysine- $\alpha$ (HlyA) d' <i>E.coli</i> .....	19
D. Le facteur cytotoxique nécrosant (CNF1) d' <i>E. coli</i> .....	21
1. Génétique et structure de CNF1.....	21
2. CNF1 active les Rho GTPases.....	24
a. Les Rho GTPases .....	24
b. Effets de CNF1 .....	26
<b>II. Détection des microorganismes par le système immunitaire inné</b> .....	<b>28</b>
A. La théorie des MAMPs .....	28
1. Les TLRs .....	29
2. Les NLRs.....	32
3. Les autres PRRs.....	35
B. Les inflammasomes.....	36
1. L'inflammasome NLRC4/NAIP .....	39
2. L'inflammasome NLRP3.....	41
a. NLRP3 est activé par une variété de stimuli .....	42
b. Les régulateurs du NLRP3 .....	44
3. L'inflammasome non-canonique et mort cellulaire .....	46
4. Mécanismes de sécrétion et clivage de l'IL-1 $\beta$ .....	48
<b>III. Reconnaissance de l'activité des facteurs de virulence par le système immunitaire inné</b> ...	<b>51</b>
A. L'immunité induite par des effecteurs (ETI) chez la plante .....	51
B. L'immunité anti-virulence chez l'animal.....	53
1. L'inhibition de la traduction protéique par des facteurs de virulence induit une réponse immunitaire .....	54
2. Les toxines formant des pores induisent une réponse immunitaire à des doses non létales.....	55
3. L'inflammasome NLRP1b détecte la toxine létale de <i>B. anthracis</i> .....	55
4. L'inflammasome PYRIN détecte les facteurs de virulence inhibant les Rho GTPases .....	55
5. Les facteurs de virulence activateurs des Rho GTPases induisent une réponse similaire à l'ETI ..	56
<b>Contexte et objectifs de recherche</b> .....	<b>58</b>

<b>Résultats .....</b>	<b>59</b>
<b>Article publié.....</b>	<b>60</b>
<b>Résultats complémentaires .....</b>	<b>64</b>
I.    LA TOXINE CNF1 D' <i>E. COLI</i> ACTIVE L'INFLAMMASOME NLRP3 .....	64
1.    L'immunité induite par CNF1 requiert l'inflammasome NLRP3 .....	64
2.    La sécrétion/maturation de l'IL-1 $\beta$ induite par CNF1 est indépendante de GSDMD .....	66
II.   FLII EST IMPLIQUEE DANS L'ACTIVATION DE NF-KB INDUITE PAR CNF1 EN MODULANT L'UBIQUITINATION DE RIP1 .....	67
1.    L'activation de Rac2 par CNF1 induit l'ubiquitination de RIP1 sur la Lys377.....	67
2.    FLII module l'ubiquitination de RIP1 induite par Rac2 active.....	69
<b>Discussion .....</b>	<b>74</b>
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>79</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>82</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>100</b>
<b>Article collaboratif.....</b>	<b>101</b>
<b>Article publié .....</b>	<b>104</b>



## Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail. Je remercie les Drs. Bénédicte PY et Éric GHIGO d'avoir consacré du temps à l'évaluation de mon mémoire de thèse en tant que rapporteurs. Je remercie les Drs. Harald KELLER et Stéphane MERESSE d'avoir accepté d'être les examinateurs de cette thèse. Un grand merci également au Dr. Patrick AUBERGER qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse.*

*Je remercie le Dr. Laurent BOYER d'avoir encadré et dirigé ma thèse. Merci de toute l'aide et les conseils que tu m'as donnés ces 3 (même 5) dernières années. Merci de m'avoir fait confiance pour la gestion de ce projet et fait participer à tes collaborations.*

*Je remercie le Dr. Emmanuel LEMICHEZ de m'avoir accueillie au sein de son équipe.*

*Je remercie également les membres de l'équipe qui m'ont aidé dans mon travail : merci à Greg de m'avoir supportée et conseillée sur tous les sujets, merci à Patrick pour sa gentillesse et sa disponibilité, merci à Anne pour son expertise technique, merci Aurélie, Maria, Romain et tous les autres membres de l'équipe, ainsi que les anciens dont Emilie pour sa gentillesse et pédagogie, le thésard modèle Daniel, et surtout Sabine, ma super technicienne.*

*Je voudrais remercier tous les collaborateurs : merci à toute l'équipe du Dr. Patrick AUBERGER pour leur aide, en particulier Arnaud que j'ai un peu (beaucoup) envahi et sollicité au début de ma thèse, Guillaume, Sandrine, Fred, Alix, Nathan, et tous les autres. Merci au Dr. Laurent YVAN-CHARVET et son équipe de m'avoir permis de participer à leur projet ; ce fut vraiment intéressant. Et surtout merci au Dr. Mohammed LAMKANFI et son équipe pour leur aide et le matériel fourni.*

*Je remercie également l'équipe 11 de m'avoir invitée pendant les pauses repas : Serena, Rania, Aude, Christophe, Virginie, Ilona, etc... Un merci tout particulier à Robin de m'avoir supportée (dans tous les sens du terme).*

*Enfin, je remercie ma famille de m'avoir soutenue : mes beaux-parents Nadine et Thotor, ma belle-sœur Angélique, Anne-Claire, ma tante Christiane, mes chons, etc...*

*Je finirai en remerciant les deux personnes les plus importantes de ma vie : papa mon père, sans qui je n'aurais jamais commencé cette thèse, et mon compagnon Jérémy, sans qui je ne l'aurais jamais finie.*

# **Abréviations**

# Abréviations

<b>25-HOC</b>	25-hydroxycholestérol
<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique
<b>AIM2</b>	Absent In Melanoma 2
<b>ALRs</b>	AIM2-Like Receptor
<b>AP-1</b>	Activator Protein 1
<b>APAF-1</b>	Apoptotic Protease-Activating Factor 1
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>ARP2</b>	Actin-related protein 2
<b>ASC</b>	Apoptotic-associated Speck-like protein
<b>ATP</b>	Adenosine TriPhosphate
<b>Avr</b>	Protéines d'avirulence
<b>BAPTA-AM</b>	1,2-bis(O-animophenocy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid acetoxymethyl ester
<b>BIR</b>	Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat
<b>BMDM</b>	Bone marrow-derived macrophages
<b>BRCC3</b>	BRCA1/BRCA2-Containing Complex Subunit 3
<b>CAPS</b>	Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome
<b>CARD</b>	Caspase Activation and Recruitment Domain
<b>CC</b>	Coiled-coiled domain
<b>Cdc42</b>	Cell Division Control portein 42 homolog
<b>CFU</b>	Colony forming unity
<b>CIITA</b>	class II, major histocompatibility complex, transactivator
<b>CLRs</b>	C-type Lectin Receptor
<b>CNF1</b>	Cytotoxic Nectrotizing Factor 1
<b>CNL</b>	Coiled-coil-NB-LRR
<b>COPs</b>	CARD-only protein
<b>DAMPs</b>	Danger-Associated Molecular Patterns
<b>DCs</b>	Dendritic Cells
<b>DRP1</b>	Dynamin-related protein 1
<b><i>E.coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>

<b>ER</b>	Endoplasmic reticulum
<b>ETI</b>	Effector-Triggered Immunity
<b>ExoS</b>	Exoenzyme S
<b>FAD</b>	Flavin adenine dinucleotide
<b>FADD</b>	Fas-Associated protein with Death Domain
<b>FLII</b>	Flightless-1 homolog
<b>FLS2</b>	Flagellin-sensitive 2
<b>GAP</b>	GTPase Activating Protein
<b>GBP5</b>	Guanylate Binding Protein 5
<b>GDI</b>	Guanosine nucleotide dissociation inhibitor
<b>GDP</b>	Guanine Diphosphate
<b>GEF</b>	Guanine nucleotide Exchange Factor
<b>Gène R</b>	Gène de résistance
<b>gp91</b>	Glycosylated flavin- and haem-containing protein 91
<b>Gr1</b>	Granulocyte marker 1
<b>GSDMD</b>	Gasdermin D
<b>GTP</b>	Guanine Triphosphate
<b>HACE1</b>	HECT domain and Ankyrin repeat Containing E3 ubiquitin protein ligase 1
<b>HD1/2</b>	Helical domain 1/2
<b>HIN200</b>	Hematopoietic Interferon-inducible Nuclear antigens with 200 aminoacid repeats
<b>HlyA</b>	Hemolysin- $\alpha$
<b>HMGB1</b>	high-mobility group box 1
<b>HSP90</b>	Heat Shock Protein 90
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interféron gamma
<b>I-<math>\kappa</math>B</b>	Inhibitor of NF- $\kappa$ B
<b>IFI16</b>	Interferon-inducible protein 16
<b>IGS</b>	Intergenic sequence
<b>IKK</b>	I- $\kappa$ B kinase
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleukine-1 beta
<b>IL-1R</b>	IL-1 Receptor
<b>IMD</b>	Immune Deficiency
<b>IP<math>_3</math></b>	Inositol tri-Phosphate
<b>IRAK</b>	Interleukine-1 Receptor Associated Kinase

<b>IRF</b>	Interferon Regulatory Factors
<b>ITAM</b>	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal Kinase
<b>KC</b>	Keratinocyte chemoattractant
<b>kDa</b>	KiloDalton
<b>LF</b>	Lethal Factor
<b>LGP2</b>	Laboratory of Genetics and Physiology 2
<b>Lgt1</b>	<i>Legionella</i> glucosyltransferase 1
<b>LIMK</b>	Lin11, Isl-1 and Mec-3 (LIM) domain containing kinase
<b>LIPA</b>	Lipase Acide lysosomale
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>LRP</b>	Laminin Receptor Precursor
<b>LRR</b>	Leucine-Rich Repeat
<b>LTA</b>	LipoTechoic Acid
<b>Lu/BCAM</b>	Lutheran blood group antigens and Basal Cell Adhesion Molecule
<b>LXR</b>	Liver X Receptors
<b>Mal</b>	MyD88-Adapter Like
<b>MAMPs</b>	Microorganisms Associated Molecular Patterns
<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinases
<b>MAVS</b>	Mitochondrial Antiviral Signaling protein
<b>MCP1</b>	Monocyte Chemoattractant Protein 1
<b>MD2</b>	Myeloid Differentiation factor 2
<b>MDA-5</b>	Melanoma Differentiation-Associated protein 5
<b>mDia2</b>	Mammalian Diaphanous 2
<b>MIP1<math>\alpha</math></b>	Macrophage Inflammatory Protein $\alpha$
<b>MLKL</b>	Mixed lineage kinase domain-like protein
<b>MMTV</b>	Mouse Mammary Tumor Virus
<b>MSEC</b>	Maladie du Stockage des Esters de Cholestérol
<b>MTI</b>	MAMPs-Triggered Immunity
<b>MyD88</b>	Myeloid Differentiation primary response gene 88
<b>NACHT</b>	Referred to proteins : NAIP, CIITA, HET-E, TEP1
<b>NADPH</b>	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydroxide
<b>NAIP</b>	Neuronal Associated Inhibitory Protein

<b>NAP1</b>	Nucleosome Assembly Protein 1
<b>NB-ARC</b>	Nucleotide binding adaptor shared by APAF-1, R proteins and CED-4
<b>NB-LRR</b>	nucleotide-binding site leucine-rich repeat
<b>NBD</b>	Nucleotide Binding Domain
<b>NDP</b>	Nucleotide Di-Phosphate
<b>NF-κB</b>	Nuclear Factor κ-light-chain-enhancer of activated B cell
<b>Nek7</b>	NIMA-related kinase 7
<b>NEL</b>	New E3 Ligases
<b>NEMO</b>	NF-κB Essential Modulator
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>NLRs</b>	NOD-Like Receptors
<b>NLRC4</b>	NLR-family CARD domain-containing protein 4
<b>NLRP3</b>	NOD-Like Receptor family, PYRIN domain containing 3
<b>NO</b>	Nitric oxide
<b>NOD</b>	Nucleotide-binding Oligomerization Domain protein
<b>NQO2</b>	Dihyronicotinamide ribose:quinone oxidoreductase 2
<b>NTP</b>	Nucleotide Tri-Phosphate
<b>OMV</b>	Outer Membrane Vesicles
<b>ops</b>	Operon Polarity Supression
<b>OspB</b>	Outer Surface Protein B
<b>P2X<sub>7</sub></b>	Purinoceptor 7
<b>PA</b>	Protective Antigen
<b>PAK</b>	P21 Activating Kinase
<b>PAMPs</b>	Pathogen Associated Molecular Patterns
<b>PBL</b>	Peripheral Blood Lymphoctes
<b>PFT</b>	Pore-forming toxins
<b>PGAM5</b>	Phosphoglycerate mutase family member 5
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Phospho Inositol di-phosphate
<b>PKR</b>	Protein Kinase R
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PMN</b>	polymorphonuclear neutrophile
<b>POPs</b>	PYD-only protein
<b>PopP2</b>	<i>Pseudomonas</i> outer protein P2

<b>PRRs</b>	Pattern Recognition Receptors
<b>PYD</b>	Pyrin domain
<b>qPCR</b>	Quantitative Polymerase Chain Reaction
<b>QVD</b>	quinolyl-valyl-O-methylaspartyl-[2,6-difluorophenoxy]-methyl ketone
<b>Rac</b>	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
<b>RANTES</b>	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
<b>RBD</b>	Responsible for BCAM binding Domain
<b>RBOH</b>	Respiratory Burst Oxidative protein
<b>RhoA</b>	Ras homolog gene family member A
<b>RIG-I</b>	Retinoic acid-Inducible Gene I
<b>RIN4</b>	RPM1-interacting protein 4
<b>RIP</b>	Receptor-Interacting Protein
<b>RLRs</b>	RIG-I Like Receptor
<b>ROCK</b>	Rho-associated Coiled-coil-containing protein Kinase
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>RPM1</b>	Resistance to <i>P. syringae</i> pv <i>Maculicola</i> 1
<b>RPS2</b>	Ribosomal Protein S2
<b>RSV</b>	Respiratory Syncytial Virus
<b>RTX</b>	Repeat in toxin
<b>SGT1</b>	Small Glutamine-rich Tetratricopeptide repeat-containing protein
<b>SINTBAD</b>	Similar to NAP1 TBK1 Adaptor
<b>siRNA</b>	Small interferant Ribonucleic Acid
<b>SOCE</b>	Store-operated Calcium Entry channel
<b>SREBP</b>	Sterol Regulatory Element-Binding Protein
<b>STAND</b>	Signal-Transducing ATPase with Numerous Domains
<b>T3SS</b>	Type III Secretion System
<b>TAB</b>	TAK1-Binding protein
<b>TAK</b>	TGF $\beta$ -Activated Kinase
<b>TBK1</b>	TANK Binding Kinase 1
<b>TcdA/B</b>	Toxin from <i>Clostridium difficile</i> A/B
<b>TGF</b>	Tumor Growth Factor
<b>TIR</b>	Toll/Interleukine-1 Receptor
<b>TIRAP</b>	TIR domain containing Adaptor Protein

<b>TLRs</b>	Toll-Like Receptors
<b>TNF</b>	Tumor Necrotizing Factor
<b>TNFR</b>	TNF Receptor
<b>TNL</b>	TIR-NB-LRR
<b>TRAF6</b>	TNF Receptor Associated Factor 6
<b>TRAM</b>	Translocation Associated Membrane protein
<b>TRIF</b>	TIR domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
<b>TXNIP</b>	Thioredoxin Interacting Protein
<b>Ub</b>	Ubiquitine
<b>Ubc13</b>	E2 Ubiquitin-conjugating protein 13
<b>Uev1A</b>	Ubiquitine conjugating enzyme variant 1A
<b>UPEC</b>	Uropathogenic <i>Escherichia coli</i>
<b>UTI</b>	Urinary Tract Infections
<b>UV</b>	UltraViolets
<b>VASP</b>	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
<b>VopS</b>	VP1686 adenosine monophosphate-protein transferase
<b>WASP</b>	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
<b>WAVE</b>	WASP-family verprolin-homologous protein
<b>WHD</b>	Winged-helix domain
<b>WT</b>	Wild Type





# Introduction

# Introduction

## I. LES FACTEURS DE VIRULENCE ET TOXINES BACTERIENNES DES *ESCHERICHIA COLI* UROPATHOGENES

### A. Notion de virulence

La virulence d'un organisme se définit par sa capacité à causer des dégâts à un autre organisme. Les bactéries pathogènes, responsables de nombreuses maladies, se distinguent des bactéries non pathogènes par l'expression de facteurs de virulence – également appelés effecteurs – et de toxines bactériennes. Il est classiquement attribué à ces toxines et effecteurs bactériens un rôle dans la survie de la bactérie au détriment de l'hôte en favorisant la colonisation ou en détournant les défenses de l'hôte.

Historiquement, les **effecteurs** bactériens sont des facteurs directement injectés dans le cytosol des cellules cibles qui vont manipuler les fonctions cellulaires hôtes (Galán, 2009). De façon similaire, les **toxines** bactériennes sont capables de détourner les fonctions essentielles des cellules cibles, mais ce sont des molécules sécrétées par la bactérie qui ont une capacité autonome de pénétrer dans le cytosol des cellules cibles (Alouf, 2000; Henkel et al., 2010).

Dans ce manuscrit, pour des raisons didactiques, le terme « **facteur de virulence** » sera utilisé pour les effecteurs bactériens injectés comme pour les toxines bactériennes sécrétées (Kaper et al., 2004).

### B. Les *Escherichia coli* uropathogènes (UPEC)

Les *Escherichia coli* (*E. coli*) sont des bactéries gram-négatif de la famille des entérobactéries. Elles font partie de la flore commensale humaine normale, mais il existe également des souches pathogènes telles que les ***E. coli* uropathogènes (UPEC)** responsables d'**infections du tractus urinaire (UTI)** (Kaper et al., 2004). Les UTI sont les infections extra-intestinales les plus fréquentes chez l'Homme. Les UPEC sont la 1<sup>ère</sup> cause d'UTI aiguë ou chronique chez l'Homme (80% des cas) touchant majoritairement les femmes : 60% des femmes ont déclaré une UTI au moins 1 fois dans leur vie (Hilbert et al., 2012).

La majorité des UPEC sont des opportunistes provenant du tractus digestif qui profitent de la susceptibilité de l'hôte pour coloniser et se nicher dans le tractus urinaire (Kaper et al., 2004). Les UTI sont classées en 2 catégories :

- les UTI basses ou cystites, où les UPEC restent dans la vessie, sont caractérisées par un inconfort au niveau du bas-ventre ainsi qu'une envie fréquente et urgente d'uriner
- les UTI hautes ou pyélonéphrites, lorsque les UPEC atteignent les reins, sont plus sévères : les patients souffrent de fortes douleurs lombaires souvent unilatérales, de nausées et de fièvre. Dans les cas les plus graves, les bactéries peuvent passer du rein vers le sang : l'UTI évolue en bactériémie et peut conduire à la mort du patient.

Les UPEC sont génétiquement très variées et utilisent un répertoire diversifié de **facteurs de virulence** (Welch, 2016), tels que les toxines **hémolysine- $\alpha$**  (50% des UPEC) et **CNF1** (30% des UPEC) (Landraud et al., 2000).

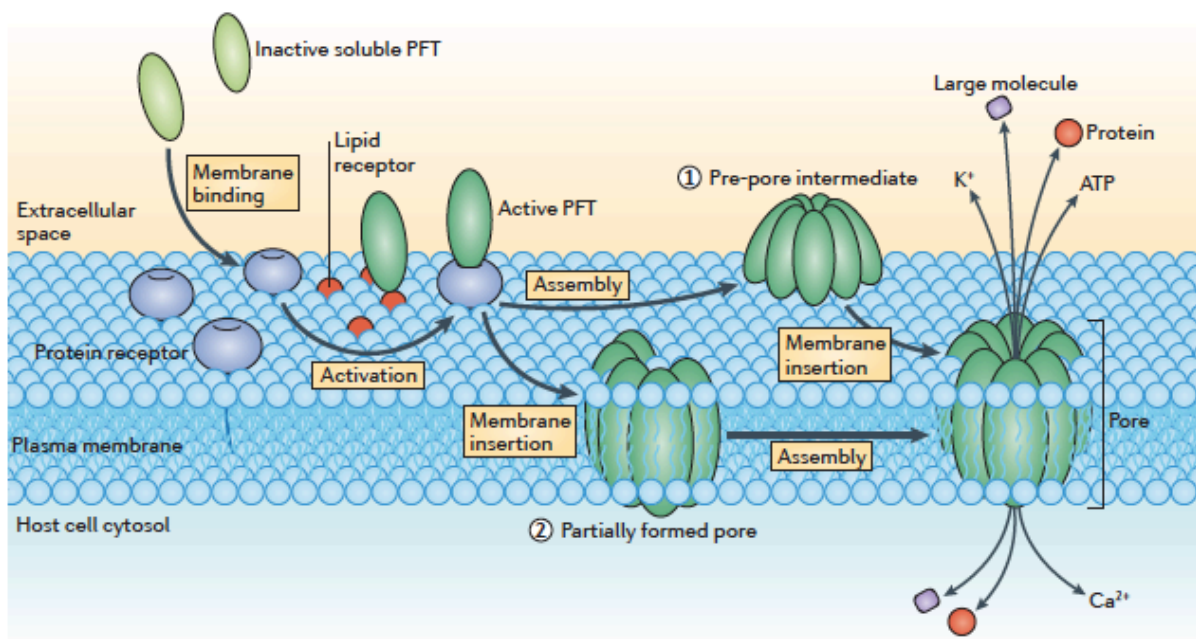
### C. L'hémolysine- $\alpha$ (HlyA) d'*E.coli*

L'**hémolysine- $\alpha$**  (HlyA) d'*E. coli* fait partie de la plus grande famille de toxines aujourd'hui caractérisée : les toxines formant des pores (Wiles and Mulvey, 2013). Elles sont sécrétées par des bactéries gram-positif et gram-négatif. Elles agissent à l'extérieur des cellules et s'insèrent dans la bicouche lipidique, s'oligomérisent et forment un pore ou canal de taille variable perméable aux ions voire à certaines protéines, ce qui induit la mort des cellules cibles. Elles ont également un rôle dans la perturbation des barrières épithéliales et du système immunitaire (Dal Peraro and van der Goot, 2016).

Le gène codant pour l'HlyA est situé sur l'**opéron chromosomique *hlyCABD*** dans l'îlot de pathogénicité II des *E. coli*. Cet opéron code pour une proforme de l'HlyA, l'acyltransférase HlyC, l'ATPase HlyB et la protéine de la membrane interne des bactéries HlyD (Hilbert et al., 2012). L'HlyA est traduite sous une proforme de 110kDa qui a besoin d'être modifiée post-traductionnellement par HlyC en une forme mature pour son activité cytotoxique. Les protéines HlyB et D forment avec la protéine de la membrane externe TolC le système de sécrétion qui exporte l'HlyA à l'extérieur de la bactérie où elle pourra se fixer sur ses cellules cibles.

L'HlyA a également été retrouvée associée aux vésicules de la membrane externe des bactéries (OMVs) responsables de la communication intercellulaire ou de la délivrance des toxines, bien que le rôle spécifique des OMVs n'est pas connu, ce qui suggère l'existence d'un mécanisme de sécrétion alternatif de l'HlyA (Kouokam et al., 2006; Wiles et al., 2008; Balsalobre et al., 2006).

L'HlyA est le prototype **des toxines formant des pores** de type RTX liant le  $\text{Ca}^{2+}$ . Elle est exprimée par plus de la moitié des UPEC (Wiles et al., 2008). Il existe un lien entre la cytotoxicité, la suppression de la réponse immunitaire et la production d'HlyA chez les souches cliniques isolées de patients atteints d'une UTI (Hilbert et al., 2012). Comme son nom l'indique, l'HlyA est capable d'induire, *in vitro*, une lyse des globules rouges, mais également d'autres cellules comme les cellules épithéliales, les neutrophiles, lymphocytes B et T et les monocytes, en formant des pores de 2nm de diamètre dans leur membrane mais le rôle de l'HlyA *in vivo* est encore débattu. La mort des cellules hôtes induite par l'HlyA a été proposée comme un moyen de relarguer des nutriments nécessaires à la croissance des UPEC (Wiles and Mulvey, 2013). L'existence du récepteur à l'HlyA est encore controversée, d'autant plus que l'HlyA est capable de former des pores dans des bicouches lipidiques artificielles (Valeva et al., 2005).



**Figure 1 :** Formation de pores membranaires par les toxines formant des pores (extrait de Dal Peraro and van der Goot, 2016)  
PFT = Pore-forming toxins ; ATP = Adenosine tri-phosphate

L'HlyA est également capable d'affecter les voies de signalisation de la cellule hôte à des **doses sublytiques** en inhibant notamment la sécrétion de cytokines (König and König, 1993). Elle est capable, en activant la mésotrypsine de l'hôte, d'induire la dégradation de la paxilline et d'autres protéines régulatrices telles que les composants de la voie NF- $\kappa$ B (Dhakal and Mulvey, 2012).

## D. Le facteur cytotoxique nécrosant (CNF1) d'*E. coli*

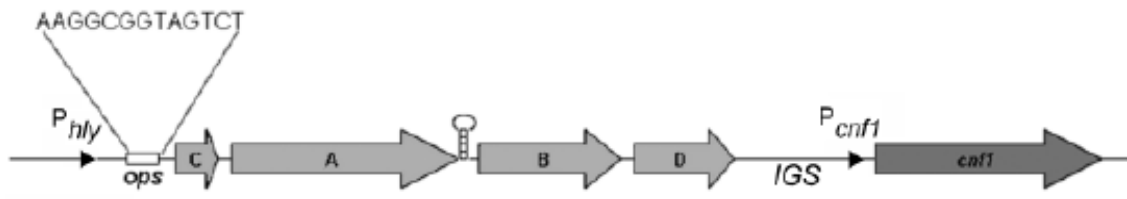
Comme plus de 30 facteurs de virulence bactériens, la toxine **CNF1** fait partie de la famille des **toxines modifiant les Rho GTPases** (Boquet and Lemichez, 2003). Les Rho GTPases sont des cibles privilégiées des facteurs de virulence, probablement car elles sont des protéines régulatrices du cytosquelette et de nombreux processus cellulaires. Ces facteurs de virulence modulent leur activité en mimant leurs protéines régulatrices (GEF, GAP ou GDI) ou en les modifiant post-traductionnellement (Aktories et al., 2000). On retrouve des facteurs de virulence activateurs et des inhibiteurs de Rho GTPases. CNF1 fait partie des toxines activatrices des Rho GTPases (Aktories et al., 2000).

CNF1 a été initialement identifiée pour induire des lésions nécrotiques chez le rongeur lorsqu'elle est injectée en sous-cutané, d'où son nom de facteur cytotoxique nécrosant (Caprioli et al., 1983). Elle appartient au sous-groupe des facteurs dermonécrotiques comprenant les toxines CNF2 (90% d'identité avec CNF1) et CNF3 (70% d'identité avec CNF1) d'*E. coli*, CNFy de *Yersinia pseudotuberculosis* (65% d'identité avec CNF1) et la toxine DNT de *Bordetella* (13% d'identité avec CNF1, mais 45% d'identité entre leurs domaines catalytiques) (Lemonnier et al., 2007) (Meysick et al., 2001).

CNF1 est retrouvée dans près d'un tiers des **UPEC** ainsi que dans environ 10% des ***E. coli* de type K1** responsables de méningites chez l'enfant. Bien que son rôle lors de l'infection ne soit pas clairement démontré, CNF1 faciliterait l'invasion des UPEC dans le tractus urinaire (Johnson et al., 2000) (Rippere-Lampe et al., 2001) (Bower et al., 2005). Elle induit également une **multinucléation** dans de nombreux types cellulaires en culture (Falbo et al., 1992) (Schmidt and Aktories, 2004).

### 1. Génétique et structure de CNF1

Le gène *cnf1* encode une protéine de 1014 acides aminés (Lemonnier et al., 2007). Il est situé sur le **même îlot de pathogénicité que l'opéron *hlyCABD*** (Blum et al., 1995). Le gène *cnf1* est systématiquement associé à l'opéron *hlyCABD* via une région intergénique hautement conservée (Landraud et al., 2003). Ils sont transcrits sur le même ARN messager et co-régulés par le facteur de transcription RfaH. CNF1 est ainsi toujours co-exprimée avec l'HlyA dans les souches pathogènes.

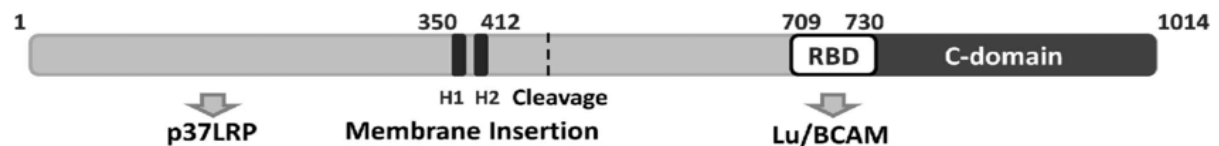


**Figure 2 :** L'îlot de pathogénicité II d'*E. coli* (extrait de Lemonnier et al., 2007)

ops = operon polarity supression ; IGS = intergenic sequence

CNF1 est une toxine de type AB de 114kDa composée de 3 domaines, chacun possédant une fonction propre :

- Un domaine N-terminal de **liaison à son récepteur**.
- Un domaine central contenant 2 hélices hydrophobes qui permet la **translocation** depuis la vésicule d'endocytose vers le cytosol.
- Un domaine C-terminal portant son **activité catalytique** de déamidase.



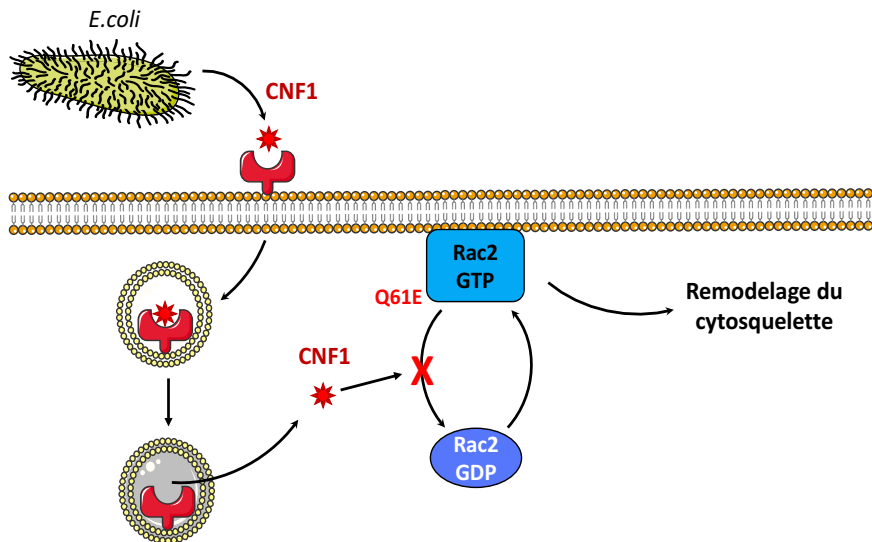
**Figure 3 :** Structure primaire de la toxine CNF1 d'*E. coli* (extrait de Piteau et al., 2014)

RBD = Responsible for BCAM binding Domain

Le **mécanisme de sécrétion** de la toxine CNF1 est peu connu mais, vu le lien génétique existant entre CNF1 et HlyA, il pourrait impliquer les mêmes systèmes que HlyA (Lemonnier et al., 2007). Une étude montre que CNF1 serait sécrétée via les OMVs (Kouokam et al., 2006) ; (Wiles et al., 2008). De manière intéressante, HlyA a également été retrouvée associée aux OMVs (Balsalobre et al., 2006). Les OMVs pourraient alors être un mécanisme de sécrétion simultanée de CNF1 et HlyA.

Une fois sécrétée dans le milieu extracellulaire, CNF1 se lie à son récepteur sur la cellule cible. Les équipes des Drs. Kim et Schmidt ont respectivement identifié les **récepteurs**

à la laminine LRP et Lu/BCAM comme étant des récepteurs de haute affinité à CNF1 (Chung et al., 2003) (Piteau et al., 2014). La liaison à son/ses récepteurs permet son internalisation par endocytose. Au cours de la maturation des endosomes en endolysosomes, il y a acidification du milieu intravésiculaire, permettant la **translocation** et le clivage du domaine catalytique de CNF1 dans le cytosol (Knust et al., 2009).



**Figure 4 :** Entrée de la toxine CNF1 d'*E. coli* dans la cellule hôte (adapté de (Flatau et al., 1997) (Lerm et al., 1999) (Doye et al., 2002a))

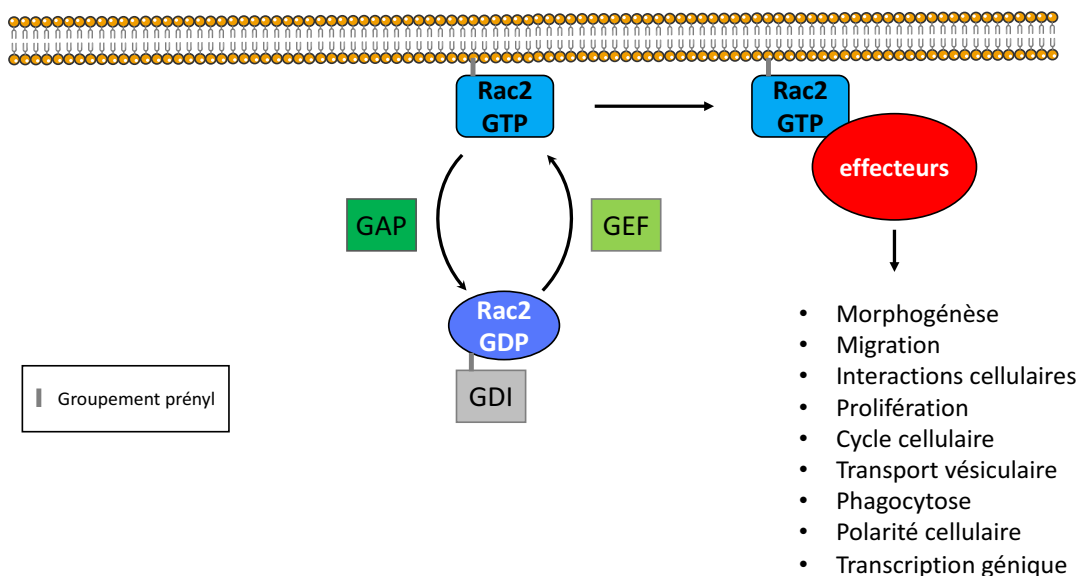
La toxine CNF1 est sécrétée dans le milieu par *E. coli*. Une fois fixée sur son récepteur, elle est internalisée dans la cellule hôte par endocytose. La maturation de l'endosome en endolysosome s'accompagne de son acidification qui induit un changement de conformation de CNF1 et la translocation de son domaine catalytique dans le cytosol. Une fois sortie de l'endosome, CNF1 modifie post-traductionnellement les Rho GTPases en déamidant la glutamine en position 61 ou 63, ce qui a pour conséquence d'empêcher l'hydrolyse du GTP et de bloquer les Rho GTPases sous forme active.



## 2. CNF1 active les Rho GTPases

### a. Les Rho GTPases

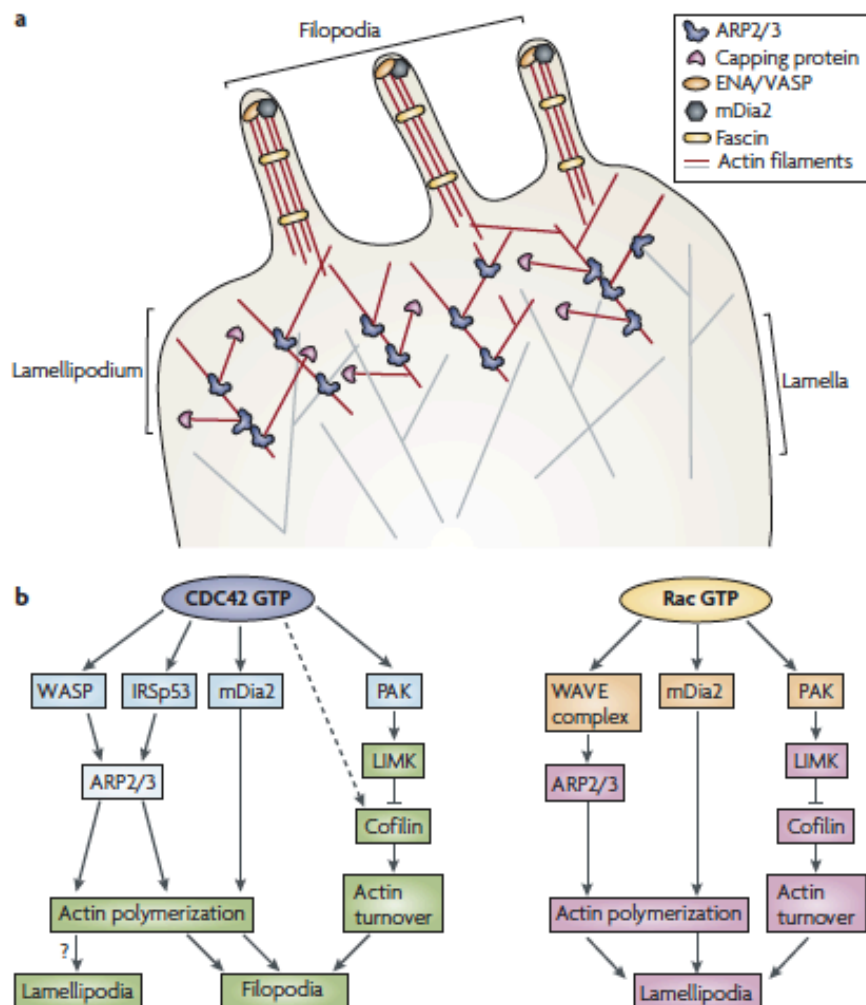
Les **Rho GTPases** font partie de la superfamille Ras des petites protéines G (Bishop and Hall, 2000). Il existe une vingtaine de Rho GTPases, les mieux caractérisées étant Rho, Rac et Cdc42. Les Rho GTPases sont des **interrupteurs moléculaires** qui cyclent entre un état inactif lié au GDP et un état actif lié au GTP. En tant que médiateurs de divers processus cellulaires, elles possèdent un système de régulation temporelle et spatiale élaboré (Hall, 2012). Leur activation est stimulée par des facteurs d'échange GEF et induit leur ancrage membranaire. Elles possèdent une activité GTPasique intrinsèque qui permet l'hydrolyse du GTP, mais leur inactivation peut également être stimulée par les protéines GAP. La protéine Rho GDI régule également les Rho GTPases en les séquestrant dans le cytosol (Lemichez, 2017).



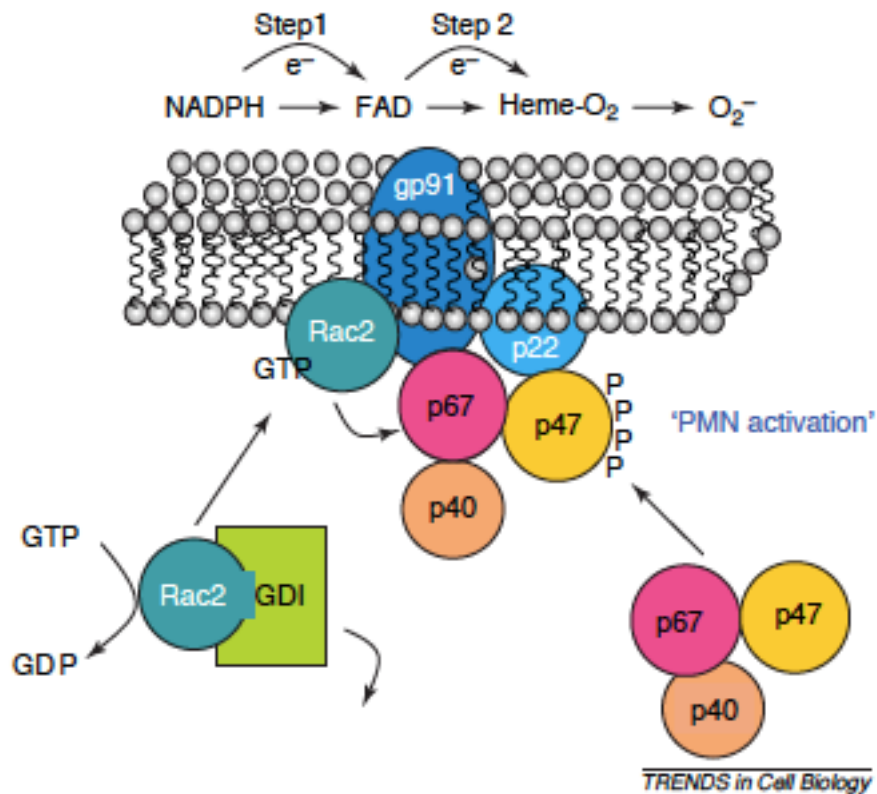
**Figure 5 :** Cycle GDP/GTP des Rho GTPases et interaction avec leurs effecteurs (adapté de Lemichez, 2017)

Les Rho GTPases sont des **protéines régulatrices du cytosquelette** impliquées dans une multitude de processus cellulaires, dont la migration cellulaire, le cycle cellulaire, la division cellulaire, le transport vésiculaire, la phagocytose, la morphogénèse, la polarité cellulaire, et la modulation de plusieurs voies de signalisation dont la voie JNK, des MAPK, NF- $\kappa$ B et la NADPH oxydase (Lemichez, 2017). Elles ont également un rôle dans la régulation de l'immunité innée (Bokoch, 2005).

Sous sa forme active, les Rho GTPases recrutent et activent **plusieurs effecteurs** pour contrôler l'architecture et la dynamique du cytosquelette d'actine (Zhao and Manser, 2005) (Lemichez, 2017). RhoA active majoritairement les kinases **ROCK1 et ROCK2** pour contrôler la contraction de l'actomyosine, la formation de fibres de stress et des adhésions focales (Julian and Olson, 2014). Les kinases de la **famille PAK** sont des effecteurs des GTPases Rac et Cdc42 et participent à l'organisation du cytosquelette d'actine pour contrôler la formation de filopodes et lamellipodes (Rane and Minden, 2014). Rac2 fait partie intégrante du complexe de la **NAPDH oxydase des phagocytes** qui participe à l'élimination des bactéries intracellulaires en produisant des ROS (Hordijk, 2006). Cdc42 régule la formation de filopode en recrutant l'effecteur **WASP**, mais également en interagissant avec la formine **mDia2** (Heasman and Ridley, 2008).



**Figure 6 :** L'activation de Rac et Cdc42 induit la formation de lamellipodes et filopodes (extrait de Heasman and Ridley, 2008)  
Schéma des lamellipodes et filopodes (a) et voies de signalisation en aval des Rho GTPases (b).



**Figure 7 :** Rac2 régule du complexe de la NADPH oxydase des phagocytes (extrait de Bokoch, 2005)  
PMN = polymorphonuclear neutrophile

Parmi les protéines régulatrices des Rho GTPases, on trouve également la protéine **Flightless-1 (FLII)** (Marei et al., 2016) Elle possède un domaine gelsoline de liaison à l'actine et plusieurs domaines LRR. FLII est un régulateur positif de l'assemblage de l'actine induite par les Rho GTPases (Davy et al., 2001) (Higashi et al., 2010). Elle module la migration cellulaire, les adhésions focales et les fibres de stress via son interaction avec Rac (Kopecki et al., 2011), ainsi que la contraction cellulaire dépendamment de RhoA/ROCK (Marei et al., 2016).

### *b. Effets de CNF1*

Le facteur de virulence CNF1 fait partie des activateurs des Rho GTPases. Une fois dans le cytosol, CNF1 transforme la glutamine en position 63 de RhoA (Flatau et al., 1997) (Schmidt et al., 1997) ou 61 de Rac et Cdc42 en glutamate, empêchant l'hydrolyse du GTP et **activant les Rho de manière irréversible** (Flatau et al., 2000) (Lerm et al., 1999). Les Rho GTPases constitutivement activées par CNF1 vont induire le remaniement du cytosquelette d'actine avec apparition de **fibres de stress et membranes ondulantes**, et activer diverses voies de signalisation telles que des **voies anti-apoptotiques**, une augmentation de l'**adhésion cellulaire** entre cellules et avec la matrice extracellulaire (Fiorentini et al., 1998), ou encore la génération d'**ion superoxyde** accompagné d'un comportement similaire à la **phagocytose**

(Falzano et al., 2001). Ces divers effets de CNF1 ont été montrés comme favorisant l'entrée des bactéries dans les cellules épithéliales (Doye et al., 2002b). Il a été démontré dans notre laboratoire que cette entrée des bactéries corrèle avec la diminution du niveau protéique des Rho GTPases dans les cellules traitées avec du CNF1 (Doye et al., 2002b). Ce travail suggère que **CNF1 exploite la machinerie protéasomale** de la cellule pour restreindre l'activation des Rho GTPases. De plus, le travail de notre laboratoire indique que le niveau de Rac1 activé est contrôlé par la E3-ligase HACE1 (Torrino et al., 2011), suggérant que cette régulation post-traductionnelle de la Rho GTPase Rac1 est importante pour permettre l'invasion bactérienne.

De manière intéressante, l'activation de la Rho GTPase Rac2 par **CNF1 induit une réponse immunitaire** chez la drosophile et chez l'Homme (Boyer et al., 2011). En effet, notre laboratoire a montré que sous forme active, Rac2 est capable de recruter la protéine IMD chez la drosophile, et ses homologues humains RIP1 et RIP2, afin d'activer le facteur de transcription Relish/NF- $\kappa$ B et la production de peptides antimicrobiens. Ces résultats nous ont permis d'identifier un mécanisme de **détection de l'activité des facteurs de virulence**.

Mon travail s'inscrit dans la recherche des mécanismes de détection de l'activité des facteurs de virulence par le système immunitaire. La question posée au début de ma thèse était de déterminer les mécanismes de l'immunité innée capable de détecter l'activation de la Rho GTPase Rac2 par le facteur de virulence CNF1 d'*E.coli*.

## II. DETECTION DES MICROORGANISMES PAR LE SYSTEME IMMUNITAIRE INNÉ

### A. La théorie des MAMPs

La fonction première du système immunitaire inné est de permettre aux cellules de l'hôte de distinguer le soi du non-soi. En 1989, Charles Janeway émet l'hypothèse que les microorganismes sont détectés par des récepteurs de l'hôte — qu'il appelle « **Pattern Recognition Receptors** » (**PRRs**) (Janeway, 1989). Les PRRs reconnaissent des motifs moléculaires conservés chez les microorganismes mais absents de l'hôte, appelés « Pathogen Associated Molecular Patterns » (PAMPs). La découverte de plusieurs familles de PRRs, de leurs ligands microbiens spécifiques et du rôle de ce système de reconnaissance dans l'immunité ont validé cette hypothèse (Medzhitov, 2009).

Aujourd'hui, on préférera le terme de **MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns)** à celui de PAMPs car ces molécules sont exprimées indépendamment du potentiel pathogène des microorganismes. En effet, les MAMPs reconnus par les PRRs sont pour la plupart des composants essentiels des membranes externes et enveloppes bactériennes ou fongiques (comme le LPS ou le peptidoglycane bactérien) ou des acides nucléiques non-eucaryotes. Ces composants sont partagés par une majorité de microorganismes et exposés dans le milieu extracellulaire, ce qui permet leur reconnaissance directe par les PRRs.

On distingue aujourd'hui deux groupes de PRRs : ceux qui détectent des ligands du milieu extracellulaire ou du compartiment endosomal (TLRs et CLRs) et ceux qui détectent des ligands intracellulaires (NLRs, ALRs et RLRs) (Lamkanfi and Dixit, 2014). La liaison du récepteur à son ligand conduit à des cascades de signalisation qui activent les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B, AP-1 et les IRF contrôlant la production de cytokines et de chimiokines. Certains NLRs et ALRs induisent un mécanisme de défense distinct en formant des complexes appelés inflammasomes.

## 1. Les TLRs

En 1996, l'équipe de Jules Hoffmann identifie le **récepteur Toll** comme responsable de l'induction d'une réponse antimicrobienne lors de l'infection chez *Drosophila melanogaster* (Lemaitre et al., 1996). Ces travaux ont permis l'identification par l'équipe de Charles Janeway d'homologues humains appelés plus tard « **Toll-like receptors** » (**TLRs**) (Medzhitov et al., 1998) et le clonage du premier TLR, le TLR4 reconnaissant le LPS bactérien, par l'équipe de Bruce Beutler (Poltorak et al., 1998) (O'Neill et al., 2013).

La famille des TLRs comprend les TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 et TLR13 (Takeuchi and Akira, 2010). Les TLR1 à 11 sont communs à l'homme et à la souris, bien que le TLR10 soit non fonctionnel chez la souris. Les TLR12 et 13 sont exprimés chez la souris et présents chez l'homme sous forme de pseudogènes (Joosten et al., 2016).

Les TLRs sont composés de 3 domaines :

- Un domaine N-terminal extracellulaire comprenant plusieurs **LRR (Leucine-riche repeats)** dédiés à la reconnaissance du ligand
- Un domaine transmembranaire
- Un domaine **TIR (Toll-Interleukine-1 Receptor)** intracellulaire en C-terminal impliqué dans la transduction du signal.

Les **TLRs reconnaissent des MAMPs** issus de **bactéries, virus et parasites** situés dans le milieu extracellulaire ou dans des compartiments intracellulaires (voir Tableau). Le **TLR4** est le seul à être présent à la fois à la surface des cellules et dans les endosomes, mais il active des voies de signalisation différentes selon sa localisation, respectivement pro-inflammatoire et anti-inflammatoire (Aksoy et al., 2012). En combinaison avec MD2, il reconnaît le **LPS**, composant dérivé de la membrane externe des bactéries gram-négatif.

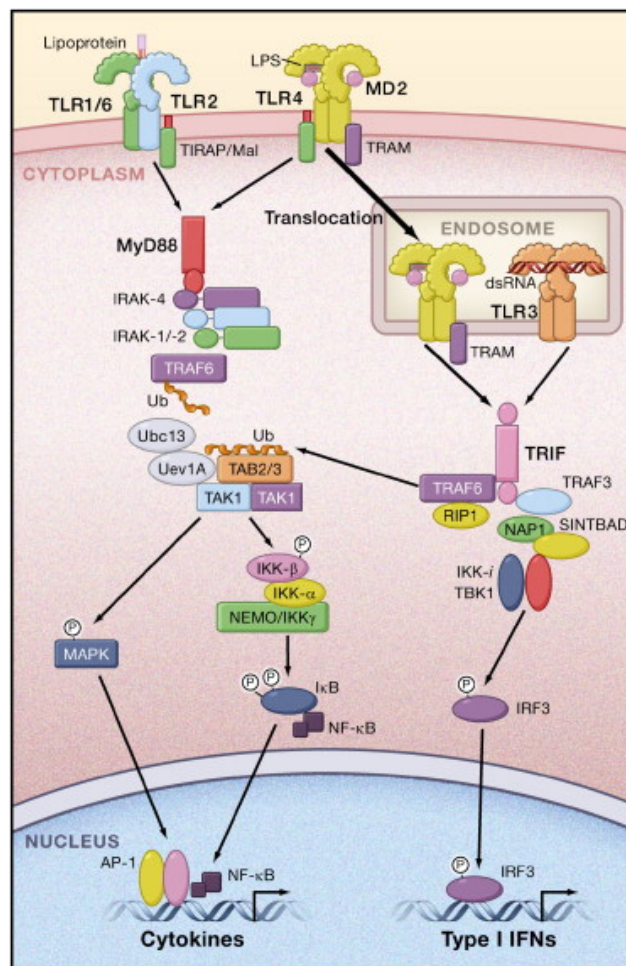
De manière intéressante, le TLR10 n'a aucun ligand connu à ce jour ; il pourrait jouer un rôle de régulateur négatif des autres TLRs (Jiang et al., 2016).

TLR	Localisation	Espèce	Ligands	Pathogènes reconnus	Expression tissulaire et cellulaire spécifique
TLR1	Extracellulaire	Homme et souris	Triacyllipopeptides	Bactéries	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expression tissulaire ubiquitaire</li> <li>• Monocytes, macrophages, DCs, leucocytes, lymphocytes B, T et NK</li> </ul>
TLR2	Extracellulaire	Homme et souris	Lipoprotéines, peptidoglycane, LTA, zymosan et mannan	Bactéries	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cerveau, cœur, poumons et rate</li> <li>• Macrophages, DCs et granulocytes</li> </ul>
TLR3	Compartiment endosomal	Homme et souris	ARN double brins	ARN double brins	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Placenta et pancréas</li> <li>• DCs, lymphocytes T et NK</li> </ul>
TLR4	Compartiments extracellulaire et endosomal	Homme et souris	LPS, RSV et protéines de fusion MMTV, mannans, et glycoinositolphosphate de <i>Trypanosoma</i> spp.	Bactéries Gram-négatif et virus	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rate</li> <li>• PBLs, lymphocytes B et T, DCs, monocytes, macrophages et granulocytes</li> </ul>
TLR5	Extracellulaire	Homme et souris	Flagelline	Bactéries	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ovaires et prostate</li> <li>• PBLs et monocytes</li> </ul>
TLR6	Extracellulaire	Homme et souris	Diacyllipopetides, LTA et zymosan	Bactéries	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Thymus, rate et poumons</li> <li>• Lymphocytes B et monocytes</li> </ul>
TLR7	Compartiment endosomal	Homme et souris	ARN simple brin riche en GU et petits ARN double brins	Virus et bactéries	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poumons, placenta, rate, ganglions lymphatiques et amygdales</li> <li>• Monocytes, lymphocytes B et DCs</li> </ul>
TLR8	Compartiment endosomal	Homme et souris	ARN simple brin riche en GU, petits ARN double brins et ARN bactériens	Virus et bactéries	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poumons, placenta, rate, ganglions lymphatiques et moelle osseuse</li> <li>• PBLs et cellules endothéliales</li> </ul>
TLR9	Compartiment endosomal	Homme et souris	ADN CpG et hemozoin de <i>Plasmodium</i> spp.	Bactéries, virus et parasites protozoaires	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rate, ganglions lymphatiques et moelle osseuse</li> <li>• PBLs, lymphocytes B et DCs</li> </ul>
TLR10	<i>Non déterminé</i>	Homme	<i>Non déterminé</i>	<i>Non déterminé</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rate, ganglions lymphatiques, thymus et amygdales</li> <li>• Lymphocytes B</li> </ul>
TLR11	Compartiment endosomal	Souris	Profiline et flagelline	Parasites Apicomplexa et bactéries	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rate, rein, foie et intestin</li> <li>• Epithélium, DCs et macrophages</li> </ul>
TLR12	Compartiment endosomal	Souris	Profiline	Parasites Apicomplexa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intestin et rate</li> <li>• DCs et macrophages</li> </ul>
TLR13	Compartiment endosomal	Souris	ARNr 23S bactérien à motif CGGAAAGACC	Bactéries	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rate</li> <li>• DCs et macrophages</li> </ul>

**Tableau 1 : TLRs et ligands (adapté de Broz and Monack, 2013)**

LTA = Lipotechoïc Acid ; DCs = Dendritic Cells ; PBLs = Peripheral Blood Lymphocytes ; NK = Natural Killer ; RSV = Respiratory Syncytial Virus ; MMTV = Mouse Mammary Tumor Virus

Les TLRs activés induisent des cascades de signalisation différentes en fonction des protéines adaptatrices recrutées (Martinon et al., 2009). En effet, il existe 4 adaptateurs fonctionnels qui peuvent interagir avec le domaine TIR intracellulaire des TLRs : MyD88, Mal, TRIF et TRAM (Joosten et al., 2016). Dans le cas du TLR4, la protéine **MyD88** est recrutée par l'intermédiaire du complexe TIRAP/Mal. Elle interagit avec la kinase IRAK4 qui active d'autres membres de la famille IRAK. Ces derniers se dissocient de MyD88 pour recruter la E3 ligase TRAF6, laquelle s'auto-ubiquitine. Ceci conduit au recrutement et à l'activation d'un complexe multiprotéique composé des protéines TAK1, TAB2 et TAB3. Ce complexe phosphoryle d'une part la sous-unité I- $\kappa$ B du complexe IKK, et d'autre part active la voie des MAPK. La phosphorylation d'I- $\kappa$ B conduit à sa dissociation du complexe IKK et sa dégradation, libérant le facteur de transcription **NF- $\kappa$ B** qui transloque dans le noyau où il permet l'expression de gènes de l'inflammation tels que les **cytokines pro-inflammatoires** (Takeuchi and Akira, 2010).



**Figure 8 :** La voie de signalisation du TLR4 (extrait de Takeuchi and Akira, 2010)



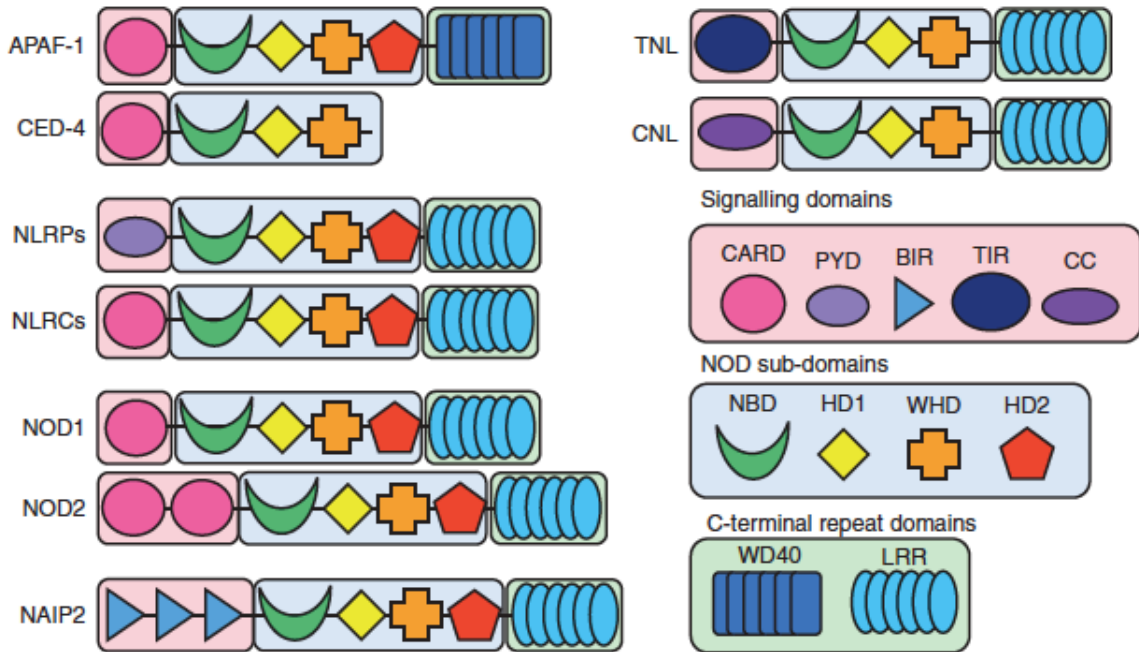
## 2. Les NLRs

Les « **NOD-Like Receptors** » (**NLRs**) sont des PRRs cytoplasmiques qui détectent des composants bactériens, toxines bactériennes et divers stress cellulaires. Il existe 22 NLRs humains et 34 murins (Saavedra et al., 2015). On retrouve également des protéines homologues chez la plante appelées **NB-LRR** encodées par des **gènes R** dits de résistance et impliquées dans la détection des pathogènes (développé plus en détail dans la partie III). Dans ce manuscrit, on utilisera la nomenclature la plus récente des NLR (Ting et al., 2008).

Les NLRs animaux et NB-LRR de plantes (également nommés NBS-LRR) font partie de la superfamille des protéines STAND qui cyclent entre une forme active liée à un nucléotide tri-phosphate (NTP) et une forme inactive liée à un nucléotide di-phosphate (NDP). De façon remarquable, il semble qu'il y ait eu une évolution convergente des NLRs chez la plante et chez le mammifère. Il est également intéressant de noter qu'il n'existe pas de NLR chez l'insecte (Martinon et al., 2009) (Meunier and Broz, 2017).

Les NLRs mammifères et NB-LRR de plantes sont composés de (Bentham et al., 2017) :

- un domaine C-terminal de type **LRR** dédié à la **reconnaissance du ligand** et qui pourrait jouer un rôle dans l'autoinhibition du récepteur en l'absence de stimuli (Griebel et al., 2014)
- un domaine central **NACHT** chez l'animal ou **NB-ARC** chez la plante pour l'**oligomérisation** et qui lie l'ATP essentiel pour l'activation du récepteur
- un domaine N-terminal variable pour l'**interaction protéine-protéine** :
  - un domaine TIR (on parle de récepteur TNL (TIR-NB-LRR)) ou coiled-coil (on parle de récepteur CNL (CC-NB-LRR)) chez la plante
  - un domaine acide, BIR, CARD, PYD ou autre chez l'animal.



**Figure 9 :** Structures des NLR mammifères et NB-LRR de plantes (extrait de Bentham et al., 2017)

APAF-1 = Apoptotic protease-activating factor 1 ; NLRPs = NLR containing PYD ; NLRCs = NLR containing CARD ; NOD1/2 = Nucleotide-binding Oligomerization Domain protein ; NAIP2 = NLR apoptosis-inhibitory protein 2 ; TNL = TIR-NB-LRR ; CNL = CC-NB-LRR ; CARD = Caspase recruitment domain ; PYD = Pyrin domain ; BIR = Baculovirus inhibitor of apoptosis repeat ; TIR = Toll/IL-1 receptor ; CC = Coiled-coiled domain ; NBD = Nucleotide binding domain ; HD1/2 = Helical domain 1/2 ; WHD = winged-helix domain ; LRR = Leucine-rich repeat

	<b>Domaine N-terminal</b>	<b>Homme</b>	<b>Souris</b>
<b>NLRA</b>	Domaine acide	CIITA	CIITA
<b>NLRB</b>	Domaine BIR	NAIP	NAIP1-7
<b>NLRC</b>	CARD	NOD1 NOD2 NOD3 NLRC4 NOD4	NOD1 NOD2 NLRC3 NLRC4 NLRC5
<b>NLRP</b>	PYD	NLRP1 NLRP2 NLRP3 NLRP4 NLRP5 NLRP6 NLRP7 NLRP8 NLRP9 NLRP10 NLRP11 NLRP12 NLRP13 NLRP14	NLRP1a-c NLRP2 NLRP3 NLRP4a-g NLRP5 NLRP6  NLRP9a-c NLRP10  NLRP12  NLRP14
<b>NLRX</b>	Pas d'homologie	NOD5	NLRX1

**Tableau 2 : Classification des NLRs humains et murins**

Les NLRs ne sont pas tous exprimés par les mêmes types cellulaires (Martinon et al., 2009). Alors que l'expression de NLRP1 semble ubiquitaire, l'expression de NLRP3 est restreinte aux cellules immunitaires, épithéliales et aux ostéoblastes. Les NAIPs et le NLRC4 sont retrouvés dans les macrophages, le cerveau, la rate, les poumons et le foie. Les NLRP4, NLRP5, NLRP7, NLRP8, NLRP10 et NLRP11 sont exprimés dans les cellules germinales.

Les premiers NLRs découverts, **NOD1 et NOD2**, reconnaissent les fragments issus de peptidoglycanes bactériens et activent **NF- $\kappa$ B** via le recrutement de la protéine RIP2, et la voie des **MAPK** (Philpott et al., 2014). Les **autres NLRs** ne sont pas impliqués dans la régulation transcriptionnelle des acteurs de l'inflammation mais régulent l'activation d'une enzyme essentielle à la maturation de la cytokine IL-1 $\beta$  : la caspase-1 (Meunier and Broz, 2017). Lorsque les NLRs sont activés, ils forment un complexe multiprotéique appelé **inflammasome**. Cette partie sera développée plus loin (partie II.B).

### 3. Les autres PRRs

Les « **C-type Lectin Receptors** » (**CLRs**) sont des récepteurs dont il existe des formes transmembranaires ou circulantes et qui reconnaissent les carbohydrates des virus, bactéries et fungi (Lamkanfi and Dixit, 2014) (Ip et al., 2009). Par exemple, les Dectin-1 et Dectin-2 sont des récepteurs à motif ITAM des  $\beta$ -glucanes, composants externes des fungi.

Les « **RIG-I Like Receptors** » (**RLRs**) sont des récepteurs intracellulaires comprenant RIG-I, MDA-5 et LGP2 (Lamkanfi and Dixit, 2014). Ils sont situés dans le cytoplasme et reconnaissent l'ARN double brins des virus.

Les « **AIM2-Like Receptors** » (**ALRs**) sont des récepteurs intracellulaires capables de détecter les ADN double brins bactériens et viraux. Il existe 4 ALRs humains et 14 murins (Man and Kanneganti, 2015). Le représentant majeur de cette famille, **AIM2**, est composé d'un domaine HIN200 et d'un domaine PYD. Il est capable de détecter les ADN double brins de *Francisella tularensis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, du cytomégalovirus et du virus de la vaccine, et de former un **inflammasome** en recrutant l'adaptateur ASC pour activer la caspase-1. Certains pathogènes coderaient des facteurs de virulence permettant d'échapper à la reconnaissance par les ALRs, ce qui expliquerait qu'il ne « détecte pas » tous les ADN pathogènes (Ge et al., 2012).

## B. Les inflammasomes

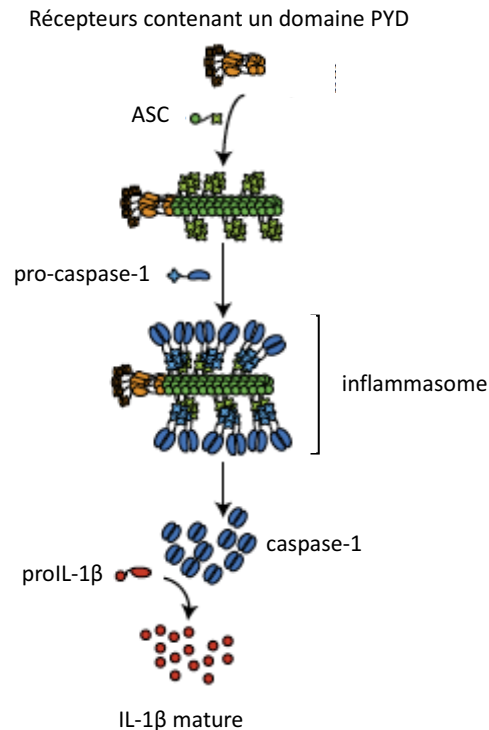
La plupart des NLRs et ALRs forment des complexes multiprotéiques appelés **inflammasomes** pour activer les caspases inflammatoires directement ou via l'adaptateur ASC (Lamkanfi and Dixit, 2014). Les inflammasomes régulent les défenses de l'hôte en produisant des éicosanoïdes, les cytokines pro-inflammatoires matures **IL-1 $\beta$**  et **IL-18**, et en induisant parfois la mort des cellules par **pyroptose**. L'IL-1 $\beta$  est un puissant médiateur pro-inflammatoire qui recrute les cellules immunitaires innées sur le site de l'infection et module l'activité des cellules immunitaires adaptatives (Garlanda et al., 2013). L'IL-18 est importante pour la production d'IFN $\gamma$  et potentialiser l'activité cytotoxique des lymphocytes T et NK.

Les **caspases inflammatoires** sont les caspase-1, 4, 5 humaines et les caspase-1 et 11 murines. La caspase-8 a récemment été décrite comme également impliquée dans le processus inflammatoire indépendamment de son activité apoptotique (Gurung and Kanneganti, 2015). De manière intéressante, la caspase-8 semble aussi capable de cliver directement l'IL-1 $\beta$  (Conos et al., 2016). Au contraire, le rôle de la caspase-12, initialement décrite comme régulatrice de l'inflammation, est aujourd'hui remis en question (Vande Walle et al., 2016).

Les caspases sont des protéases à cystéine produites sous forme de zymogènes inactifs. Elles nécessitent leur clivage protéolytique par d'autres caspases du même type pour être enzymatiquement actives. Le mécanisme exact n'est pas encore bien caractérisé, mais la formation de l'inflammasome avec une caspase initiatrice permettrait le recrutement d'autres pro-caspases, ce rapprochement étant suffisant pour initier leur clivage réciproque. Les caspases inflammatoires peuvent toutes induire la pyroptose, mais seule la caspase-1 est capable de **cliver les cytokines pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18** en formes matures. L'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 ne sont pas sécrétées via le circuit classique du RE-Golgi mais sont produites sous forme de précurseurs qui nécessitent leur clivage pour être actives. Le mécanisme précis de sécrétion de l'IL-1 $\beta$  est controversé et sera discuté plus loin dans ce manuscrit (partie II.B.4). La proIL-18 est constitutivement produite dans les macrophages, mais la proIL-1 $\beta$  est sous contrôle du facteur de transcription NF- $\kappa$ B.

Comme la plupart des NLRs n'ont pas de domaine CARD pour lier directement les caspases, on retrouve dans la majorité des inflammasomes **l'adaptateur ASC** contenant un domaine PYD et un domaine CARD (Dick et al., 2016). Lors de l'assemblage de l'inflammasome, l'activation du NLR induit l'oligomérisation de ASC qui forme des filaments et des « **specks** » nécessaires au clivage de l'IL-1 $\beta$ . Ce système sert de signal d'amplification en exposant de multiples sites potentiels d'activation de la caspase-1. Il a également été montré qu'après

pyroptose, les ASC specks peuvent s'accumuler dans l'espace extracellulaire et continuer à induire le clivage de l'IL-1 $\beta$  (Franklin et al., 2014).



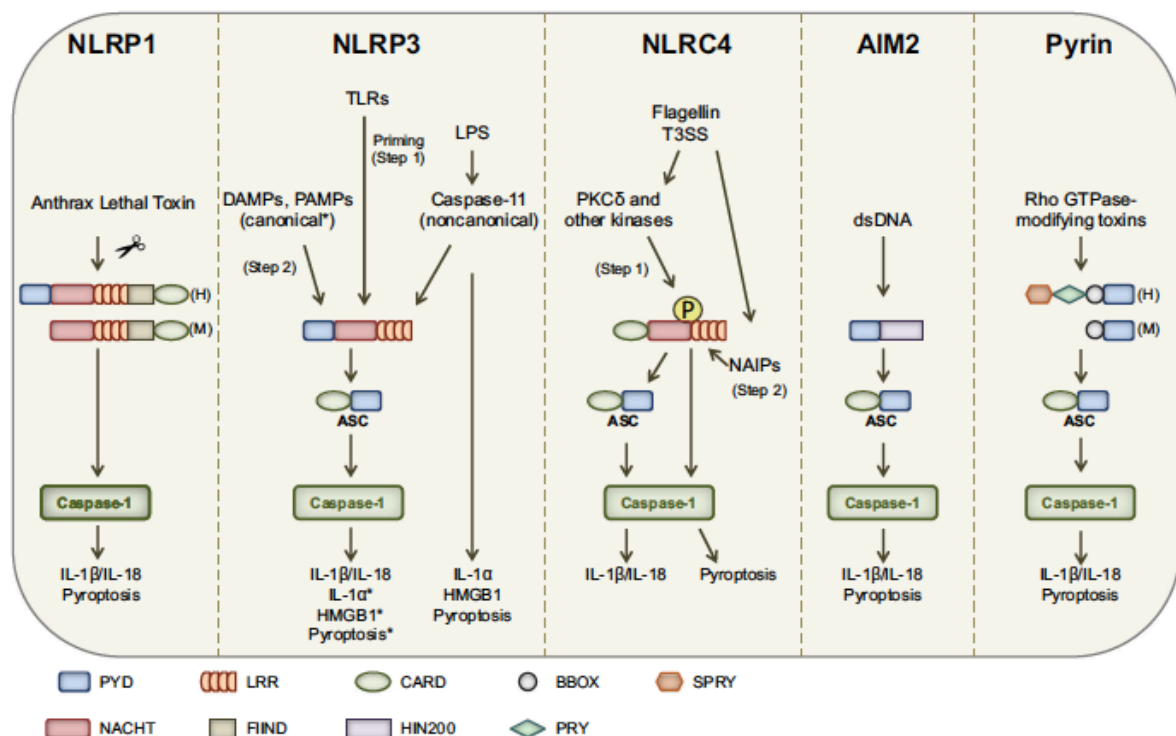
**Figure 10 :** L'oligomérisation de ASC amplifie le clivage de l'IL-1 $\beta$  induit par l'activation de l'inflammasome (adapté de Dick et al., 2016)

Les NLRs et ALRs aujourd'hui décrits pour former des inflammasomes sont les **NLRP1**, **NLRP3**, **NLRC4/NAIP** ainsi que les protéines **AIM2** et, plus récemment décrit, **PYRIN**. De récentes preuves montrent que les NLRP2, NLRP6, NLRP7, NLRP12 et l'ALR IFI16 pourraient former un inflammasome, même si le mécanisme est encore inconnu. Ces différents inflammasomes détectent différents types de signaux :

- Des **MAMPs** (NLRC4/NAIP et AIM2)
- Des **stress cellulaires** (NLRP3)
- Ou encore des **toxines**, directement (NLRP1) ou indirectement (PYRIN et NLRP3 dans notre étude) ; ces derniers seront développés dans la partie III.

NLRC4 et NLRP3 ont besoin d'**ATP** pour s'oligomériser (Martinon et al., 2009). Les régulateurs des inflammasomes sont encore peu connus : les protéines de la famille des **COPs** (CARD-only proteins) et **POPs** (PYD-only proteins), contenant respectivement un domaine

CARD ou PYD, interfèreraient dans l'interaction des membres de l'inflammasome (Stehlik and Dorfleutner, 2007) (de Almeida et al., 2015). La **caspase-12** a été décrite comme étant un régulateur négatif de la caspase-1 (Saleh et al., 2006), bien qu'aujourd'hui, ce rôle soit remis en question (Vande Walle et al., 2016). Il existe d'autres mécanismes de régulation spécifiques de NLRP3 comme l'implication des protéines Nek7 (He et al., 2016b) (Shi et al., 2016) ou BRCC3 (Py et al., 2013), ou encore la phosphorylation du NLRC4 (Qu et al., 2012) qui seront développés plus loin dans ce manuscrit.



**Figure 11 :** Schéma des 5 inflammasomes actuellement décrits (extrait de Saavedra et al., 2015)

De par leurs rôles de régulateurs de l'inflammation, les NLRs et ALRs sont aussi impliqués dans de nombreuses **maladies auto-inflammatoires** (dysfonctions du système immunitaire inné avec épisodes inflammatoires excessifs) **et maladies auto-immunes** (dysfonctions du système immunitaire adaptatif avec présence d'auto-anticorps). Les mutations du NLRP3, autrefois appelé Cryopyrin, sont associées aux CAPS (Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome). Ces syndromes auto-inflammatoires sont caractérisés par des mutations de NLRP3 qui conduisent à une forme constitutivement active associée à une augmentation d'IL-1β et à l'apparition de fièvre, d'éruptions cutanées et une inflammation

des articulations (Saavedra et al., 2015). Plus de 40 mutations sont actuellement référencées dans les banques de données, notamment les mutants R258W, A350V et L351P utilisés comme modèle d'étude murins des CAPS (Meng and Strober, 2010). Il a également été montré que des mutations du gène codant NLRP3 favorisent le développement de plusieurs maladies auto-immunes. Les patients atteints d'arthrite rhumatoïde présentent une augmentation de l'expression génique du NLRP3 (Mathews et al., 2014). A l'inverse, la diminution de l'expression du NLRP3 favoriserait le développement du lupus systémique érythémateux (Lech et al., 2015).

Le NLRP3 n'est pas le seul inflammasome associé à ces maladies. En effet, l'augmentation de l'expression du AIM2 est associée au développement du psoriasis, de l'anéurisme aortique abdominal et du lupus, alors que sa réduction est associée aux cancers colorectal et prostatique. Des mutations du gène *Mefv* codant pour une forme constitutivement active de PYRIN (par exemple les mutants V726A, M680I ou M694V (Chae et al., 2011)) sont associées à la fièvre méditerranéenne familiale (Saavedra et al., 2015).

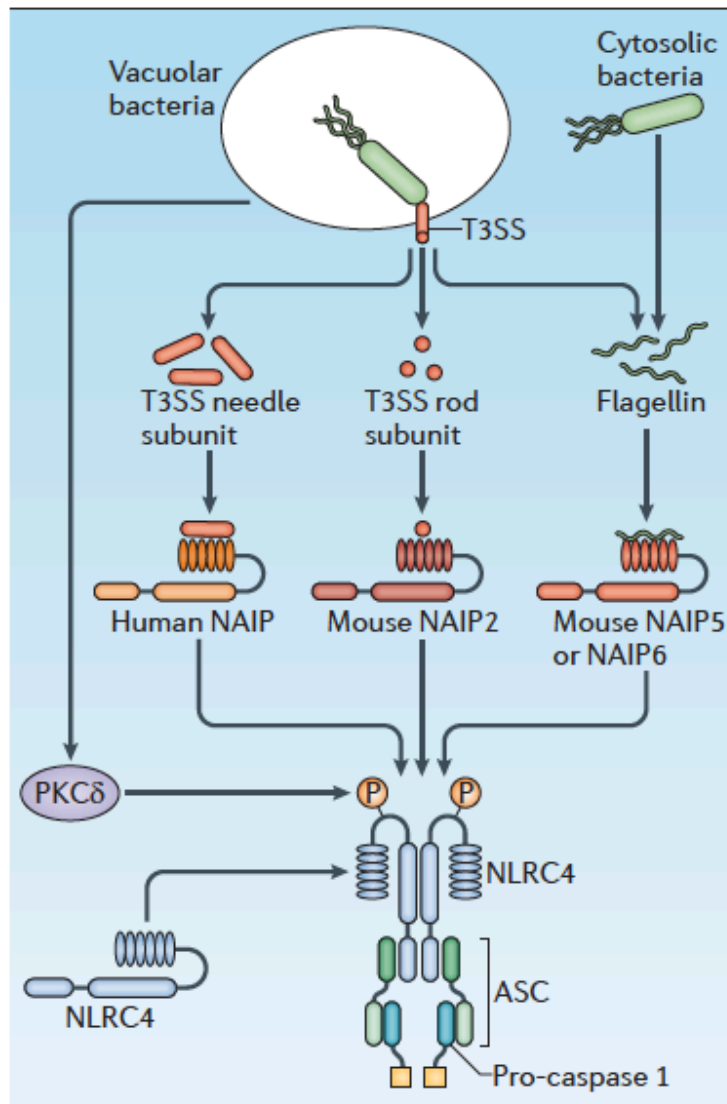
## 1. L'inflammasome NLRC4/NAIP

Le premier NLR caractérisé pour sa capacité à former un inflammasome est **NLRC4** (Broz and Monack, 2013). NLRC4 contient un domaine CARD capable de recruter directement la caspase-1. Cependant, la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 dépend de l'adaptateur ASC, contrairement à la pyroptose qui ne requiert pas ASC (Saavedra et al., 2015). De façon intéressante, NLRC4 n'est pas un récepteur à proprement parler puisqu'il ne détecte pas directement de ligands pathogènes. En effet, il a été démontré chez la souris qu'il s'assemble avec un autre NLR de la famille **NAIP** pour former un inflammasome.

Il existe 1 seul NAIP humain et 7 murins. Les rôles des NAIP3, NAIP4 et NAIP7 dans l'immunité innée n'ont pas encore été déterminés. NAIP1 et NAIP2 reconnaissent respectivement l'aiguille et la tige basale composant le **système de sécrétion bactérien de type III (T3SS)** de *Salmonella* Typhimurium, *E. coli*, *Shigella flexneri*, *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia thailandensis* et *Legionella pneumophila* (Lamkanfi and Dixit, 2014) (Man and Kanneganti, 2015). NAIP5 et NAIP6 reconnaissent la **flagelline**, composant du flagelle bactérien. Le NAIP humain, lui, n'est pas capable de reconnaître la flagelline mais détecte le T3SS.

A la différence des autres NLRs, les NAIPs semblent fonctionner comme de vrais PRRs puisqu'ils reconnaissent directement des MAMPs (Zhao and Shao, 2016). La liaison du ligand induirait un changement conformationnel qui permettrait l'oligomérisation avec le NLRC4. Le mécanisme d'activation de l'inflammasome NLRC4 par les NAIPs est mal connu, mais il requiert la **phosphorylation de NLRC4** sur la Sérine en position 533 (Qu et al., 2012).





**Figure 12 :** Activation et assemblage de l'inflammasome NLRC4/NAIP (extrait de Qu et al., 2012)

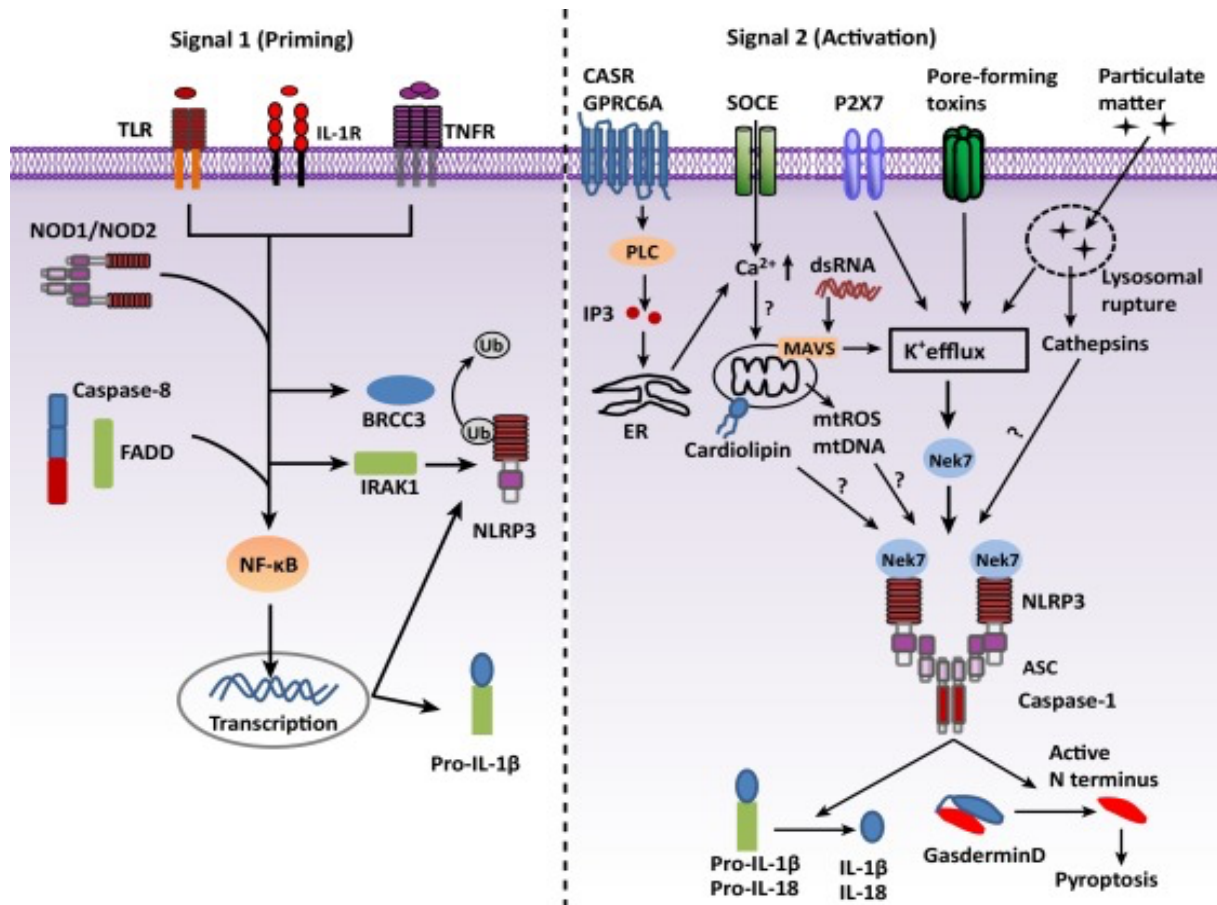
PKCδ = Protein Kinase C δ ; T3SS = Type III Secretion System ; NAIP = Neuronal associated inhibitory protein ; NLRC4 = NLR-family CARD domain-containing protein 4 ; ASC = Apoptosis-associated speck-like protein

## 2. L'inflammasome NLRP3

Le récepteur **NLRP3** reconnaît un large répertoire de signaux de danger structurellement et chimiquement différents. Il détecterait les **perturbations de l'homéostasie cellulaire ou stress cellulaires**. Le NLRP3 est exprimé par les cellules immunitaires, épithéliales et les ostéoblastes (Martinon et al., 2009). Il contient un domaine PYD qui recrute l'adaptateur ASC pour activer la caspase-1. L'assemblage de l'inflammasome NLRP3 canonique permet l'activation de la caspase-1, ce qui conduit à la maturation et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et IL-18 et peut conduire à la pyroptose accompagnée de la sécrétion d'IL-1 $\alpha$  et de HMGB1 (Saavedra et al., 2015). L'inflammasome NLRP3 peut également être activé de façon non-canonique par la caspase-11 qui ne permet pas la maturation directe de la pro-IL-1 $\beta$  mais entraîne la pyroptose ; cette partie sera développée plus loin.

L'inflammasome NLRP3 nécessite **2 signaux** pour s'assembler :

- Le premier, appelé « **priming** », consiste en l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, par les voies de signalisation des TLRs ou des récepteurs à cytokines (TNFR ou IL-1R par exemple), pour transcrire les protéines nécessaires à son assemblage : NLRP3, pro-caspase-1 et pro-IL-1 $\beta$ .
- Le second permet l'**activation** du récepteur NLRP3 et l'assemblage à proprement parlé de l'inflammasome.



**Figure 13 :** Activation et assemblage de l'inflammasome NLRP3 (extrait de He et al., 2016a)

TLR = Toll-like Receptor ; IL-1R = Interleukine-1 Receptor ; TNFR = Tumor Necrosis Factor Receptor ; NOD1/2 = Nucleotide-binding Oligomerization Domain protein ; BRCC3 = BRCA1/BRCA2-Containing Complex Subunit 3 ; IRAK1 = IL-1R associated kinase 1 ; NLRP3 = NLR containing PYD protein 3 ; CASR = Calcium Sensing Receptor ; GPRC6A = G protein-coupled receptor family C group 6 member A ; PLC = Phospholipase C ; ER = Endoplasmic Reticulum ; SOCE = Store-operated Calcium Entry channel ; P2X7 = Purinoceptor 7 ; dsRNA = double strand RNA ; MAVS = Mitochondrial Antiviral signaling protein ; mtROS = mitochondrial Reactive Oxygen Species ; mtDNA = mitochondrial DNA ; Nek7 = NIMA related kinase 7 ; ASC = Apoptosis-associated speck-like protein

*a. NLRP3 est activé par une variété de stimuli*

NLRP3 est activé par de nombreux stimuli pathogènes et stériles tels que les **bactéries**, **les virus**, **les champignons**, **les toxines** formant des pores, **les cristaux** (acide urique, silice...), **les agrégats protéiques** (β-amyloïde) et **les DAMPs** (ATP, ...) (Lamkanfi and Dixit, 2014). Vu la variété de stimuli qui l'active, le mécanisme de détection est probablement indirect mais pas encore déterminé. Il est difficile de trouver un seul point commun à tous ces stimuli et donc de déterminer le signal d'activation du NLRP3 (He et al., 2016a).

**L'efflux de K<sup>+</sup>** a été proposé comme le signal le plus probable d'activation du NLRP3 (Pétrilli et al., 2007). En effet, l'ATP, les toxines formant des pores (comme la nigéricine) et les matières particulaires (cristaux) induisent une sortie du K<sup>+</sup> intracellulaire ce qui permet l'assemblage de l'inflammasome NLRP3. Notamment, l'ATP relargué en réponse aux DAMPs stimule de façon autocrine le récepteur purinergique P2X<sub>7</sub> qui induit un efflux de K<sup>+</sup> et active le NLRP3 (Piccini et al., 2008). Les toxines formant des pores activeraient le NLRP3 via l'efflux de K<sup>+</sup> induit par la formation de pores dans la membrane plasmique (Chu et al., 2009) (Karmakar et al., 2015). La phagocytose des matières particulaires induit un efflux de K<sup>+</sup> qui activent NLRP3 (Muñoz-Planillo et al., 2013). De manière intéressante, l'activation du NLRP3 non canonique par la caspase-11 semble résulter également de l'efflux de K<sup>+</sup> (Rühl and Broz, 2015). Le mécanisme exact est inconnu, mais il précède l'activation de NLRP3 et induit probablement un changement de conformation du NLRP3. L'efflux de K<sup>+</sup> est le point commun de la majorité des activateurs du NLRP3.

Les **dysfonctionnements mitochondriaux** ont également été proposés comme activateurs du NLRP3 (Mills et al., 2017). Ce dernier est activé lors de la production de ROS mitochondriaux produits par la NQO2 ou le Complexe I (Zhou et al., 2011) (Groß et al., 2016), lors du le relargage d'ADN mitochondrial (Shimada et al., 2012) ou encore lors de la translocation de la cardiolipine de la membrane mitochondriale interne à la membrane mitochondriale externe (Iyer et al., 2013). La protéine MAVS, une protéine de signalisation activée par les RLRs, peut également recruter NLRP3 à la mitochondrie favorisant ainsi son oligomérisation (Park et al., 2013) (Subramanian et al., 2013). De façon contradictoire, d'autres études montrent que les perturbations des mitochondries sont dispensables à l'activation du NLRP3 (Muñoz-Planillo et al., 2013).

La **production de ROS** est commune à l'activation de NLRP3 par les cristaux (matières particulaires), les UV, l'ATP et la nigéricine. Les ROS produits par la NADPH oxydase ont été proposés comme point commun de plusieurs stimuli du NLRP3, mais les macrophages dépourvus de NADPH oxydase présentent une activité normale de l'inflammasome NLRP3 (van Bruggen et al., 2010). De manière intéressante, chez les neutrophiles, les ROS ne sont pas requis pour l'activation de la caspase-1 ou le clivage de l'IL-1 $\beta$  mais sont impliqués dans la sécrétion d'IL-1 $\beta$  (Gabelloni et al., 2013). Une autre étude montre que les ROS seraient impliqués non pas dans l'activation du NLRP3 mais dans l'étape de « priming » (Bauernfeind et al., 2011). Le rôle des ROS dans l'activation de NLRP3 reste encore aujourd'hui controversé.

**L'augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire** ou le stress du Réticulum Endoplasmique (RE) est induit par l'ATP, la nigéricine et les matières particulaires lors de l'activation du NLRP3. L'augmentation du Ca<sup>2+</sup> extracellulaire active le NLRP3 via la stimulation des récepteurs senseurs de calcium couplés aux protéines G (Rossol et al., 2012). Le chélateur de Ca<sup>2+</sup> BAPTA-

AM inhibe la sécrétion d'IL-1 $\beta$  sous le NLRP3, suggérant un rôle de ce dernier dans l'activation de l'inflammasome (Feldmeyer et al., 2007). Il y aurait également un rôle du RE via la phospholipase C (PLC) qui clive le PIP<sub>2</sub> en IP<sub>3</sub> ; l'inhibition de la PLC ou de l'IP<sub>3</sub> bloque la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par le NLRP3 (Lee et al., 2012). D'autres études montrent que la signalisation du NLRP3 est indépendante du Ca<sup>2+</sup> (Katsnelson et al., 2015). Le rôle du Ca<sup>2+</sup> dans l'activation du NLRP3 sous stimulation par l'ATP passerait par les dysfonctionnements mitochondriaux qu'il induirait (Murakami et al., 2012).

Les matières particulaires activent NLRP3 via le **relargage cytosolique des cathepsines lysosomales** lors des dommages qu'ils causent à la membrane lysosomale pendant leur phagocytose (Hornung et al., 2008). L'inhibiteur de la cathepsine B Ca-074-Me inhibe le NLRP3, mais les macrophages invalidés pour la cathepsine B l'activent sans problème (Dostert et al., 2009). Plusieurs cathepsines seraient impliquées individuellement (Orlowski et al., 2015). Le rôle de la rupture lysosomale dans l'activation du NLRP3 reste indéterminé.

#### *b. Les régulateurs du NLRP3*

Un nouveau composant de l'inflammasome NLRP3 a récemment été identifié : la protéine **Nek7** (Schmid-Burgk et al., 2016). Nek7 une sérine-thréonine kinase impliquée dans la mitose et requise pour l'activation du NLRP3 en aval de la stimulation par l'ATP, la nigéricine, les cristaux d'acide urique, de silice, d'amiante ou d'aluminium (He et al., 2016b) (Shi et al., 2016). Nek7 interagit via son domaine catalytique avec le LRR de NLRP3, mais son activité kinase n'est pas requise. Elle contrôle l'oligomérisation de NLRP3, la formation des « ASC-speck » et l'activation de la caspase-1 sous efflux de K<sup>+</sup> et les ROS.

Le(s) mécanisme(s) de régulation du NLRP3 sont encore mal connus et en cours d'exploration (Man and Kanneganti, 2015) (He et al., 2016a). En plus d'une induction transcriptionnelle au cours de l'étape de « priming », la **déubiquitination** du domaine LRR de NLRP3 par l'enzyme **BRCC3** favorise l'activation de l'inflammasome et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  (Juliana et al., 2012) (Lopez-Castejon et al., 2013) (Py et al., 2013). Une autre enzyme de déubiquitination, la protéine **A20**, régule négativement l'activation de NLRP3 (Duong et al., 2015) (Vande Walle et al., 2014).

Une autre modification post-traductionnelle régulerait l'activation de NLRP3 ; en effet, il a récemment été montré que NLRP3 est **phosphorylé** sous sa forme inactive, et que la déphosphorylation de son domaine PYD par la **phosphatase A2** favorise son oligomérisation (Stutz et al., 2017)

La **PKR** (double-stranded RNA-dependent protein kinase), protéine activée lors d'une infection virale, régulerait l'activation de NLRP1, NLRP3, NLRC4 et AIM2 (Lu et al., 2012). Son

inhibition diminue l'activation de la caspase-1 et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et IL-18, mais le mécanisme est inconnu. Son rôle est remis en question puisque les macrophages invalidés pour la PKR sont capables d'activer normalement l'inflammasome (He et al., 2013).

La protéine **GBP5** (guanylate-binding protein 5) induit l'activation du NLRP3 sous stimulation par l'ATP, la nigéricine et les bactéries, mais pas les matières particulaires (Shenoy et al., 2012). Une autre étude montre une activation normale de NLRP3 dans des cellules invalidées pour GBP5 (Meunier et al., 2014).

La protéine **TXNIP** (thioredoxin-interacting protein) a été décrite comme essentielle à l'activation du NLRP3 sous les cristaux d'acide urique et le stress oxydatif (Zhou et al., 2010). Les ROS permettraient le détachement de TXNIP de la thiorédoxine et favoriseraient sa liaison avec NLRP3.

Les protéines de la famille des **kinases RIP** modulent l'activation de NLRP3 lors de l'infection virale. Sous infection par un virus à ARN, l'activation de NLRP3 requerrait la formation du **complexe RIP1-RIP3**, ce qui conduit à l'activation de la GTPase DRP1 et sa translocation à la mitochondrie ; les dégâts mitochondriaux occasionnés seraient responsables de l'activation de NLRP3 (Wang et al., 2014). La protéine **RIP2** régule négativement l'activation de NLRP3 en modulant la mitophagie et les dégâts mitochondriaux induits en réponse à une infection virale (Lupfer et al., 2013). D'autres études démontrent le rôle des protéines RIP dans le contrôle de l'assemblage de l'inflammasome et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  (Vince et al., 2012) (Weng et al., 2014) (Kang et al., 2013).

Les protéines apoptotiques **FADD** et la **caspase-8** réguleraient les étapes de « priming » et d'activation du NLRP3 canonique et non-canonique (Gurung et al., 2014) (Allam et al., 2014).

Plusieurs études montrent que le **NO (oxyde nitrique)** et la S-nitrosylation de NLRP3 l'inhibent (Kim et al., 1998) (Hernandez-Cuellar et al., 2012) (Mishra et al., 2013)

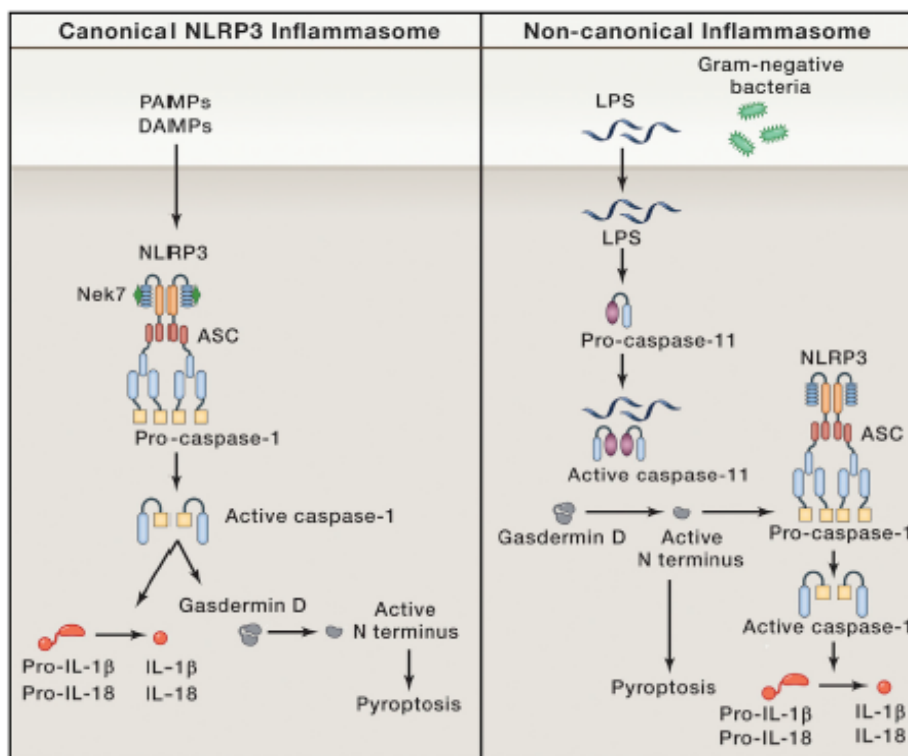
Un autre régulateur de NLRP3 récemment identifié est la protéine **Flightless-1 ou FLII** (Jin et al., 2013) (Burger et al., 2016). En effet, il a été montré que FLII inhibe la caspase-1, probablement en tant que pseudo-substrat (Li et al., 2008). FLII joue également un rôle dans la cicatrisation (Cowin et al., 2012). Elle est constitutivement sécrétée dans le milieu extracellulaire par les macrophages et fibroblastes et peut lier le LPS : elle modulerait donc la réponse inflammatoire au cours de la cicatrisation en diminuant la sécrétion de cytokines (Lei

et al., 2012). Enfin, FLII est un régulateur négatif de la voie TLR4-MyD88 en interagissant avec MyD88 et bloquant la voie de signalisation en aval (Wang et al., 2006). De manière générale, la protéine FLII semble être un régulateur négatif de la réponse inflammatoire.

La stimulation chronique du NLRP3 induit un **rétrocontrôle négatif** qui passe par la sécrétion de facteurs anti-inflammatoires comme l'**IL-10** (Gurung et al., 2015).

### 3. L'inflammasome non-canonique et mort cellulaire

La plupart des bactéries Gram-négatif qui possède un LPS comme *E.coli*, *Citrobacter rodentium* et *Vibrio cholerae* activent la **caspase-11** : on parle d'**inflammasome non-canonique** (He et al., 2016a). Ce type d'inflammasome n'est retrouvé que chez les mammifères. Dans ce cas, la caspase-11 murine et les caspases-4 et 5 humaines, mais pas les autres caspases, sont capables de lier directement et spécifiquement le LPS intracellulaire via leur domaine CARD et de s'oligomériser pour s'activer. Ce mécanisme d'activation est indépendant de la reconnaissance du LPS par le TLR4. Une fois activée, la caspase-11 induit une mort cellulaire de type inflammatoire appelée **pyroptose** (Man and Kanneganti, 2015).



**Figure 14 :** Activation de l'inflammasome NLRP3 canonique et non-canonique (extrait de Rathinam and Fitzgerald, 2016)

La **pyroptose** est une forme inflammatoire de mort cellulaire programmée induite par les caspases inflammatoires. Elle consiste en un gonflement cellulaire avec rupture des membranes (Lamkanfi and Dixit, 2014). Ce mécanisme est décrit comme un système de défense contre les infections permettant de bloquer la réplication des pathogènes intracellulaires en s'autodétruisant, et de les relarguer pour les rendre accessibles aux phagocytes dans le milieu extracellulaire. Lors de la pyroptose, il y a formation de pores membranaires et relargage de **DAMPs, IL-1 et HMGB1** qui vont amplifier la réponse inflammatoire.

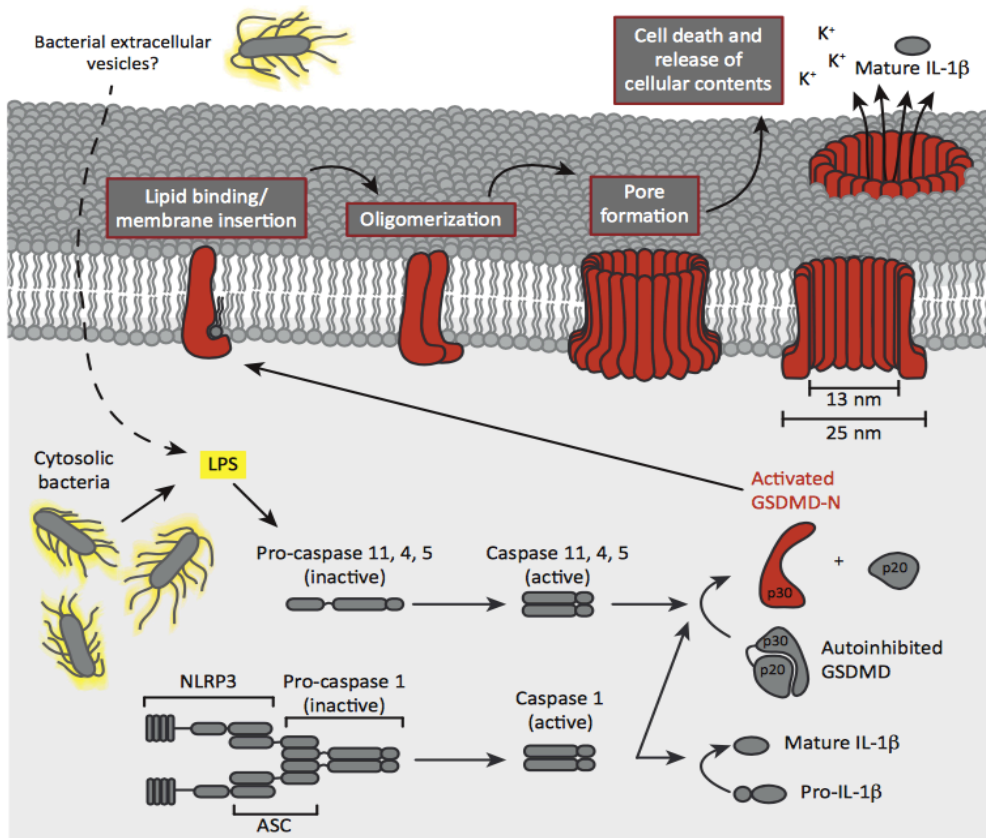
Le mécanisme exact d'induction de la pyroptose par les caspases-1 et 11 n'est pas encore déterminé. Récemment, l'importance de la **Gasdermine D (GSDMD)** dans ce mécanisme a été démontré (Shi et al., 2015; Kayagaki et al., 2015). GSDMD est clivée par les caspase-1 et 11 au niveau de l'aspartate en position 276 en deux fragments :

- Le fragment N-terminal p30 ou GSDMD-N qui résulte de ce clivage forme des pores en s'oligomérisant dans la membrane plasmique, ce qui conduit à la pyroptose (Aglietti and Dueber, 2017). Il peut former des pores *in vitro* dans des bicouches lipidiques artificielles avec une forte affinité pour la cardiolipine, le PI(4)P et le PI<sub>2</sub>(4,5)P, ce qui lui conférerait une activité bactériolytique (Liu et al., 2016) (Ding et al., 2016). Le mécanisme précis est encore en cours d'investigation.
- Le fragment C-terminal p20 ou GSDMD-C a un rôle inhibiteur de GSDMD-N (Shi et al., 2015).

La caspase-11 peut activer l'**inflammasome NLRP3 non-canonique** pour cliver l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18, probablement via l'efflux de K<sup>+</sup> résultant de la formation de pores par la GSDMD (Rühl and Broz, 2015). La caspase-11 est également capable de cliver le canal Pannexin-1, ce qui conduit à la sortie d'ATP des cellules. Ce relargage d'ATP active de façon autocrine ou paracrine le récepteur P2X<sub>7</sub> pour l'ouvrir et induire la pyroptose (Yang et al., 2015).

La pyroptose induite par la caspase-1 lors de l'activation de divers inflammasomes n'est que partiellement dépendante de GSDMD, et le mécanisme exact reste inconnu.



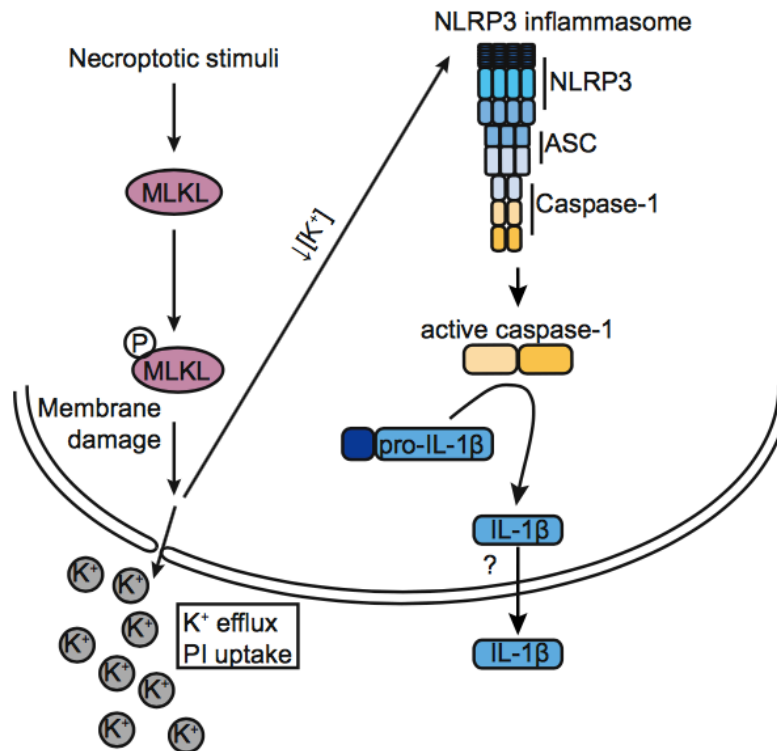


**Figure 15 :** L'activation de l'inflammasome NLRP3 induit la pyroptose via la formation de pores membranaires par GSDMD (extrait de Aglietti and Dueber, 2017)

#### 4. Mécanismes de sécrétion et clivage de l'IL-1 $\beta$

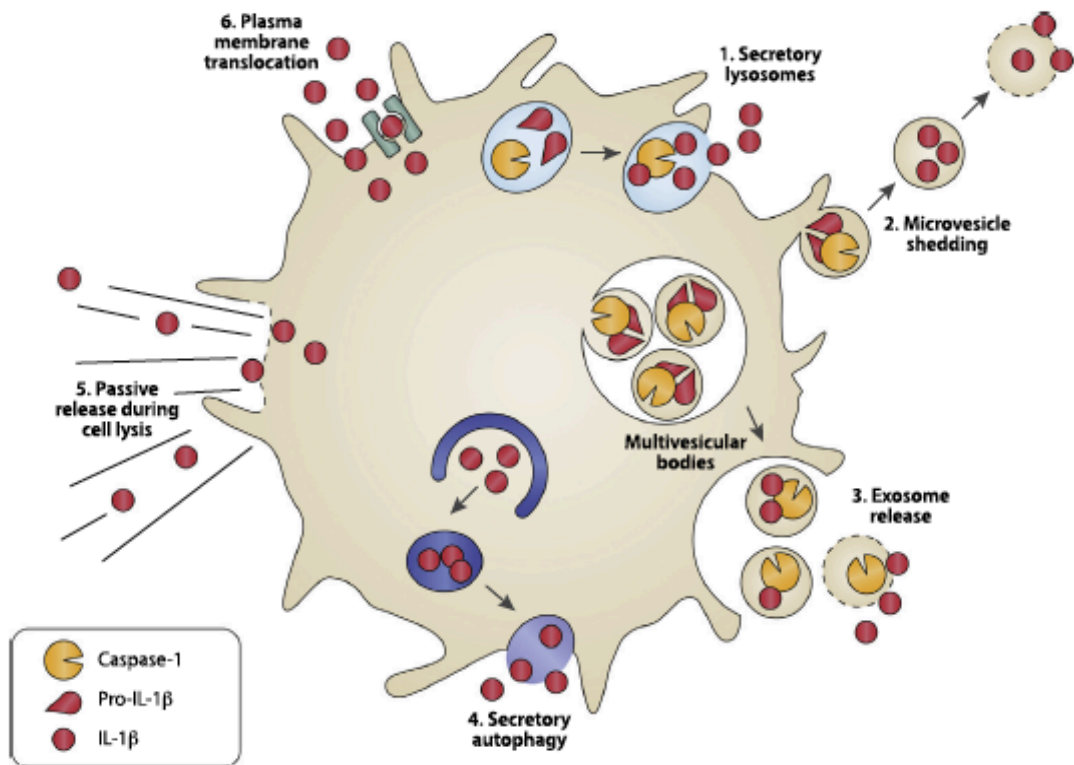
Le mécanisme de **sécrétion de l'IL-1 $\beta$**  est indépendant du circuit classique via le RE-Golgi (Rathinam and Fitzgerald, 2016). Les étapes de sécrétion et clivage sont fortement couplées mais leur distinction n'est pas claire. La sécrétion de l'IL-1 $\beta$  est **dépendante de la caspase-1** (Keller et al., 2008) et sa dimérisation suffit à induire la maturation et la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  (Conos et al., 2016), mais on ne sait pas toujours si c'est un mécanisme actif ou si elle est le résultat des dégâts membranaires induits lors de la mort cellulaire. La découverte récente du rôle de GSDMD suggère une **sécrétion non-vésiculaire** de l'IL-1 $\beta$  par diffusion à travers les pores membranaires formés lors de la pyroptose (Shi et al., 2015; Kayagaki et al., 2015). Un autre mécanisme de sécrétion passive a été décrit lors de l'activation de la pseudokinase **MLKL** qui est suffisante pour induire le clivage et la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  (Conos et al., 2017; Gutierrez et al., 2017). En effet, la phosphorylation de MLKL par RIP3 induit sa translocation à la membrane plasmique où elle perturbe l'intégrité de la membrane

plasmique : la perte de l'homéostasie ionique qui en résulte active l'inflammasome NLRP3 via l'efflux de  $K^+$ , et l'IL-1 $\beta$  mature diffuse à travers la membrane.



**Figure 16 :** Les dégâts membranaires induit par MLKL lors d'un stimulus nécrotique permet la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  (extrait de Conos et al., 2017)

Plusieurs mécanismes de sécrétion non-conventionnelle de l'IL-1 $\beta$  ont été proposés (Monteleone et al., 2015). Certaines études montrent que la sécrétion d'IL-1 $\beta$  n'est pas toujours couplée à la lyse cellulaire et suggèrent un **mécanisme de sécrétion actif** ou **via des vésicules**. Une étude montre une translocation de l'IL-1 $\beta$  et de la caspase-1 dans des lysosomes sécrétoires qui fusionnent avec la membrane plasmique quand l'inflammasome est activé. Une autre implique l'autophagie dans le processus de sécrétion de l'IL-1 $\beta$  (Dupont et al., 2011).



**Figure 17 :** Mécanismes potentiels de sécrétion non-conventionnelle de l'IL-1 $\beta$  (extrait de Monteleone et al., 2015)

De manière intéressante, dans les neutrophiles, l'activation du NLRC4 par *Salmonella* Thyphimurium induit une forte **sécrétion d'IL-1 $\beta$  sans pyroptose**, indiquant que la mort n'est pas toujours activée sous la caspase-1 (Chen et al., 2014). Toujours chez les neutrophiles, des études ont montré que la maturation de la proIL-1 $\beta$  n'est pas toujours dépendante de la caspase-1 (Fantuzzi et al., 1997) : la **protéinase 3** (Joosten et al., 2009), l'**élastase** ou encore la **chymase** (Guma et al., 2009) sont capables de cliver l'IL-1 $\beta$  en forme mature. La caspase-8 semble aussi capable de cliver l'IL-1 $\beta$  (Conos et al., 2016). Malgré de nombreux progrès dans le domaine, le(s) mécanisme(s) exact(s) de clivage et de sécrétion de l'IL-1 $\beta$  reste(nt) encore à déterminer.

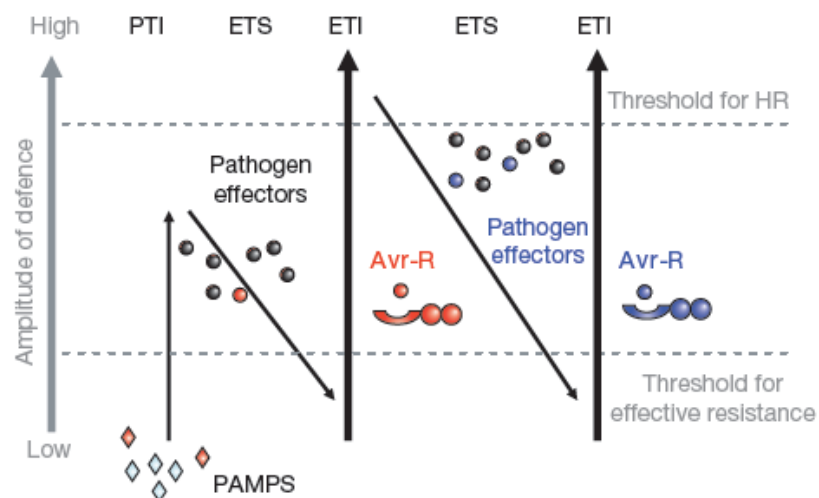
### III. RECONNAISSANCE DE L'ACTIVITE DES FACTEURS DE VIRULENCE PAR LE SYSTEME IMMUNITAIRE INNE

#### A. L'immunité induite par des effecteurs (ETI) chez la plante

Contrairement aux animaux, les **plantes** n'ont pas de cellules immunitaires mobiles spécialisées pour se défendre : toutes les cellules doivent être capables de détecter les pathogènes et d'induire une réponse immunitaire innée (Jones and Dangl, 2006). En plus des PRRs, elles ont développé un système de protéines gardiennes des processus cellulaires souvent ciblés par les facteurs de virulence – plus communément appelés « effecteurs » chez la plante. Il existe donc 2 branches de l'immunité de plante :

- Les PRRs transmembranaires reconnaissent les MAMPs extracellulaires : on parle d'**immunité induite par les MAMPs (MTI)**
- Les NB-LRR, encodés par des gènes R dits « de résistance » et apparentés aux NLRs mammifères, reconnaissent les effecteurs pathogènes : on parle d'**immunité induite par les effecteurs (ETI)**.

La nécessité pour l'hôte de développer le système d'ETI peut s'expliquer par le modèle évolutif dit en zig-zag : les pathogènes reconnus via leurs MAMPs ont déployé des effecteurs pour contrecarrer la MTI, la plante a alors mis en place l'ETI pour se défendre. Les pathogènes répondent à cette évolution en développant à leur tour de nouvelles stratégies d'évitement de l'ETI en perdant les effecteurs reconnus ou en acquérant de nouveaux effecteurs capables de supprimer l'ETI.



**Figure 18 :** Modèle co-évolutif dit en zig-zag (extrait de Jones and Dangl, 2006)

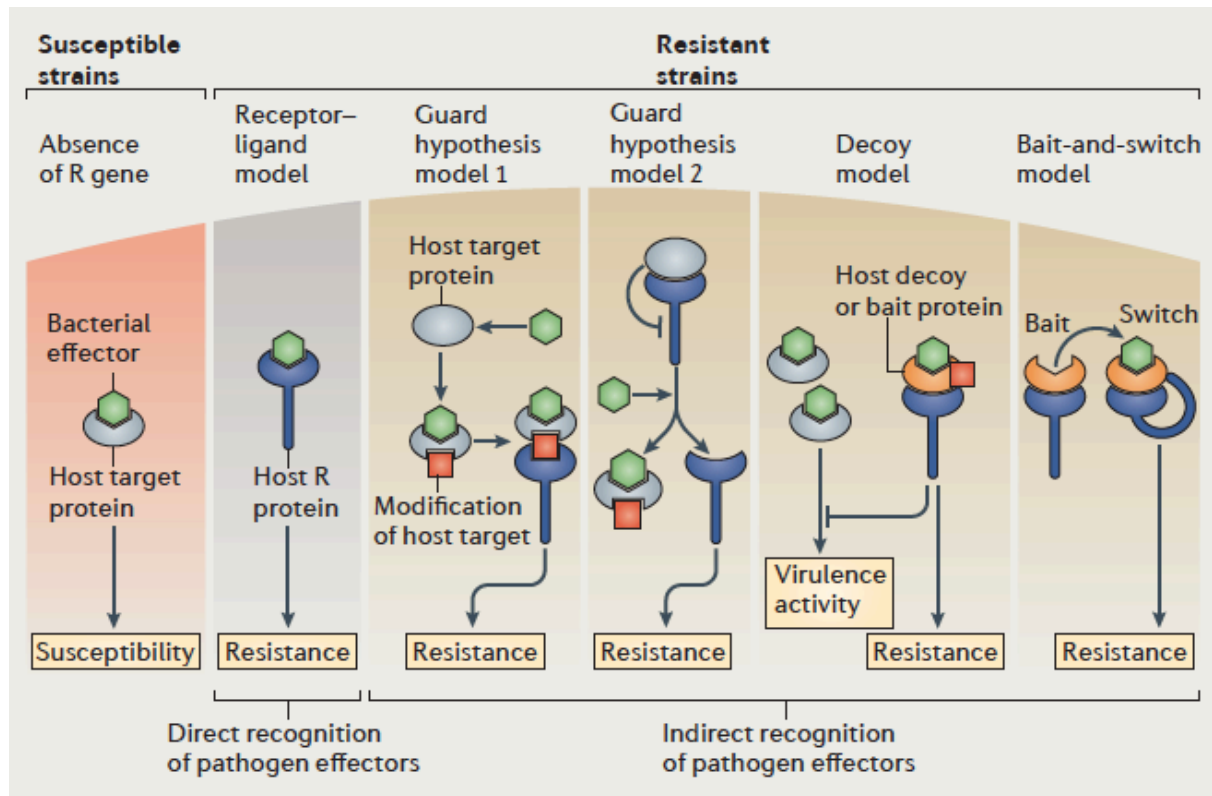
Les bactéries pathogènes utilisent des effecteurs pour favoriser leur dispersion, l'accès aux nutriments, ou encore supprimer la réponse immunitaire de la plante. Paradoxalement, les effecteurs reconnus, initialement produits pour être virulents, induisent une réponse immunitaire : on les qualifie alors **de facteurs d'avirulence (Avr)**.

L'ETI est une version plus rapide et plus forte de la MTI (Keller et al., 2016). L'activation des NB-LRR induit une défense efficace appelée réponse hypersensible résultant en :

- la **mort programmée localisée** des cellules infectées, similaire à la pyroptose chez le mammifère, qui consiste en un suicide cellulaire pour tuer les pathogènes biotrophes et relarguer des protéines antibactériennes
- la production d'**acide salicylique** dont les niveaux régulent la mort cellulaire
- un **burst oxydatif** induit par la production de ROS par la NADPH oxydase RBOH et nécessaire à l'induction de la mort
- une **reprogrammation transcriptionnelle**.

Les NB-LRR peuvent **reconnaître directement les effecteurs**, comme la protéine RRS1-R qui reconnaît l'effecteur PopP2 de *Ralstonia solanacearum*, mais dans la majorité des cas, cette **détection est indirecte** (Wu et al., 2014). Ceci permet d'élargir le répertoire de la détection d'un NB-LRR à plusieurs effecteurs qui auraient évolué indépendamment pour cibler la même protéine hôte. Par exemple, la protéine RIN4, qui régule la MTI en contrôlant l'ouverture des stomates, est la cible de plusieurs effecteurs de *Pseudomonas syringae* et est liée à 2 NB-LRR chez *Arabidopsis* : RPM1 perçoit la phosphorylation de RIN4 par les effecteurs AvrRpm1 et AvrB, et RPS2 détecte son clivage par AvrRpt2 (Jones and Dangl, 2006).

Certaines protéines cibles des effecteurs sont des **leurre**s (protéines non fonctionnelles) (Griebel et al., 2014). La kinase Pto par exemple, ciblée par AvrPto de *P. syringae* pv *tomato*, agirait comme un leurre en compétition avec le PRR FLS2 reconnaissant la flagelline, et empêcherait ainsi l'inhibition de la MTI.



**Figure 19 :** Mécanismes de détection des effecteurs chez la plante (extrait de Stuart et al., 2013)

## B. L'immunité anti-virulence chez l'animal

La théorie des PRRs qui reconnaissent des MAMPs est aujourd'hui démontrée (voir partie II). Mais étant donné que les MAMPs sont partagés par tous les microorganismes indépendamment de leur potentiel pathogène, elle n'explique pas **comment le système immunitaire peut distinguer un microorganisme pathogènes d'un non-pathogène** (Stuart et al., 2013). Plusieurs hypothèses ont été émises :

- Le système immunitaire reconnaît les pathogènes en fonction du danger qu'ils représentent via le relargage des DAMPs qu'ils induisent : c'est la **théorie du danger** de Polly Matzinger (Matzinger, 2002).
- La notion de pathogénicité dépend du site d'infection ; le site **de détection** jouerait un rôle dans l'évaluation du potentiel pathogène d'un microorganisme (Stuart et al., 2013). Par exemple, dans le système digestif riche en microorganismes, les TLRs ne sont retrouvés que dans les endosomes et le pôle basal de l'épithélium digestif mais pas le pôle apical directement en contact avec les microorganismes. Cette compartimentation permettrait ainsi de ne reconnaître que les microorganismes

invasifs plus dangereux que les microorganismes colonisateurs (Blander and Sander, 2012).

- Le système immunitaire serait capable de **surveiller la viabilité** des microorganismes (Blander and Sander, 2012) : une bactérie qui se multiplie est plus dangereuse qu'une bactérie morte. De plus, il existerait des MAMPs spécifiques aux bactéries vivantes (Mourao-Sa et al., 2013).
- De récents travaux de notre laboratoire ont permis la mise en évidence l'existence chez la drosophile et la conservation chez l'homme d'un **mécanisme de détection de l'activité des facteurs de virulence** similaire à l'ETI observé chez les plantes (Boyer et al., 2011; Stuart and Boyer, 2013) (Keller et al., 2016). Dans ce cas, le système immunitaire détecte l'activité des facteurs de virulence plutôt que leurs structures, ce qui permet la reconnaissance d'une variété de facteurs de virulence structurellement différents. Dans ce cas, on peut penser que l'hôte surveille les perturbations des processus essentiels à la cellule. Au cours de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressée à cet aspect.

## 1. L'inhibition de la traduction protéique par des facteurs de virulence induit une réponse immunitaire

L'équipe de Russell Vance a montré que **5 effecteurs de *Legionella pneumophila***, une bactérie intracellulaire responsable de la maladie du légionnaire, étaient capables d'induire une réponse immunitaire indépendamment des voies des TLRs ou NLRs. En effet, les protéines Lgt1, Lgt2, Lgt3, Sid1 et SidL **inhibent la traduction protéique** de la cellule hôte, dont celle d'I- $\kappa$ B, ce qui a pour conséquence une activation prolongée de NF- $\kappa$ B (Fontana et al., 2011). De plus, cette inhibition de la traduction induit également l'activation de la voie des MAPK (Fontana et al., 2012). De manière intéressante, l'équipe du Dr. Vance démontre ici un exemple non conventionnel d'**ETI qui n'impliquerait pas de récepteur**.

De manière similaire, les équipes du Pr. Frederick Ausubel et du Dr. Emily Troemel ont montré que l'inhibition de la traduction protéique par l'**Exotoxine A** de *Pseudomonas aeruginosa* induit une réponse immunitaire chez *C. elegans* (McEwan et al., 2012) (Dunbar et al., 2012). Ces travaux montrent la conservation de ce mécanisme de détection de l'activité des facteurs de virulence chez le nématode et plus largement de l'ETI chez les animaux (Kleino and Silverman, 2012). En effet, le nématode est doté d'un mécanisme de surveillance qui reconnaît l'Exotoxine A via son effet inhibiteur de la traduction protéique permettant l'induction d'une réponse immunitaire innée dépendante du facteur de transcription Irg-1.

## 2. Les toxines formant des pores induisent une réponse immunitaire à des doses non létales

A forte dose, les **toxines formant des pores** tuent en affectant la perméabilité membranaire des cellules cibles, mais plusieurs études ont montré qu'à des doses sublétales, elles pouvaient induire une réponse immunitaire. Chez *C. elegans*, la toxine Cr5B de *Bacillus thuringiensis* induit l'activation de la voie des MAPK (Huffman et al., 2004). De même, chez le mammifère, les toxines pneumolysine de *Streptococcus pneumoniae*, l' $\alpha$ -hémolysine de *Staphylococcus aureus*, la streptolysine O de *Streptococcus pyogenes*, l'anthrolyxine O de *Bacillus anthracis*, la vanginolysine de *Gardnerella vaginalis* et l'aérolysine d'*Aeromonas hydrophyla* activent la voie des MAPK probablement via le **stress osmotique** qu'elles engendrent (Ratner et al., 2006) (Porta et al., 2011).

La pneumolysine induit également la production de cytokines via l'activation de NF- $\kappa$ B (Fickl et al., 2005) et a récemment été montrée pour activer l'**inflammasome NLRP3** dans les neutrophiles via l'efflux de  $K^+$  qu'elle induit (Karmakar et al., 2015).

L'aérolysine active également la caspase-1 via l'efflux de  $K^+$ , ce qui conduit dans ce contexte au recrutement des protéines SREBPs pour favoriser la survie cellulaire en réparant les dégâts membranaires (Gurcel et al., 2006).

## 3. L'inflammasome NLRP1b détecte la toxine létale de *B. anthracis*

La **toxine létale de *Bacillus anthracis*** est une toxine de type AB composée d'un domaine PA formant des pores membranaires qui permet l'entrée dans la cellule du domaine LF porteur de l'activité enzymatique de la toxine. Le domaine LF est capable de cliver directement NLRP1b du côté N-terminal, ce qui permet le recrutement de la caspase-1 directement via son CARD et la production d'IL-1 $\beta$  (Man and Kanneganti, 2015). Il existe un fort polymorphisme de NLRP1b chez la souris, ce qui pourrait expliquer que certains individus soient plus sensibles à l'infection (Boyden and Dietrich, 2006). Comme un NB-LRR de plante, NLRP1b semble jouer le **rôle de leurre** en étant une cible directe de la toxine létale de l'anthrax dans le but d'activer une réponse immunitaire.

## 4. L'inflammasome PYRIN détecte les facteurs de virulence inhibant les Rho GTPases

Récemment, un nouvel inflammasome a été décrit pour détecter l'activité de plusieurs facteurs de virulence. En effet, **PYRIN** est activé en réponse à l'intoxication par **des facteurs de virulence bactériens inhibiteurs des Rho GTPases** (Zhao and Shao, 2016). L'équipe des Prs. Feng Shao et Mohammed Lamkanfi ont ainsi pu montrer que les toxines TcdA et TcdB de



*Clostridium difficile*, IbpA de *Histophilus somni* et C3 de *Clostridium botulinum*, ainsi que les effecteurs VopS de *Vibrio parahaemolyticus* et TecA de *Burkholderia cenocepacia* activent PYRIN (Xu et al., 2014) (Van Gorp et al., 2016) (Aubert et al., 2016). Il apparaît que cette activation de PYRIN est dépendante de sa déphosphorylation et des microtubules (Gao et al., 2016). Le mécanisme précis est encore en cours d'investigation mais il semble que PYRIN soit être un **gardien de la dynamique des microtubules**.

## 5. Les facteurs de virulence activateurs des Rho GTPases induisent une réponse similaire à l'ETI

Notre laboratoire a été précurseur dans l'étude de l'ETI chez les animaux. En effet, l'utilisation de *Drosophila melanogaster* comme modèle a permis de démontrer que la **toxine CNF1 d'*E. coli*** induit une réponse immunitaire de type ETI (Boyer et al., 2011). La cellule détecte CNF1 indirectement via l'activation de la Rho GTPase Rac2. Sous forme active, Rac2 peut interagir avec la protéine IMD et induire la production de peptides antimicrobiens pour éliminer la bactérie. De manière intéressante, cette ETI est **conservée chez le mammifère** : l'activation de Rac2 par CNF1 permet le recrutement des homologues mammifères RIP1 et RIP2 d'IMD, l'activation de NF- $\kappa$ B et la production de cytokines pro-inflammatoires. Plus récemment, nous avons démontré qu'au cours de la bactériémie chez la souris, CNF1 est bénéfique à l'hôte puisqu'il induit l'élimination rapide des bactéries du sang et favorise la survie des souris infectées (Diabate et al., 2015). Au même titre que certains effecteurs chez la plante, CNF1 serait dans ce contexte un **facteur d'avirulence** puisqu'il induit une réponse immunitaire protectrice pour l'hôte au cours de la bactériémie.

D'autres **facteurs de virulence activateurs des Rho GTPases** sont également capables d'induire une réponse immunitaire. Ils seraient détectés par un complexe multiprotéique appelé **nodosome** composé du récepteur NOD1, des protéines RIP1, RIP2, SGT1, NEMO, Hsp90 et des Rho GTPases Rac1 et Cdc42 (Keestra and Bäumlér, 2014). Plusieurs exemples de facteurs de virulence pourraient alors compléter cette liste comme les effecteurs IpgB2 et OspB de *Shigella flexneri*, qui recrutent la GEF-H1 de RhoA, activent NF- $\kappa$ B dépendamment de NOD1 (Fukazawa et al., 2008) ou encore les effecteurs SopE, SopE2 et SopB de *Salmonella Typhimurium*, activateurs des Rho GTPases, activent NF- $\kappa$ B via la voie NOD1/RIP2 (Bruno et al., 2009) (Keestra et al., 2013). SopE est également capable d'activer la caspase-1 via l'activation de Rac1 et Cdc42 mais pas RhoA (Müller et al., 2009).



# Contexte et objectifs de recherche

Le système immunitaire détecte les microorganismes via des récepteurs de l'hôte appelés **PRRs** qui reconnaissent des molécules partagées par tous les microorganismes mais absents de l'hôte, appelées **MAMPs** (Janeway, 1989). Mais étant donné que les MAMPs sont exprimés par tous les microorganismes indépendamment de leur potentiel pathogène, ce mécanisme n'explique pas comment le système immunitaire distingue les microorganismes pathogènes des non-pathogènes.

La **détection de l'activité des facteurs de virulence** encodés par les microorganismes pathogènes est un mécanisme de défense clairement établi chez la plante, appelé ETI (Jones and Dangl, 2006). De récents travaux ont mis en évidence chez l'animal un mécanisme similaire de détection de l'activité des facteurs de virulence bactériens qui conduit à une **réponse immunitaire** de l'hôte dirigée contre les pathogènes (Stuart et al., 2013).

Afin d'étudier ce mécanisme, notre laboratoire utilise la **toxine CNF1 d'*E.coli***. C'est une toxine activatrice des Rho GTPases exprimée par un tiers des UPEC. Elle modifie post-traductionnellement les Rho GTPases et les bloque sous forme active. En utilisant la **drosophile**, notre laboratoire a montré que la toxine CNF1 induisait une réponse immunitaire via l'activation de la protéine Rac2 et de la voie IMD, ce qui conduit à la production de peptides antimicrobiens (Boyer et al., 2011). De manière intéressante, cette réponse est conservée chez le **mammifère** puisque l'activation de Rac2 par CNF1 induit l'activation de NF- $\kappa$ B et la production de cytokines pro-inflammatoires via le recrutement des protéines RIP1 et RIP2, homologues mammifères d'IMD.

L'objet de mes travaux de thèse consiste à **déterminer les bases moléculaires de la réponse immunitaire contre CNF1**. Pour comprendre comment CNF1 induit la production de cytokines pro-inflammatoires, j'ai utilisé 2 approches :

- 1) Au début de ma thèse, notre laboratoire a montré l'importance de la cytokine IL-1 $\beta$  dans l'élimination des bactéries induite par CNF1 au cours de la bactériémie (Diabate et al., 2015). Mon premier objectif a été de **déterminer les mécanismes de production de l'IL-1 $\beta$** . J'ai cherché à établir le mécanisme d'activation de la caspase-1 dans la réponse immunitaire dirigée contre CNF1 en utilisant un modèle macrophages primaires murins.
- 2) Mon deuxième objectif a été de **déterminer le mécanisme de recrutement/activation de la protéine RIP1** par la forme active de Rac2. Le laboratoire d'accueil a identifié la protéine FLII comme interagissant spécifiquement avec la forme active de Rac2 : j'ai également étudié le **rôle de FLII** dans l'activation de NF- $\kappa$ B.

# Résultats

## Article publié

### ***Escherichia coli* $\alpha$ -Hemolysin Counteracts the Anti-Virulence Innate Immune Response Triggered by the Rho GTPase Activating Toxin CNF1 during Bacteremia**

### **L'hémolysine- $\alpha$ neutralise la réponse immunitaire innée anti-virulence induite par la toxine CNF1 activant les Rho GTPases au cours de la bactériémie**

Mamady DIABATE\*, Patrick MUNRO\*, Elsa GARCIA\*, Arnaud JACQUEL, Gregory MICHEL, Sandrine OBBA, Diogo GONCALVES, Carmelo LUCI, Sandrine MARCHETTI, Dieter DEMON, Clara DEGOS, Yassina BECHAH, Jean-Louis MEGE, Mohamed LAMKANFI, Patrick AUBERGER, Jean-Pierre GORVEL, Lynda STUART, Luce LANDRAUD, Emmanuel LEMICHEZ et Laurent BOYER.

\*co-premier auteurs

Publié dans PLOS Pathogens, le 17 mars 2015 (Article en Annexes)

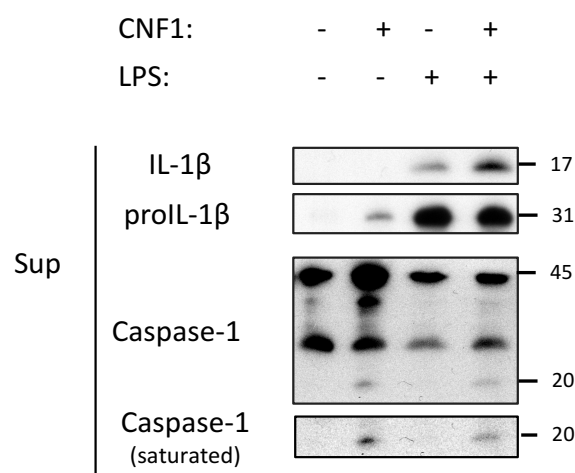
Les UPEC sont la 1<sup>ère</sup> cause d'UTI chez l'Homme (80% des cas), touchant majoritairement les femmes. Dans les cas les plus graves, les UPEC peuvent atteindre le sang et causer des sepsis. Il est donc important de définir leur(s) mécanisme(s) de virulence. Deux toxines bactériennes sont prévalentes chez ces souches bactériennes : **l'hémolysine- $\alpha$**  (HlyA, 50% des UPEC) et **CNF1** (30% des UPEC). Dans les voies urinaires, elles travaillent de pair pour perturber l'urothélium, mais leur rôle au cours de la bactériémie reste à définir. L'HlyA est une toxine formant des pores qui peut, selon sa concentration, avoir une activité cytotoxique ou moduler la réponse immunitaire. Le gène codant pour CNF1 est situé en aval de l'opéron codant pour l'HlyA, ce qui explique que CNF1 soit toujours co-exprimée avec l'HlyA. CNF1 est une toxine activatrice des Rho GTPases. Ces protéines régulatrices du cytosquelette d'actine sont des cibles privilégiées des toxines bactériennes. De récents travaux montrent que l'hôte est capable de détecter l'activation pathogène des Rho et d'induire une réponse immunitaire de manière similaire à l'ETI chez la plante. Nos travaux ont consisté à déterminer **comment les facteurs de virulence bactériens et le système immunitaire inné impactaient la bactériémie**, en particulier les toxines CNF1 et HlyA.

Notre premier objectif était de déterminer le rôle de CNF1 au cours de la bactériémie. Nous avons effectué des mesures de bactériémie après infection de souris par des souches *E. coli* exprimant CNF1 (*E. coli*<sup>CNF1+</sup>) ou une souche syngénique invalidée pour CNF1 (*E. coli*<sup>CNF1-</sup>), toutes deux invalidées pour la toxine HlyA afin de s'affranchir de ses effets. De manière intéressante, nous avons remarqué une rapide élimination des *E. coli*<sup>CNF1+</sup> car plus aucune bactérie n'est détectable dans le sang des souris infectées à 48h post-infection, contrairement aux *E. coli*<sup>CNF1-</sup> qui persistent à 10<sup>3</sup> bactéries par souris. En mesurant diverses cytokines et chimiokines dans le sang de ces souris, nous avons noté une augmentation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et IL-6, ainsi que des chimiokines KC, MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$ , RANTES et MCP1 (permettant le recrutement des cellules immunitaires) dans le sérum des souris infectées avec la souche *E. coli* exprimant CNF1 en comparaison avec la souche ne l'exprimant pas. De plus, lors d'une infection létale, la totalité des souris infectées avec les *E. coli*<sup>CNF1+</sup> survivent, contre 57% des souris infectées avec les *E. coli*<sup>CNF1-</sup>. L'ensemble de nos résultats montrent que **CNF1 induit une réponse immunitaire de type inflammatoire protectrice** pour la souris en favorisant la clairance des bactéries au cours de la bactériémie.

Afin de caractériser la réponse immunitaire induite par CNF1 au niveau moléculaire, nous avons mis en place un modèle *in vitro* de culture de macrophages primaires différenciés à partir de moelle osseuse (BMDM). Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la cytokine IL-1 $\beta$  car notre laboratoire avait déjà démontré *in vitro* que CNF1 induisait la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires en aval de l'activation de NF- $\kappa$ B dans des cellules humaines (Boyer et al., 2011). De plus, l'IL-1 $\beta$  est produite sous une pro-forme qui nécessite une étape de maturation pour être active. De manière surprenante, nous n'avons pas pu mesurer d'augmentation significative de la sécrétion et du clivage de l'IL-1 $\beta$  sous stimulation par CNF1. En revanche, CNF1 potentialise la maturation de l'IL-1 $\beta$  induite par le LPS *in vitro*. En mesurant la bactériémie de souris infectées par des *E. coli*<sup>CNF1+</sup> et co-traitées avec l'inhibiteur de l'IL-1R KINERET, nous avons démontré **le rôle critique de l'IL-1 $\beta$  dans l'élimination des bactéries induite par CNF1**.

Au vu de l'importance des caspases inflammatoires dans la signalisation de l'IL-1 $\beta$ , nous avons voulu valider leur implication dans la réponse immunitaire à CNF1 *in vivo* et *in vitro*. Les souris invalidées pour les caspases-1 et 11 éliminent moins rapidement les *E. coli*<sup>CNF1+</sup> au cours de la bactériémie. De plus, les BMDM issus de ces souris ne clivent plus l'IL-1 $\beta$  sous stimulation CNF1+LPS. De même, les inhibiteurs des caspases QVD et YVAD bloquent le clivage de l'IL-1 $\beta$  induit par CNF1+LPS. Afin de discriminer le rôle de la caspase-1 et de la caspase-11, et de déterminer si ASC, protéine adaptatrice des caspases lors de l'assemblage d'un inflammasome, était impliquée, nous avons traité des BMDM issus de différentes souris invalidées pour les protéines citées précédemment avec du CNF1+LPS. Nous avons pu identifier clairement **l'implication de la caspase-1 et de l'adaptateur ASC** dans la sécrétion et maturation de l'IL-1 $\beta$  induite par CNF1+LPS.

Sachant que CNF1 active les Rho GTPases et que notre laboratoire a précédemment défini le rôle de Rac2 dans l'activation de NF- $\kappa$ B par CNF1 (Boyer et al., 2011), nous avons testé si Rac2 pouvait avoir un rôle dans la maturation de l'IL-1 $\beta$  sous CNF1+LPS. De manière intéressante, le mutant constitutivement actif de Rac2 mimant la modification induite par CNF1 (HA-Rac2<sup>Q61E</sup>) potentialise le clivage de l'IL-1 $\beta$  induit par le LPS. Rac2 est également capable de co-immunoprécipiter avec la caspase-1 sous traitement CNF1+LPS. Plus récemment, nous avons montré que CNF1 seul était capable d'activer la caspase-1 dans des BMDM en culture (Figure 20, résultat non publié). Ces résultats indiquent que **CNF1 active la caspase-1 via l'activation de Rac2**.



**Figure 20 :** CNF1 induit le clivage de la caspase-1.

Analyse par Western blot de la sécrétion et la maturation de l'IL-1 $\beta$  et de la caspase-1 dans des BMDM traités pendant 8h avec du CNF1 (500ng/mL) et/ou du LPS (100ng/mL).

Dans leur ensemble, nos résultats démontrent que le clivage de l'IL-1 $\beta$  induit par CNF1 nécessitent les protéines Rac2, ASC et caspase-1, et que CNF1 suffit à activer la caspase-1 dans des macrophages primaires en culture.

Les résultats que nous avons obtenus précédemment nous ont permis de mettre en évidence que la toxine CNF1 induisait une réponse immunitaire bénéfique à l'hôte et de caractériser cette réponse au niveau moléculaire. Nous nous sommes demandé comment la bactérie pouvait faire face à cette réponse immunitaire. Etant donné que l'HlyA interfère avec le système immunitaire pendant les UTI, nous avons voulu déterminer son rôle au cours de la bactériémie. De manière intéressante, les *E. coli* exprimant l'HlyA avec ou sans CNF1 persistent dans le sang des souris infectées 48h post-infection. De plus, l'expression de l'HlyA inhibe l'augmentation d'IL-1 $\beta$  et de KC induite par CNF1 dans le sang des souris infectées. De manière intéressante, l'HlyA n'altère pas le recrutement des cellules Gr1+ nécessaires à l'élimination des bactéries induite par CNF1, ni ne modifie l'activation de Rac2 par CNF1. Nos résultats montrent que **l'HlyA contrecarre l'immunité induite par CNF1**, probablement au niveau moléculaire en bloquant la maturation de l'IL-1 $\beta$  en aval de l'activation de Rac2.



# Résultats complémentaires

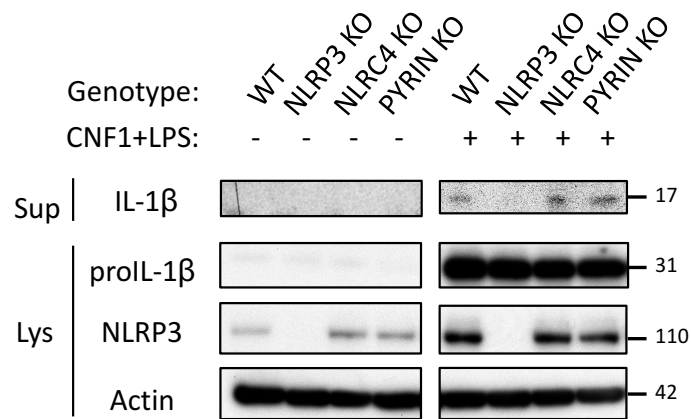
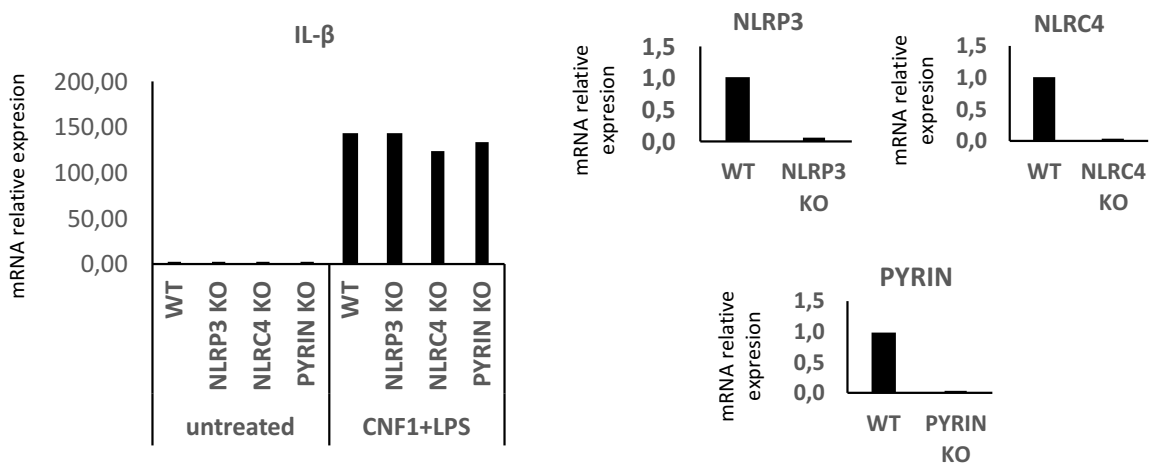
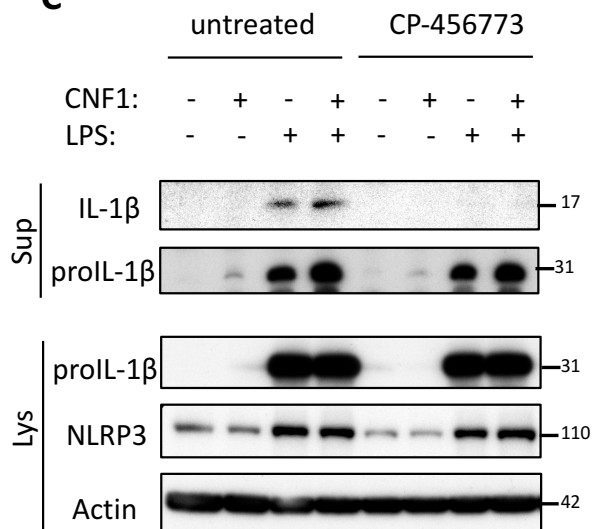
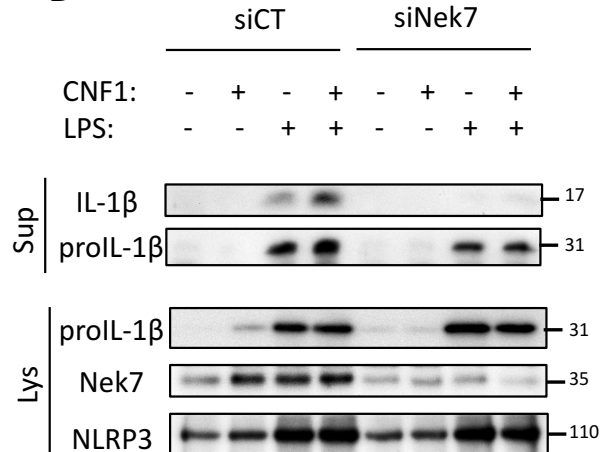
## I. LA TOXINE CNF1 D'*E. COLI* ACTIVE L'INFLAMMASOME NLRP3

### 1. L'immunité induite par CNF1 requiert l'inflammasome NLRP3

L'importance des protéines ASC et caspase-1 que nous avons démontrée précédemment laissait penser qu'un inflammasome serait impliqué dans la réponse à CNF1. Dans le but de confirmer cette hypothèse, nous avons isolé et mis en culture des BMDM issus de souris invalidées pour les protéines NLRP3 (NLRP3 KO), NLRC4 (NLRC4 KO) ou PYRIN (PYRIN KO) puis nous les avons traités pendant 8h avec du CNF1+LPS (**Figures 21A et 21B**). Alors que la transcription de l'ARNm IL-1 $\beta$  (**Figure 21B**) et la production de la proIL-1 $\beta$  sont identiques dans toutes les cellules utilisées, les BMDM NLRP3 KO sont incapables de cliver l'IL-1 $\beta$  sous traitement CNF1+LPS (**Figure 21A**). De plus, l'utilisation de l'inhibiteur du NLRP3 CP-456773 bloque la maturation de l'IL-1 $\beta$  sous CNF1+/-LPS sans affecter ni la production ni la sécrétion de la proIL-1 $\beta$  (**Figure 21C**). Nos résultats identifient **NLRP3 comme nécessaire au clivage de l'IL-1 $\beta$  induit par CNF1**.

Récemment, les équipes des Drs. Beutler et Nuñez ont identifié la protéine Nek7 comme impliquée dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (He et al., 2016b) (Shi et al., 2016). Afin de vérifier si c'était le cas dans notre modèle, nous avons invalidé l'expression de Nek7 par siRNA dans des BMDM que l'on a par la suite traités pendant 8h avec du CNF1 et/ou du LPS (**Figure 21D**). Son invalidation bloque le clivage de l'IL-1 $\beta$  induit par CNF1+/-LPS, prouvant **l'implication de Nek7 dans la réponse immunitaire induite par CNF1 (Figure 21D)**.

L'ensemble de nos résultats indiquent que **CNF1 active l'inflammasome NLRP3** pour cliver l'IL-1 $\beta$ .

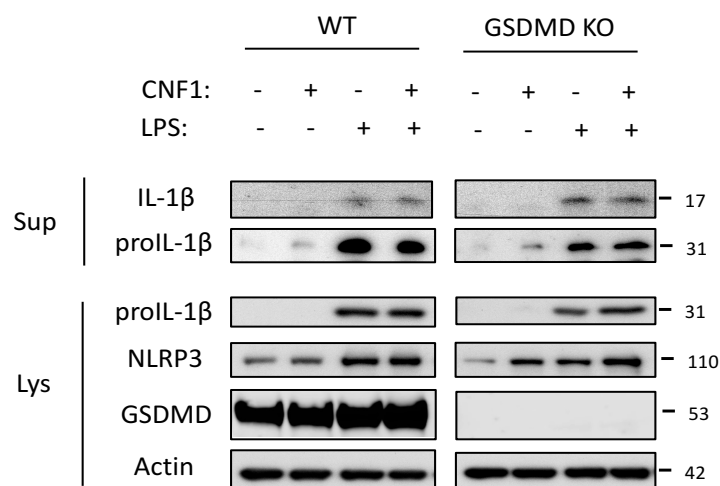
**A****B****C****D****Figure 21 : L'immunité induite par CNF1 requiert l'inflammasome NLRP3.**

A. Analyse par Western blot de la production et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  dans des BMDM WT ou invalidées pour NLRP3 (NLRP3 KO), NLRC4 (NLRC4 KO) ou PYRIN (PYRIN KO) traités pendant 8h avec du LPS (100ng/mL) et du CNF1 (500ng/mL).

- B. Quantification par qPCR des ARNm de l'IL-1 $\beta$ , NLRP3, NLRC4 et PYRIN dans les BMDM WT et les KO utilisés dans le panel A (n=2).
- C. Analyse par Western blot de la production et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  dans des BMDM traités pendant 8h avec du LPS (100ng/mL) et du CNF1 (500ng/mL) en combinaison ou pas avec l'inhibiteur de NLRP3 CP-456773.
- D. Analyse par Western blot de la production et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  dans des BMDM transfectés avec les siRNA contrôle (siCT) ou siNek7 pendant 48h puis traités pendant 8h avec du LPS (100ng/mL) et du CNF1 (500ng/mL).

## 2. La sécrétion/maturation de l'IL-1 $\beta$ induite par CNF1 est indépendante de GSDMD

Le rôle récemment décrit de la Gasdermine D (GSDMD) par les équipes des Drs. Dixit et Shao dans l'activation du NLRP3 non-canonique et la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  (Shi et al., 2015; Kayagaki et al., 2015) nous a amené à tester si elle était impliquée dans la réponse à CNF1. Nous avons isolé et mis en culture des BMDM issus de souris WT ou invalidées pour GSDMD (GSDMD KO) et les avons traités avec du CNF1 et/ou du LPS pendant 8h (Figure 22). Nous avons observé que l'absence de GSDMD ne bloque pas la sécrétion ni le clivage de l'IL-1 $\beta$  induit par CNF1+LPS. **La sécrétion et la maturation de l'IL-1 $\beta$  induite par CNF1 ne requiert donc pas GSDMD.**



**Figure 22 :** La sécrétion/maturation de l'IL-1 $\beta$  induite par CNF1 est indépendante de GSDMD.

Analyse par Western blot de la production et la sécrétion l'IL-1 $\beta$  dans des BMDM WT ou invalidées pour GSDMD (GSDMD KO) traités pendant 8h avec du LPS (100ng/mL) et du CNF1 (500ng/mL).

## II. FLII EST IMPLIQUEE DANS L'ACTIVATION DE NF-κB INDUITE PAR CNF1 EN MODULANT L'UBIQUITINATION DE RIP1

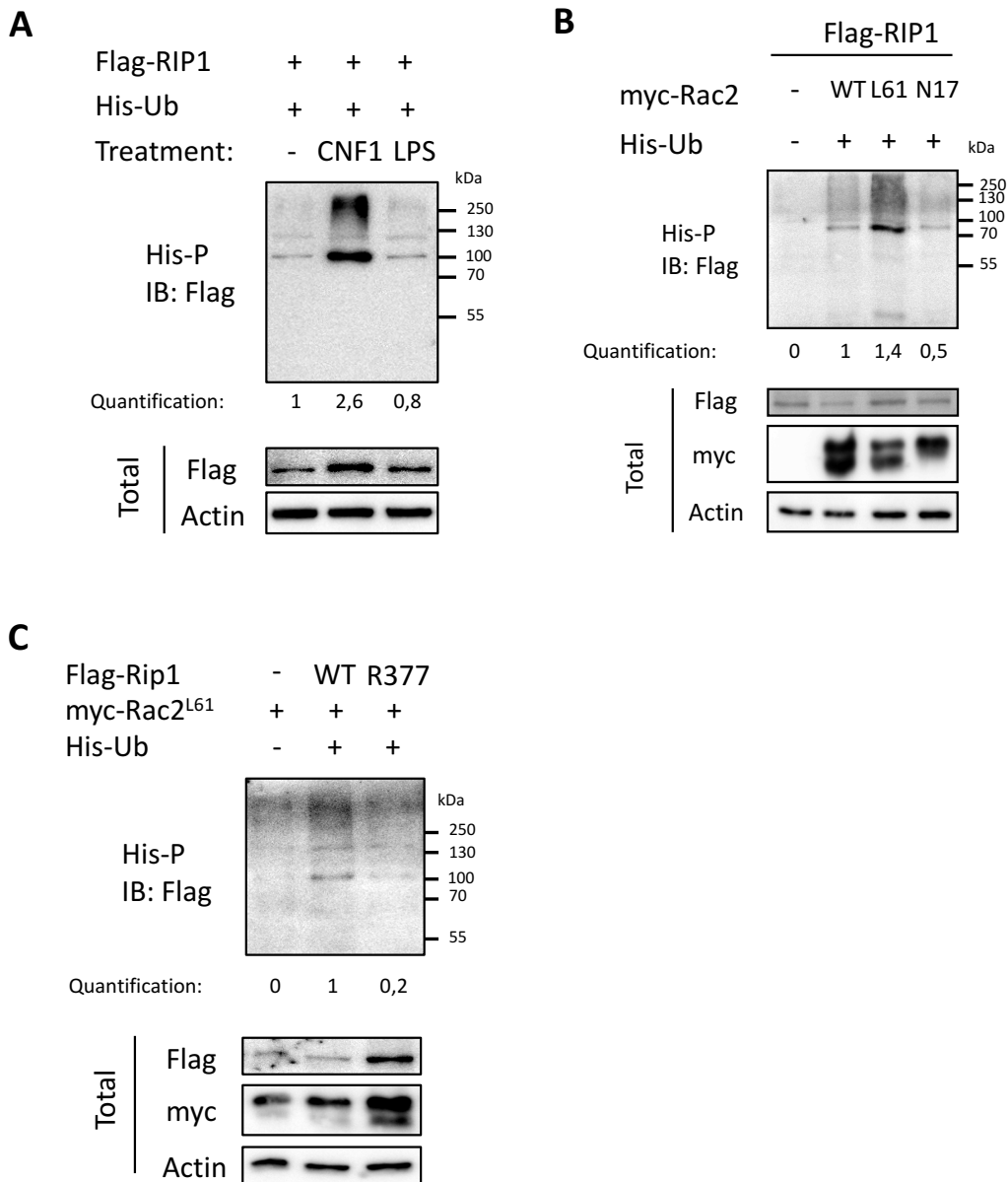
### 1. L'activation de Rac2 par CNF1 induit l'ubiquitination de RIP1 sur la Lys377

Le laboratoire d'accueil a précédemment démontré que l'activation de Rac2 par CNF1 permet le recrutement de la protéine RIP1 afin d'activer la voie de signalisation NF-κB dans des cellules humaines en culture (Boyer et al., 2011). La seconde partie de mon projet de thèse consistait à chercher le mécanisme de recrutement et d'activation de RIP1 par Rac2. RIP1 a été décrit dans la littérature pour être impliquée dans l'activation de NF-κB dans d'autres voies de signalisation telles que dans la transduction du signal du TNFR au cours de laquelle RIP1 est ubiquitinée sur la lysine en position 377 (O'Donnell et al., 2007).

Afin de déterminer si CNF1 pouvait induire l'ubiquitination de RIP1, nous avons transfecté des cellules 293T avec la protéine RIP1 et l'ubiquitine (Ub) puis les avons traitées pendant 4h avec du CNF1 ou du LPS (**Figure 23A**). Notre laboratoire possède une technique élaborée d'analyse des protéines ubiquitinées ; elle consiste à exprimer une forme d'Ub portant l'étiquette Histidine (His-Ub) et à précipiter les protéines ayant lié covalamment l'Ub en utilisant des billes recouvertes de Cobalt pour lequel l'étiquette His possède une forte affinité. L'utilisation de cette technique nous a permis de purifier spécifiquement les protéines ubiquitinées et d'analyser le profil d'ubiquitination de RIP1 dans les différentes conditions testées. Nous avons remarqué que le traitement des cellules par **CNF1 augmente l'ubiquitination de RIP1**, et de façon plus importante que le traitement par le LPS.

Pour vérifier que cette modification était dépendante de l'activité de Rac2, nous avons réalisé le même test dans des cellules transfectées avec la forme sauvage de Rac2 (myc-Rac2<sup>WT</sup>) ou un mutant constitutivement actif (myc-Rac2<sup>L61</sup>) ou constitutivement inactif (myc-Rac2<sup>N17</sup>) (**Figure 23B**). Nous avons pu noter que, comparé à la forme sauvage de Rac2, **l'expression du mutant actif de Rac2 augmente l'ubiquitination de RIP1** et l'expression du mutant inactif la diminue. Enfin, basée sur notre hypothèse de départ, nous avons voulu vérifier si l'ubiquitination de RIP1 induite par Rac2 active était la même que celle impliquée dans la voie du TNFR. Nous avons pour cela généré un mutant de RIP1 décrit dans la littérature pour ne pas être ubiquitiné dans la voie du TNFR (Flag-RIP1<sup>R377</sup>) (Li et al., 2006) et réalisé un test d'ubiquitination en co-transfection avec le mutant myc-Rac2<sup>L61</sup>. Nous avons observé que l'expression du mutant constitutivement actif de Rac2 induit une faible **ubiquitination de RIP1 lorsque sa lysine en position 377 est mutée** (**Figure 23C**).

Nos résultats suggèrent que l'activation de Rac2 par la toxine **CNF1 induit l'ubiquitination de RIP1** majoritairement sur la lysine en position 377.



**Figure 23 : L'activation de Rac2 par CNF1 induit l'ubiquitination de RIP1 sur la Lys377.**

A) Test d'ubiquitination de la protéine Flag-RIP1 avec quantification dans des cellules 293T transfectées avec le plasmide His-Ub puis traitées pendant 4h avec du CNF1 (500ng/mL) ou du LPS (100ng/mL). Cette technique utilisée consiste à précipiter des protéines ubiquitinées via la liaison du tag His à des billes de cobalt (= His-P). Les quantifications ont été réalisées avec le logiciel ImageJ et représentent la mesure du signal d'ubiquitination rapportée au total d'expression.

B) Test d'ubiquitination de la protéine Flag-RIP1 avec quantification dans des cellules 293T transfectées avec les plasmides His-Ub et myc-Rac2<sup>WT</sup>, le mutant constitutivement actif

(myc-Rac2<sup>L61</sup>) ou inactif (myc-Rac2<sup>N17</sup>). Les quantifications ont été réalisées avec le logiciel ImageJ et représentent la mesure du signal d'ubiquitination rapportée au total d'expression.

- C) Test d'ubiquitination de la protéine Flag-RIP1<sup>WT</sup> ou le mutant Flag-RIP1<sup>R377</sup> avec quantification dans des cellules 293T transfectées avec le plasmide His-Ub et myc-Rac2<sup>L61</sup> (constitutivement actif). Les quantifications ont été réalisées avec le logiciel ImageJ et représentent la mesure du signal d'ubiquitination rapportée au total d'expression.

## 2. FLII module l'ubiquitination de RIP1 induite par Rac2 active

Notre laboratoire a analysé par spectrométrie de masse les interactants de Rac2, ce qui nous a permis d'identifier la protéine Flightless-1 (FLII) comme interagissant spécifiquement avec la forme active de Rac2. Nous avons alors posé l'hypothèse de l'implication de FLII dans la signalisation inflammatoire induite par CNF1.

Nous avons d'abord vérifié que FLII et Rac2 interagissaient lors de l'intoxication par CNF1 en réalisant des expériences de co-immunoprécipitation de la protéine Rac2 dans des cellules 293T transfectées puis traitées pendant 6h avec du CNF1+LPS (**Figure 24B**). Nous avons ensuite observé leur colocalisation en réalisant des expériences d'immunofluorescence de la protéine FLII endogène avec la protéine Rac2 transfectée dans des BMDM puis traités pendant 4h avec du CNF1 (**Figure 24A**). Nos résultats **semblent indiquer que CNF1 induit l'interaction et la colocalisation de Rac2 active et FLII** dans les cellules mammifères.

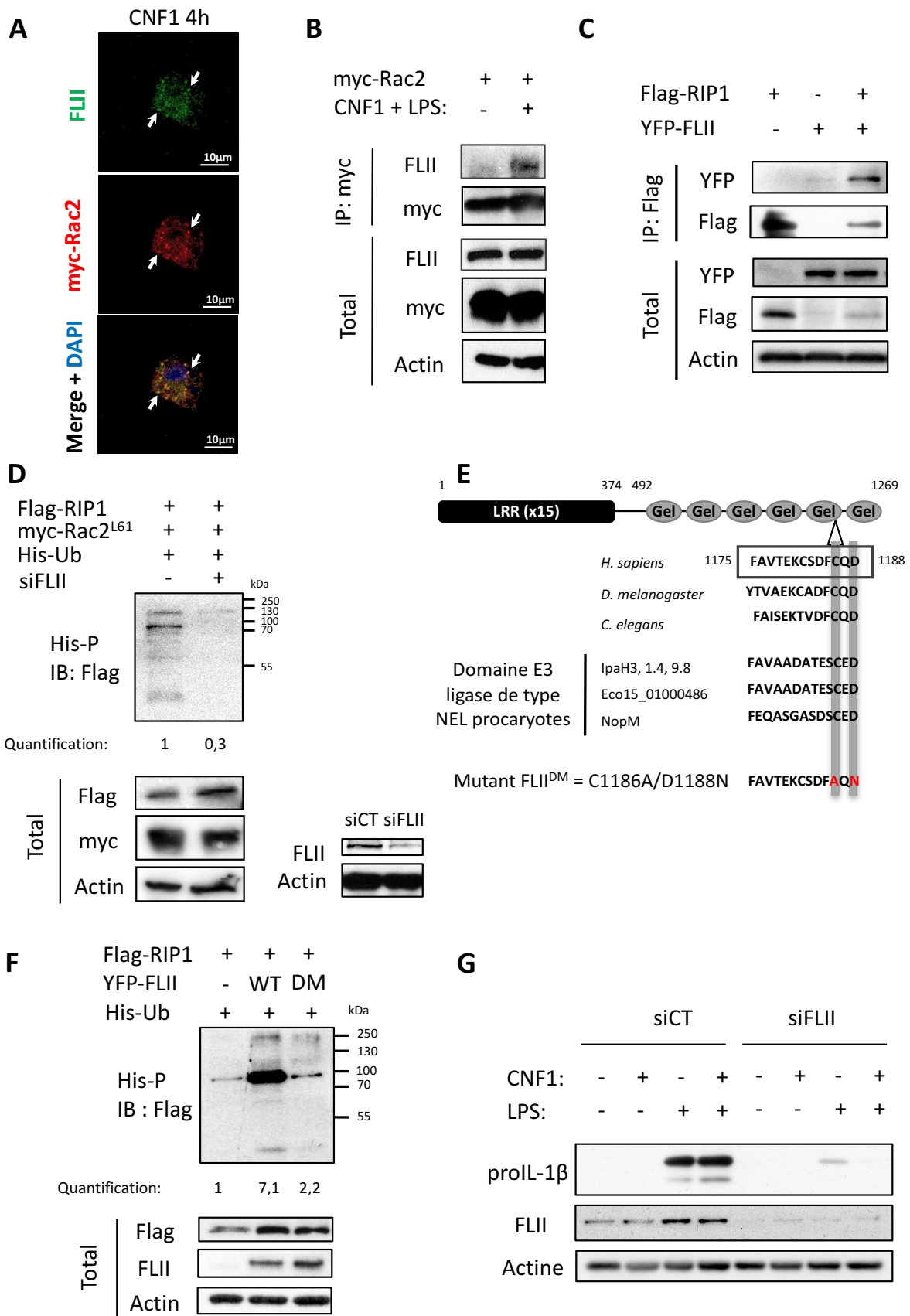
Nous nous sommes ensuite demandé si FLII pouvait avoir un rôle dans l'ubiquitination de RIP1 induite par Rac2 active. Afin de tester cette hypothèse, nous avons d'abord vérifié si FLII et RIP1 interagissaient en réalisant des expériences de co-immunoprécipitation (**Figure 24C**). Nos résultats confirment que **FLII et RIP1 co-immunoprécipitent**. Par la suite, nous avons invalidé l'expression de FLII par siRNA dans des cellules 293T puis les avons transfectées avec RIP1, le mutant constitutivement actif de Rac2 (myc-Rac2<sup>L61</sup>) et l'His-Ub et avons réalisé un test d'ubiquitination (**Figure 24D**). De manière intéressante, **l'invalidation de FLII bloque l'ubiquitination de RIP1 induite par Rac2 active**. Nos résultats montrent que FLII module l'ubiquitination de RIP1 induite par l'activation de Rac2. Nous nous sommes donc demandé si FLII pourrait être une nouvelle ubiquitine ligase E3 de RIP1. L'analyse de sa séquence primaire nous a permis d'identifier des séquences homologues aux protéines ligase E3 de type NEL (New E3 Ligases) procaryotes dans le domaine LRR de FLII et un domaine catalytique putatif dans le 5<sup>e</sup> domaine gelsoline de FLII (**Figure 24E**). Nous retrouvons dans ce domaine une haute conservation des 2 acides aminés catalytiques entre les différents homologues de FLII provenant de l'Homme, de la drosophile ou du nématode et les NEL IpaH3, 1.4, 9.8, Eco15\_01000486 et NopM (ici grisés sur la figure). Dans le but de vérifier si FLII pouvait être

une NEL, nous avons généré un double mutant de ces 2 acides : le mutant FLII C1186A/D1188N (nommé FLII<sup>DM</sup>).

Afin de tester notre hypothèse, nous avons réalisé un test d'ubiquitination de RIP1 dans des cellules 293T transfectées avec la forme sauvage de FLII (YFP-FLII<sup>WT</sup>) ou le mutant précédemment généré (YFP-FLII<sup>DM</sup>) et l'His-Ub (**Figure 24F**). Nous avons observé une forte augmentation de l'ubiquitination de RIP1 lors de la surexpression de FLII<sup>WT</sup> qui est atténuée avec le mutant FLII<sup>DM</sup>. Ces résultats confirment le fait que **FLII module positivement l'ubiquitination de RIP1** et montrent que son activité régulatrice de l'ubiquitination de RIP1 dépend des acides aminés C1186 et/ou D1188.

Enfin, comme FLII interagit avec Rac2 sous traitement par CNF1 responsable de l'activation de NF- $\kappa$ B et de la caspase-1, nous nous sommes demandé si FLII avait un rôle dans la production, la sécrétion et/ou la maturation de l'IL-1 $\beta$ . Pour tenter de répondre à cette question, nous avons invalidé l'expression de FLII dans des BMDM à l'aide de siRNA puis traité les cellules avec du CNF1 et/ou du LPS (**Figure 24G**). Nous avons observé que l'absence de FLII réduit la production de la proIL-1 $\beta$  induite par le LPS et CNF1+LPS. De manière intéressante, on note également une augmentation de la quantité de FLII dans les BMDM traités avec du LPS. Nos résultats indiquent que **FLII est impliquée dans la production de proIL-1 $\beta$**  induite par le LPS et que son niveau protéique pourrait être régulé positivement par le LPS.

L'ensemble de nos résultats démontrent que la protéine **FLII module l'ubiquitination de RIP1 induite par la forme active de Rac2**. De plus, les acides aminés C1186 et D1188 de FLII semblent impliqués dans la modulation de l'ubiquitination de RIP1. Le rôle exact de FLII dans l'ubiquitination de RIP1 reste à préciser.

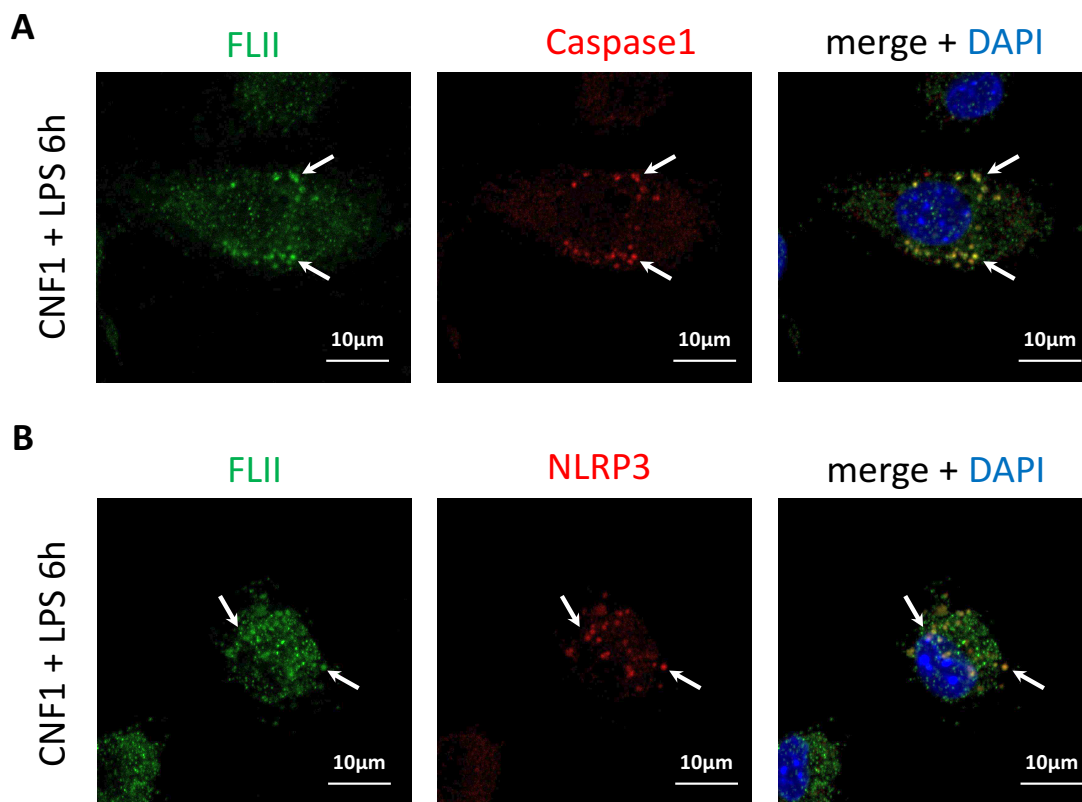


**Figure 24 :** FLII module l'ubiquitination de RIP1 induite par Rac2 active.



- A) Immunofluorescence des protéines FLII endogène et myc-Rac2 transfectée dans des BMDM primaires traités 4h avec du CNF1 (500ng/mL). La barre blanche indique l'échelle (10µm) et les flèches blanches pointent les zones de colocalisation.
- B) Co-immunoprécipitation des protéines myc-Rac2 transfectée et FLII endogène dans des cellules 293T traitées ou pas pendant 4h avec du CNF1 (500ng/mL) et du LPS (100ng/mL).
- C) Co-immunoprécipitation des protéines Flag-RIP1 et YFP-FLII dans des cellules 293T transfectées.
- D) Test d'ubiquitination de la protéine Flag-RIP1 dans des cellules 293T transfectées 48h avec un siRNA contrôle (siCT) ou dirigé contre FLII (siFLII) puis avec les plasmides Flag-RIP1, myc-Rac2<sup>L61</sup> (mutant constitutivement actif) et His-Ub. Les quantifications ont été réalisées avec le logiciel ImageJ et représentent la mesure du signal d'ubiquitination rapportée au total d'expression.
- E) Alignement du domaine E3 ligase de type NEL procaryote avec la protéine FLII et génération d'un double mutant C1186A D1188N (FLII<sup>DM</sup>) humain.
- F) Test d'ubiquitination de la protéine Flag-RIP1 dans des cellules 293T transfectées avec les plasmides His-Ub et YFP-FLII<sup>WT</sup> ou YFP-FLII<sup>DM</sup>. Les quantifications ont été réalisées avec le logiciel ImageJ et représentent la mesure du signal d'ubiquitination rapportée au total d'expression.
- G) Analyse par Western blot de l'expression de la pro-IL-1β dans des BMDM primaires transfectées avec un siRNA contrôle (siCT) ou dirigé contre FLII (siFLII) pendant 48h puis traitées avec du CNF1 (500ng/mL) et/ou du LPS (100ng/mL) pendant 10h.

De manière intéressante, FLII a également été décrite dans la littérature pour être un régulateur de NLRP3 (Burger et al., 2016). Nous nous sommes demandé si FLII pourrait jouer un rôle à la fois dans l'activation de NF- $\kappa$ B mais également dans celle de NLRP3 sous stimulation par CNF1. En réalisant des expériences d'immunofluorescence, nous avons montré que **FLII colocalisait avec la caspase-1 et avec NLRP3 dans des macrophages stimulés par CNF1+LPS (Figure 25)**. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour conclure sur l'éventuel rôle de FLII dans l'activation de NLRP3 sous stimulation par CNF1.



**Figure 25 :** FLII colocalise avec l'inflammasome NLRP3 dans des macrophages traités avec du CNF1+LPS.

Immunofluorescence des protéines FLII et caspase1 (A) ou NLRP3 (B) endogènes dans des BMDM primaires traités 6h avec du CNF1 (500ng/mL) et du LPS (100ng/mL).

# Discussion

## Discussion

La détection de l'activité des facteurs de virulence a émergé comme nouveau paradigme dans la reconnaissance des pathogènes (Boyer et al., 2011; Stuart and Boyer, 2013). De manière intéressante, ce mécanisme fait écho à l'ETI chez la plante. Mais il existe de rares preuves de sa contribution *in vivo* chez le mammifère. Nos résultats nous ont permis de mettre en évidence la capacité de l'hôte à contrôler la bactériémie via le recrutement des cellules Gr1<sup>+</sup> et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, en particulier l'IL-1 $\beta$ , induits par la toxine CNF1 d'*E. coli*. L'identification de **ce mécanisme de l'immunité innée en réponse à l'activité des facteurs de virulence chez les mammifères** nous permet, en extrapolant, de contribuer à expliquer comment le système immunitaire distingue les bactéries pathogènes des non pathogènes. En effet, il est aujourd'hui admis que les bactéries sont reconnues via leurs MAMPs et induisent une réponse immunitaire appelée MTI (MAMPs-Triggered Immunity) (Medzhitov, 2009). Mais la MTI ne suffit pas à expliquer comment l'hôte perçoit le niveau de danger des bactéries et y répond. Ici, nous avons montré que CNF1 synergise avec le LPS pour induire une réponse immunitaire protectrice pour l'hôte. Bien que le mécanisme précis reste à élucider, notre étude donne des preuves *in vivo* et *in vitro* d'une **coopération entre l'ETI et la MTI** chez le mammifère, qui permettrait à l'hôte de jauger le potentiel pathogène des bactéries.

Il est intéressant de noter que **l'ETI est conservée au cours de l'évolution**. Initialement décrite chez la plante, notre laboratoire a apporté des preuves de son existence chez la drosophile ainsi que chez le mammifère. Le modèle dit en zig-zag des Drs. Jones et Dangl décrit chez la plante (Jones and Dangl, 2006) permet d'expliquer la conservation de l'ETI et peut s'appliquer également aux organismes plus évolués (Stuart et al., 2013). Les microorganismes ayant besoin d'un hôte doivent pour survivre évoluer soit vers un statut non-pathogène symbiotique, soit devenir plus virulents. Ce dernier modèle explique la nécessité de l'hôte à développer ses défenses immunitaires. L'ETI implique des mécanismes moléculaires différents selon les organismes. En effet, la plante ne possède pas de cellules immunitaires spécialisées : toutes les cellules doivent donc être capables de détecter les perturbations de leur homéostasie via des protéines gardiennes des processus cellulaires appelées NB-LRR. Chez la drosophile, bien qu'il n'existe pas de protéines assimilées aux NB-LRR encore décrites, nous avons caractérisé l'ETI déclenchée par CNF1 par l'activation non canonique de la voie IMD (impliquée dans la MTI) via la Rho GTPase Rac2. De manière intéressante, chez le mammifère, l'ETI déclenchée par CNF1 implique à la fois la protéine NLRP3 homologue aux NB-LRR de plante, mais aussi l'activation non canonique de RIP1, homologue d'IMD, via Rac2. **Les mécanismes moléculaires de l'ETI semblent avoir converger et s'être complexifier avec l'évolution**. Ce modèle s'applique particulièrement bien chez le mammifère lors d'une

bactériémie à *E. coli* où la présence de la bactérie dans le sang est rapidement mortelle, d'où la nécessité d'une réponse immunitaire rapide et adaptée.

Les Rho GTPases sont des cibles privilégiées des facteurs de virulence (Boquet and Lemichez, 2003). Plusieurs études confirment l'existence de mécanismes de surveillance des Rho GTPases par le système immunitaire inné. De manière intéressante, l'activation et l'inactivation des Rho GTPases ne sont pas perçues par les mêmes senseurs. Alors que l'inflammasome PYRIN détecte l'inactivation des Rho GTPases par plusieurs facteurs de virulence pour induire la maturation de l'IL-1 $\beta$  (Zhao and Shao, 2016), l'activation des Rho GTPases a initialement été décrite pour activer NF- $\kappa$ B via la formation du nodosome (Boyer et al., 2011) (Keestra and Bäumlér, 2014). Dans notre modèle, nous avons montré que **CNF1 est également capable d'activer l'inflammasome NLRP3** pour induire la maturation de l'IL-1 $\beta$  via l'activation de Rac2. Etant donné que Rac2 fait partie du complexe de la NADPH oxydase et que CNF1 a déjà été décrit pour induire la génération d'ion superoxyde (Falzano et al., 2001), notre hypothèse est que CNF1 active NLRP3 via la formation de ROS. Mais le mécanisme précis est encore en cours d'investigation. L'hôte semble capable de surveiller le cycle des Rho GTPases d'une manière générale via les inflammasomes PYRIN et NLRP3 détectant respectivement l'inactivation ou l'activation des Rho GTPases par les facteurs de virulence, ce qui lui permet de percevoir une large variété de toxines et effecteurs modulant les Rho GTPases.

L'induction d'une ETI par CNF1 nous pousse à nous demander **pourquoi les *E. coli* conservent cette toxine**. Plusieurs études suggèrent que CNF1 faciliterait l'invasion des UPEC dans le tractus urinaire et serait nécessaire aux étapes précoces de l'infection (Johnson et al., 2000) (Rippere-Lampe et al., 2001) (Bower et al., 2005). De plus, la virulence est, entre autre, fonction de l'hôte et de la localisation des bactéries (Vance et al., 2009) ; CNF1 pourrait être délétère chez certains individus mutés pour Rac2 ou NLRP3 par exemple, et expliquerait le tropisme des UPEC dans les voies urinaires où elles ne sont pas en contact avec le système immunitaire. Ici, nous avons clairement démontré que CNF1 est un facteur d'avirulence chez la souris au cours de la bactériémie. Mais il reste à élucider comment les pathogènes réagissent à cette capacité de l'hôte à les reconnaître. De manière intéressante, nous avons ici décrit **l'effet de l'HlyA qui contrecarre l'ETI induite par CNF1** au cours de la bactériémie. On peut imaginer que lien génétique entre CNF1 et HlyA serait le fruit de l'évolution de la bactérie pour se protéger de la réponse immunitaire induite par CNF1. L'HlyA cible probablement directement les voies de signalisation cellulaires de l'hôte puisqu'elle n'affecte pas le recrutement des cellules Gr1<sup>+</sup> *in vivo*, et inhiberait la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  en aval de l'activation de Rac2 par CNF1. L'hôte a mis en place au cours de l'évolution un système de défense sophistiqué de détection de l'activité des facteurs de virulence. Mais les bactéries ont également évolué d'autres facteurs de virulence pour contrecarrer cette ETI. Ce modèle de

coévolution parallèle, dit en zig-zag, est déjà décrit chez la plante, mais nous apportons ici des arguments qui supportent son existence chez les mammifères.

Notre étude a mis en évidence l'importance de l'IL-1 $\beta$  dans l'ETI induite par CNF1 et nous a permis d'identifier NLRP3 comme l'inflammasome responsable du clivage de l'IL-1 $\beta$ . Si les étapes de sécrétion et de clivage de l'IL-1 $\beta$  sont fortement couplées, leur distinction n'est pas claire. Nos résultats montrent que l'inactivation de NLRP3 ou de GSDMD ne bloquent pas la sécrétion de la proIL-1 $\beta$  dans nos conditions. Ni l'activation de l'inflammasome ni la mort cellulaire ne semblent nécessaires à la sécrétion de la proIL-1 $\beta$  dans notre modèle, ce qui suggère un **mécanisme de sécrétion de la proIL-1 $\beta$  systématiquement lié à sa production**. Cependant, plusieurs études montrent que la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  est dépendante de la caspase-1 (Keller et al., 2008) (Conos et al., 2016). Etant donné que CNF1 seul est capable d'activer la caspase-1 et que Rac2 interagit avec la caspase-1 sous stimulation CNF1+LPS, nous pouvons spéculer l'existence d'un **nouveau mécanisme de sécrétion non conventionnel lié à l'activation des Rho GTPases**. Vu l'importance de cette cytokine, il ne serait pas étonnant que plusieurs mécanismes de sécrétion soient impliqués afin d'optimiser la réponse inflammatoire. Mais alors, où la proIL-1 $\beta$  est-elle clivée ? De manière intéressante, nous n'avons pas pu détecter d'IL-1 $\beta$  mature à l'intérieur des cellules dans nos conditions, ce qui suggère un **clivage extracellulaire** dépendant à la fois de l'activation de NLRP3 et de la caspase-1.

En étudiant la voie de signalisation induite par CNF1 au niveau moléculaire, nous avons précédemment mis en évidence l'importance de la protéine RIP1 dans l'activation de NF- $\kappa$ B (Boyer et al., 2011). Ici, nous avons montré que **CNF1 induisait l'ubiquitination de RIP1** sur la lysine en position 377 dépendamment de l'activité de Rac2. Ces résultats nous ont permis d'extrapoler que l'activation de NF- $\kappa$ B par CNF1 est due à l'ubiquitination de RIP1 et induit probablement en aval les mêmes voies de signalisation que dans la transduction du signal du TNFR (Ofengeim and Yuan, 2013). Nos travaux nous ont également permis d'identifier un nouveau partenaire de l'ETI induite par CNF1 : la protéine FLII. En effet, FLII interagit avec Rac2 et RIP1, et semble nécessaire à l'activation de NF- $\kappa$ B car sa déplétion par siRNA suffit à bloquer la production de la proIL-1 $\beta$  dans nos conditions. De manière intéressante, nous avons caractérisé FLII comme protéine modulatrice de l'ubiquitination de RIP1. L'analyse de sa structure montre une région conservée qui ressemble fortement au domaine catalytique des NEL (New E3 Ligases) procaryotes. Nos résultats nous laissent penser que **FLII pourrait être l'enzyme responsable de l'ubiquitination de RIP1 et appartenir à une nouvelle classe d'E3 ligases eucaryotes de type NEL**. Cette hypothèse reste cependant à confirmer en réalisant des tests d'ubiquitination *in vitro*.

Autre fait intéressant, FLII a également été décrite pour être un régulateur de NLRP3 (Burger et al., 2016). Elle pourrait jouer un rôle à la fois dans l'activation de NF- $\kappa$ B mais

également dans celle de NLRP3. En effet, nous avons montré que **FLII colocalisait avec la caspase-1 et avec NLRP3 sous stimulation par CNF1+LPS**. Son potentiel rôle dans la régulation de l'inflammasome sous stimulation par CNF1 reste cependant difficile à évaluer étant donné son implication dans l'activation de NF- $\kappa$ B et la production de la proIL-1 $\beta$ .

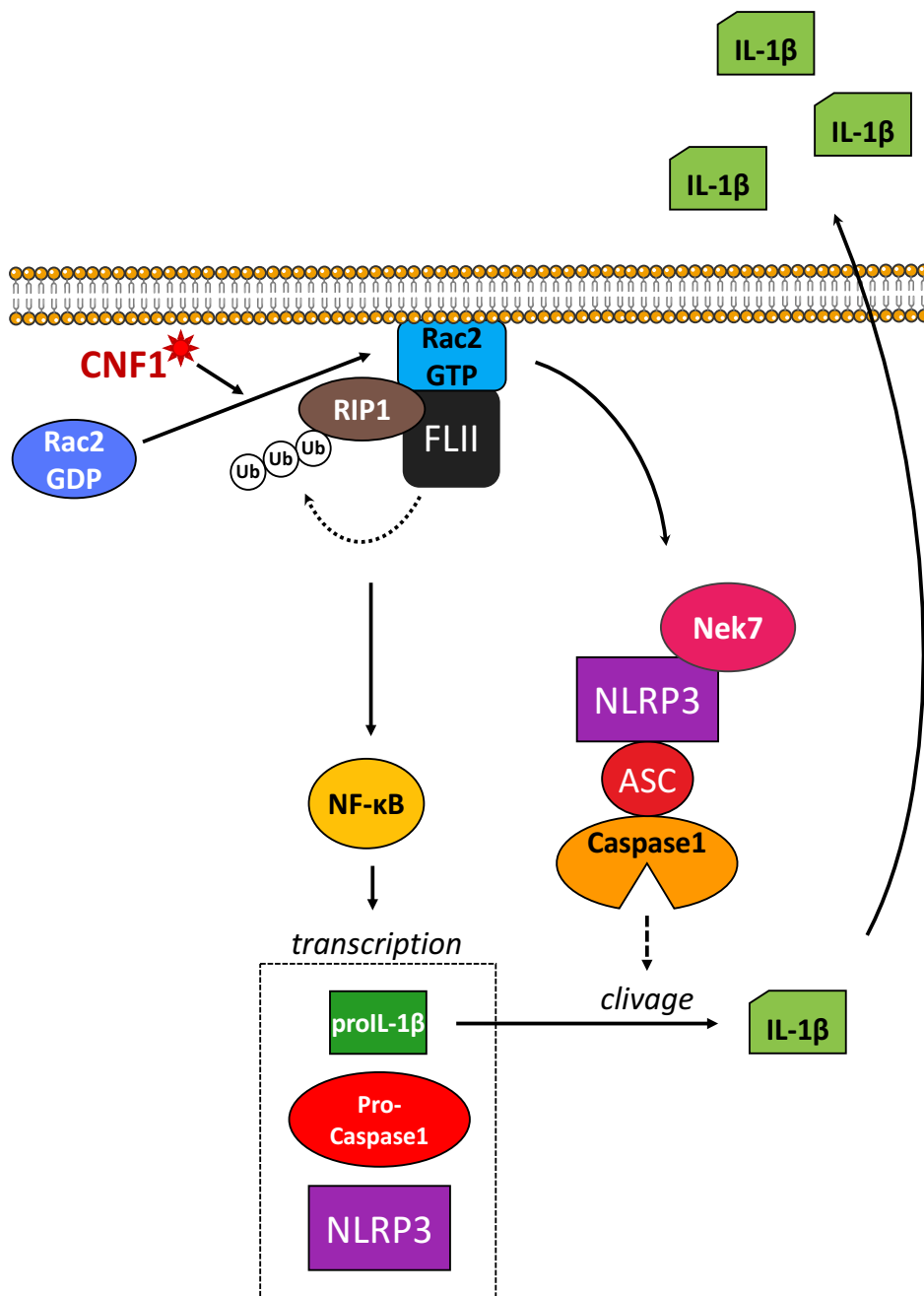
## Conclusion et perspectives

Mes travaux de thèse m'ont permis de participer à démontrer l'importance de la réponse inflammatoire induite par la toxine CNF1 d'*E. coli* dans l'élimination des bactéries et la protection de l'hôte au cours de la bactériémie chez la souris. De manière intéressante, cette ETI mammifère est contrecarrée par une autre toxine, l'HlyA, dont l'expression est étroitement liée à celle de CNF1. Nous avons apporté ici des preuves à la fois d'un mécanisme de défense de l'hôte capable de détecter l'activité d'un facteur de virulence, et d'un mécanisme pathogène neutralisant le premier via l'expression d'un autre facteur de virulence. Ces mécanismes pourraient expliquer comment l'hôte perçoit le niveau de danger des pathogènes, mais également les différences de susceptibilité entre les individus et de virulence d'une souche bactérienne à une autre.

Mon travail m'a également permis de déterminer plus précisément les mécanismes moléculaires de cette ETI (**Figure 26**). La toxine CNF1 d'*E. coli* induit l'activation constitutive de la Rho GTPase Rac2, ce qui a pour conséquence l'induction de la production de cytokines pro-inflammatoires via l'activation de NF- $\kappa$ B et de l'inflammasome NLRP3. L'activation de NF- $\kappa$ B est due au recrutement et à l'ubiquitination de RIP1 par Rac2 active. De manière intéressante, l'ubiquitination de RIP1 est modulée par FLII, protéine décrite ici comme partenaire de l'ETI induite par CNF1, mais par un mécanisme encore inconnu. CNF1 est également capable d'activer l'inflammasome NLRP3 impliquant les protéines Nek7, ASC et la caspase-1, et ce via l'activation de Rac2 pour cliver la proIL-1 $\beta$  en IL-1 $\beta$  mature et induire sa sécrétion.

La littérature nous donne plusieurs preuves d'une immunité déclenchée par différents facteurs de virulence produits par différentes bactéries. L'ETI mammifère semble être plus complexe et présente dans la réponse immunitaire innée au cours de l'infection que nous le pensions, avec un rôle à la fois dans la reconnaissance et dans l'élimination des pathogènes. Comprendre les bases moléculaires de l'ETI induite par CNF1 nous permettrait à long terme de développer différentes stratégies thérapeutiques antibactériennes en stimulant cette ETI pour favoriser l'élimination des bactéries, ou encore d'identifier comment l'HlyA bloque cette réponse immunitaire afin de contrer son effet neutralisant.





**Figure 26 :** Modèle hypothétique de la voie de signalisation de l'IL-1 $\beta$  induites par CNF1.



# **Bibliographie**

# Bibliographie

- Aglietti, R. A., and Dueber, E. C. (2017). Recent Insights into the Molecular Mechanisms Underlying Pyroptosis and Gasdermin Family Functions. *Trends Immunol* *38*, 261-271.
- Aksoy, E., Taboubi, S., Torres, D., Delbauve, S., Hachani, A., Whitehead, M. A., Pearce, W. P., Berenjano, I. M., Berenjano-Martin, I., Nock, G., Filloux, A., Beyaert, R., Flamand, V., and Vanhaesebroeck, B. (2012). The p110 $\delta$  isoform of the kinase PI(3)K controls the subcellular compartmentalization of TLR4 signaling and protects from endotoxic shock. *Nat Immunol* *13*, 1045-1054.
- Aktories, K., Schmidt, G., and Just, I. (2000). Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol Chem* *381*, 421-426.
- Allam, R., Lawlor, K. E., Yu, E. C., Mildenhall, A. L., Moujalled, D. M., Lewis, R. S., Ke, F., Mason, K. D., White, M. J., Stacey, K. J., Strasser, A., O'Reilly, L. A., Alexander, W., Kile, B. T., Vaux, D. L., and Vince, J. E. (2014). Mitochondrial apoptosis is dispensable for NLRP3 inflammasome activation but non-apoptotic caspase-8 is required for inflammasome priming. *EMBO Rep* *15*, 982-990.
- Alouf, J. E. (2000). Bacterial protein toxins. An overview. *Methods Mol Biol* *145*, 1-26.
- Aubert, D. F., Xu, H., Yang, J., Shi, X., Gao, W., Li, L., Bisaro, F., Chen, S., Valvano, M. A., and Shao, F. (2016). A Burkholderia Type VI Effector Deamidates Rho GTPases to Activate the Pypin Inflammasome and Trigger Inflammation. *Cell Host Microbe* *19*, 664-674.
- Balsalobre, C., Silván, J. M., Berglund, S., Mizunoe, Y., Uhlin, B. E., and Wai, S. N. (2006). Release of the type I secreted alpha-haemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* *59*, 99-112.
- Bauernfeind, F., Bartok, E., Rieger, A., Franchi, L., Núñez, G., and Hornung, V. (2011). Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *J Immunol* *187*, 613-617.
- Bentham, A., Burdett, H., Anderson, P. A., Williams, S. J., and Kobe, B. (2017). Animal NLRs provide structural insights into plant NLR function. *Ann Bot* *119*, 827-702.
- Bishop, A. L., and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* *348 Pt 2*, 241-255.
- Blander, J. M., and Sander, L. E. (2012). Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nat Rev Immunol* *12*, 215-225.

Blum, G., Falbo, V., Caprioli, A., and Hacker, J. (1995). Gene clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, Prs-fimbriae and alpha-hemolysin form the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* strain J96. *FEMS Microbiol Lett* *126*, 189-195.

Bokoch, G. M. (2005). Regulation of innate immunity by Rho GTPases. *Trends Cell Biol* *15*, 163-171.

Boquet, P., and Lemichez, E. (2003). Bacterial virulence factors targeting Rho GTPases: parasitism or symbiosis. *Trends Cell Biol* *13*, 238-246.

Bower, J. M., Eto, D. S., and Mulvey, M. A. (2005). Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic* *6*, 18-31.

Boyden, E. D., and Dietrich, W. F. (2006). Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet* *38*, 240-244.

Boyer, L., Magoc, L., Dejardin, S., Cappillino, M., Paquette, N., Hinault, C., Charriere, G. M., Ip, W. K., Fracchia, S., Hennessy, E., Erturk-Hasdemir, D., Reichhart, J. M., Silverman, N., Lacy-Hulbert, A., and Stuart, L. M. (2011). Pathogen-derived effectors trigger protective immunity via activation of the Rac2 enzyme and the IMD or Rip kinase signaling pathway. *Immunity* *35*, 536-549.

Broz, P., and Monack, D. M. (2013). Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol* *13*, 551-565.

Bruno, V. M., Hannemann, S., Lara-Tejero, M., Flavell, R. A., Kleinstein, S. H., and Galán, J. E. (2009). *Salmonella* Typhimurium type III secretion effectors stimulate innate immune responses in cultured epithelial cells. *PLoS Pathog* *5*, e1000538.

Burger, D., Fickentscher, C., de Moerloose, P., and Brandt, K. J. (2016). F-actin dampens NLRP3 inflammasome activity via Flightless-I and LRRFIP2. *Sci Rep* *6*, 29834.

Caprioli, A., Falbo, V., Roda, L. G., Ruggeri, F. M., and Zona, C. (1983). Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infect Immun* *39*, 1300-1306.

Chae, J. J., Cho, Y. H., Lee, G. S., Cheng, J., Liu, P. P., Feigenbaum, L., Katz, S. I., and Kastner, D. L. (2011). Gain-of-function Pyrin mutations induce NLRP3 protein-independent interleukin-1 $\beta$  activation and severe autoinflammation in mice. *Immunity* *34*, 755-768.

Chen, K. W., Groß, C. J., Sotomayor, F. V., Stacey, K. J., Tschopp, J., Sweet, M. J., and Schroder, K. (2014). The neutrophil NLRC4 inflammasome selectively promotes IL-1 $\beta$  maturation without pyroptosis during acute *Salmonella* challenge. *Cell Rep* *8*, 570-582.

Chu, J., Thomas, L. M., Watkins, S. C., Franchi, L., Núñez, G., and Salter, R. D. (2009). Cholesterol-dependent cytolysins induce rapid release of mature IL-1 $\beta$  from murine macrophages in a NLRP3 inflammasome and cathepsin B-dependent manner. *J Leukoc Biol* *86*, 1227-1238.

Chung, J. W., Hong, S. J., Kim, K. J., Goti, D., Stins, M. F., Shin, S., Dawson, V. L., Dawson, T. M., and Kim, K. S. (2003). 37-kDa laminin receptor precursor modulates cytotoxic necrotizing factor 1-mediated RhoA activation and bacterial uptake. *J Biol Chem* *278*, 16857-16862.

Conos, S. A., Chen, K. W., De Nardo, D., Hara, H., Whitehead, L., Núñez, G., Masters, S. L., Murphy, J. M., Schroder, K., Vaux, D. L., Lawlor, K. E., Lindqvist, L. M., and Vince, J. E. (2017). Active MLKL triggers the NLRP3 inflammasome in a cell-intrinsic manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* *114*, E961-E969.

Conos, S. A., Lawlor, K. E., Vaux, D. L., Vince, J. E., and Lindqvist, L. M. (2016). Cell death is not essential for caspase-1-mediated interleukin-1 $\beta$  activation and secretion. *Cell Death Differ* *23*, 1827-1838.

Cowin, A. J., Lei, N., Franken, L., Ruzehaji, N., Offenhäuser, C., Kopecki, Z., and Murray, R. Z. (2012). Lysosomal secretion of Flightless I upon injury has the potential to alter inflammation. *Commun Integr Biol* *5*, 546-549.

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.

Davy, D. A., Campbell, H. D., Fountain, S., de Jong, D., and Crouch, M. F. (2001). The flightless I protein colocalizes with actin- and microtubule-based structures in motile Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for the involvement of PI 3-kinase and Ras-related small GTPases. *J Cell Sci* *114*, 549-562.

de Almeida, L., Khare, S., Misharin, A. V., Patel, R., Ratsimandresy, R. A., Wallin, M. C., Perlman, H., Greaves, D. R., Hoffman, H. M., Dorfleutner, A., and Stehlik, C. (2015). The PYRIN Domain-only Protein POP1 Inhibits Inflammasome Assembly and Ameliorates Inflammatory Disease. *Immunity* *43*, 264-276.

Dhakal, B. K., and Mulvey, M. A. (2012). The UPEC pore-forming toxin  $\alpha$ -hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways. *Cell Host Microbe* *11*, 58-69.

Diabate, M., Munro, P., Garcia, E., Jacquel, A., Michel, G., Obba, S., Goncalves, D., Luci, C., Marchetti, S., Demon, D., Degos, C., Bechah, Y., Mege, J. L., Lamkanfi, M., Auberger, P., Gorvel, J. P., Stuart, L. M., Landraud, L., Lemichez, E., and Boyer, L. (2015). *Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin counteracts the anti-virulence innate immune response triggered by the Rho GTPase activating toxin CNF1 during bacteremia. *PLoS Pathog* *11*, e1004732.

Dick, M. S., Sborgi, L., Rühl, S., Hiller, S., and Broz, P. (2016). ASC filament formation serves as a signal amplification mechanism for inflammasomes. *Nat Commun* *7*, 11929.

Ding, J., Wang, K., Liu, W., She, Y., Sun, Q., Shi, J., Sun, H., Wang, D. C., and Shao, F. (2016). Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature* *535*, 111-116.

Dostert, C., Guarda, G., Romero, J. F., Menu, P., Gross, O., Tardivel, A., Suva, M. L., Stehle, J. C., Kopf, M., Stamenkovic, I., Corradin, G., and Tschopp, J. (2009). Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PLoS One* *4*, e6510.

Doye, A., Mettouchi, A., Bossis, G., Clément, R., Buisson-Touati, C., Flatau, G., Gagnoux, L., Piechaczyk, M., Boquet, P., and Lemichez, E. (2002a). CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell* *111*, 553-564.

Doye, A., Mettouchi, A., Bossis, G., Clément, R., Buisson-Touati, C., Flatau, G., Gagnoux, L., Piechaczyk, M., Boquet, P., and Lemichez, E. (2002b). CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell* *111*, 553-564.

Dunbar, T. L., Yan, Z., Balla, K. M., Smelkinson, M. G., and Troemel, E. R. (2012). *C. elegans* detects pathogen-induced translational inhibition to activate immune signaling. *Cell Host Microbe* *11*, 375-386.

Duong, B. H., Onizawa, M., Oses-Prieto, J. A., Advincula, R., Burlingame, A., Malynn, B. A., and Ma, A. (2015). A20 restricts ubiquitination of pro-interleukin-1 $\beta$  protein complexes and suppresses NLRP3 inflammasome activity. *Immunity* *42*, 55-67.

Dupont, N., Jiang, S., Pilli, M., Ornatowski, W., Bhattacharya, D., and Deretic, V. (2011). Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 $\beta$ . *EMBO J* *30*, 4701-4711.

Falbo, V., Famiglietti, M., and Caprioli, A. (1992). Gene block encoding production of cytotoxic necrotizing factor 1 and hemolysin in *Escherichia coli* isolates from extraintestinal infections. *Infect Immun* *60*, 2182-2187.

Falzano, L., Rivabene, R., Santini, M. T., Fabbri, A., and Fiorentini, C. (2001). An *Escherichia coli* cytotoxin increases superoxide anion generation via rac in epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* *283*, 1026-1030.

Fantuzzi, G., Ku, G., Harding, M. W., Livingston, D. J., Sipe, J. D., Kuida, K., Flavell, R. A., and Dinarello, C. A. (1997). Response to local inflammation of IL-1 beta-converting enzyme-deficient mice. *J Immunol* *158*, 1818-1824.

Feldmeyer, L., Keller, M., Niklaus, G., Hohl, D., Werner, S., and Beer, H. D. (2007). The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. *Curr Biol* *17*, 1140-1145.

Fickl, H., Cockeran, R., Steel, H. C., Feldman, C., Cowan, G., Mitchell, T. J., and Anderson, R. (2005). Pneumolysin-mediated activation of NFkappaB in human neutrophils is antagonized by docosahexaenoic acid. *Clin Exp Immunol* *140*, 274-281.

Fiorentini, C., Gauthier, M., Donelli, G., and Boquet, P. (1998). Bacterial toxins and the Rho GTP-binding protein: what microbes teach us about cell regulation. *Cell Death Differ* 5, 720-728.

Flatau, G., Landraud, L., Boquet, P., Bruzzone, M., and Munro, P. (2000). Deamidation of RhoA glutamine 63 by the Escherichia coli CNF1 toxin requires a short sequence of the GTPase switch 2 domain. *Biochem Biophys Res Commun* 267, 588-592.

Flatau, G., Lemichez, E., Gauthier, M., Chardin, P., Paris, S., Fiorentini, C., and Boquet, P. (1997). Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature* 387, 729-733.

Fontana, M. F., Banga, S., Barry, K. C., Shen, X., Tan, Y., Luo, Z. Q., and Vance, R. E. (2011). Secreted bacterial effectors that inhibit host protein synthesis are critical for induction of the innate immune response to virulent Legionella pneumophila. *PLoS Pathog* 7, e1001289.

Fontana, M. F., Shin, S., and Vance, R. E. (2012). Activation of host mitogen-activated protein kinases by secreted Legionella pneumophila effectors that inhibit host protein translation. *Infect Immun* 80, 3570-3575.

Franklin, B. S., Bossaller, L., De Nardo, D., Ratter, J. M., Stutz, A., Engels, G., Brenker, C., Nordhoff, M., Mirandola, S. R., Al-Amoudi, A., Mangan, M. S., Zimmer, S., Monks, B. G., Fricke, M., Schmidt, R. E., Espevik, T., Jones, B., Jarnicki, A. G., Hansbro, P. M., Busto, P., Marshak-Rothstein, A., Hornemann, S., Aguzzi, A., Kastenmüller, W., and Latz, E. (2014). The adaptor ASC has extracellular and 'prionoid' activities that propagate inflammation. *Nat Immunol* 15, 727-737.

Fukazawa, A., Alonso, C., Kurachi, K., Gupta, S., Lesser, C. F., McCormick, B. A., and Reinecker, H. C. (2008). GEF-H1 mediated control of NOD1 dependent NF-kappaB activation by Shigella effectors. *PLoS Pathog* 4, e1000228.

Gabelloni, M. L., Sabbione, F., Jancic, C., Fuxman Bass, J., Keitelman, I., Iula, L., Oleastro, M., Geffner, J. R., and Trevani, A. S. (2013). NADPH oxidase derived reactive oxygen species are involved in human neutrophil IL-1 $\beta$  secretion but not in inflammasome activation. *Eur J Immunol* 43, 3324-3335.

Galán, J. E. (2009). Common themes in the design and function of bacterial effectors. *Cell Host Microbe* 5, 571-579.

Gao, W., Yang, J., Liu, W., Wang, Y., and Shao, F. (2016). Site-specific phosphorylation and microtubule dynamics control Pyrin inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E4857-66.

Garlanda, C., Dinarello, C. A., and Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* 39, 1003-1018.



- Ge, J., Gong, Y. N., Xu, Y., and Shao, F. (2012). Preventing bacterial DNA release and absent in melanoma 2 inflammasome activation by a Legionella effector functioning in membrane trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 6193-6198.
- Griebel, T., Maekawa, T., and Parker, J. E. (2014). NOD-like receptor cooperativity in effector-triggered immunity. *Trends Immunol* *35*, 562-570.
- Groß, C. J., Mishra, R., Schneider, K. S., Médard, G., Wettmarshausen, J., Dittlein, D. C., Shi, H., Gorka, O., Koenig, P. A., Fromm, S., Magnani, G., Čiković, T., Hartjes, L., Smollich, J., Robertson, A. A., Cooper, M. A., Schmidt-Supprian, M., Schuster, M., Schroder, K., Broz, P., Traidl-Hoffmann, C., Beutler, B., Kuster, B., Ruland, J., Schneider, S., Perocchi, F., and Groß, O. (2016). K(+) Efflux-Independent NLRP3 Inflammasome Activation by Small Molecules Targeting Mitochondria. *Immunity* *45*, 761-773.
- Guma, M., Ronacher, L., Liu-Bryan, R., Takai, S., Karin, M., and Corr, M. (2009). Caspase 1-independent activation of interleukin-1beta in neutrophil-predominant inflammation. *Arthritis Rheum* *60*, 3642-3650.
- Gurcel, L., Abrami, L., Girardin, S., Tschopp, J., and van der Goot, F. G. (2006). Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell* *126*, 1135-1145.
- Gurung, P., Anand, P. K., Malireddi, R. K., Vande Walle, L., Van Opdenbosch, N., Dillon, C. P., Weinlich, R., Green, D. R., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T. D. (2014). FADD and caspase-8 mediate priming and activation of the canonical and noncanonical Nlrp3 inflammasomes. *J Immunol* *192*, 1835-1846.
- Gurung, P., and Kanneganti, T. D. (2015). Novel roles for caspase-8 in IL-1 $\beta$  and inflammasome regulation. *Am J Pathol* *185*, 17-25.
- Gurung, P., Li, B., Subbarao Malireddi, R. K., Lamkanfi, M., Geiger, T. L., and Kanneganti, T. D. (2015). Chronic TLR Stimulation Controls NLRP3 Inflammasome Activation through IL-10 Mediated Regulation of NLRP3 Expression and Caspase-8 Activation. *Sci Rep* *5*, 14488.
- Gutierrez, K. D., Davis, M. A., Daniels, B. P., Olsen, T. M., Ralli-Jain, P., Tait, S. W., Gale, M., and Oberst, A. (2017). MLKL Activation Triggers NLRP3-Mediated Processing and Release of IL-1 $\beta$  Independently of Gasdermin-D. *J Immunol* *198*, 2156-2164.
- Hall, A. (2012). Rho family GTPases. *Biochem Soc Trans* *40*, 1378-1382.
- He, Y., Franchi, L., and Núñez, G. (2013). The protein kinase PKR is critical for LPS-induced iNOS production but dispensable for inflammasome activation in macrophages. *Eur J Immunol* *43*, 1147-1152.
- He, Y., Hara, H., and Núñez, G. (2016a). Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci* *41*, 1012-1021.
- He, Y., Zeng, M. Y., Yang, D., Motro, B., and Núñez, G. (2016b). NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature* *530*, 354-357.

Heasman, S. J., and Ridley, A. J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 690-701.

Henkel, J. S., Baldwin, M. R., and Barbieri, J. T. (2010). Toxins from bacteria. *EXS* 100, 1-29.

Hernandez-Cuellar, E., Tsuchiya, K., Hara, H., Fang, R., Sakai, S., Kawamura, I., Akira, S., and Mitsuyama, M. (2012). Cutting edge: nitric oxide inhibits the NLRP3 inflammasome. *J Immunol* 189, 5113-5117.

Higashi, T., Ikeda, T., Murakami, T., Shirakawa, R., Kawato, M., Okawa, K., Furuse, M., Kimura, T., Kita, T., and Horiuchi, H. (2010). Flightless-I (Fli-I) regulates the actin assembly activity of diaphanous-related formins (DRFs) Daam1 and mDia1 in cooperation with active Rho GTPase. *J Biol Chem* 285, 16231-16238.

Hilbert, D. W., Paulish-Miller, T. E., Tan, C. K., Carey, A. J., Ulett, G. C., Mordechai, E., Adelson, M. E., Gygax, S. E., and Trama, J. P. (2012). Clinical *Escherichia coli* isolates utilize alpha-hemolysin to inhibit in vitro epithelial cytokine production. *Microbes Infect* 14, 628-638.

Hordijk, P. L. (2006). Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circ Res* 98, 453-462.

Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E. O., Kono, H., Rock, K. L., Fitzgerald, K. A., and Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 9, 847-856.

Huffman, D. L., Abrami, L., Sasik, R., Corbeil, J., van der Goot, F. G., and Aroian, R. V. (2004). Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10995-11000.

Ip, W. K., Takahashi, K., Ezekowitz, R. A., and Stuart, L. M. (2009). Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol Rev* 230, 9-21.

Iyer, S. S., He, Q., Janczy, J. R., Elliott, E. I., Zhong, Z., Olivier, A. K., Sadler, J. J., Knepper-Adrian, V., Han, R., Qiao, L., Eisenbarth, S. C., Nauseef, W. M., Cassel, S. L., and Sutterwala, F. S. (2013). Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity* 39, 311-323.

Janeway, C. A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1, 1-13.

Jiang, S., Li, X., Hess, N. J., Guan, Y., and Tapping, R. I. (2016). TLR10 Is a Negative Regulator of Both MyD88-Dependent and -Independent TLR Signaling. *J Immunol* 196, 3834-3841.

Jin, J., Yu, Q., Han, C., Hu, X., Xu, S., Wang, Q., Wang, J., Li, N., and Cao, X. (2013). LRRFIP2 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation in macrophages by promoting Flightless-I-mediated caspase-1 inhibition. *Nat Commun* 4, 2075.

Johnson, D. E., Drachenberg, C., Lockatell, C. V., Island, M. D., Warren, J. W., and Donnenberg, M. S. (2000). The role of cytotoxic necrotizing factor-1 in colonization and

tissue injury in a murine model of urinary tract infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **28**, 37-41.

Jones, J. D., and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.

Joosten, L. A., Abdollahi-Roodsaz, S., Dinarello, C. A., O'Neill, L., and Netea, M. G. (2016). Toll-like receptors and chronic inflammation in rheumatic diseases: new developments. *Nat Rev Rheumatol* **12**, 344-357.

Joosten, L. A., Netea, M. G., Fantuzzi, G., Koenders, M. I., Helsen, M. M., Sparrer, H., Pham, C. T., van der Meer, J. W., Dinarello, C. A., and van den Berg, W. B. (2009). Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin-1beta. *Arthritis Rheum* **60**, 3651-3662.

Julian, L., and Olson, M. F. (2014). Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions. *Small GTPases* **5**, e29846.

Juliana, C., Fernandes-Alnemri, T., Kang, S., Farias, A., Qin, F., and Alnemri, E. S. (2012). Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J Biol Chem* **287**, 36617-36622.

Kang, T. B., Yang, S. H., Toth, B., Kovalenko, A., and Wallach, D. (2013). Caspase-8 blocks kinase RIPK3-mediated activation of the NLRP3 inflammasome. *Immunity* **38**, 27-40.

Kaper, J. B., Nataro, J. P., and Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**, 123-140.

Karmakar, M., Katsnelson, M., Malak, H. A., Greene, N. G., Howell, S. J., Hise, A. G., Camilli, A., Kadioglu, A., Dubyak, G. R., and Pearlman, E. (2015). Neutrophil IL-1 $\beta$  processing induced by pneumolysin is mediated by the NLRP3/ASC inflammasome and caspase-1 activation and is dependent on K<sup>+</sup> efflux. *J Immunol* **194**, 1763-1775.

Katsnelson, M. A., Rucker, L. G., Russo, H. M., and Dubyak, G. R. (2015). K<sup>+</sup> efflux agonists induce NLRP3 inflammasome activation independently of Ca<sup>2+</sup> signaling. *J Immunol* **194**, 3937-3952.

Kayagaki, N., Stowe, I. B., Lee, B. L., O'Rourke, K., Anderson, K., Warming, S., Cuellar, T., Haley, B., Roose-Girma, M., Phung, Q. T., Liu, P. S., Lill, J. R., Li, H., Wu, J., Kummerfeld, S., Zhang, J., Lee, W. P., Snipas, S. J., Salvesen, G. S., Morris, L. X., Fitzgerald, L., Zhang, Y., Bertram, E. M., Goodnow, C. C., and Dixit, V. M. (2015). Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* **526**, 666-671.

Keestra, A. M., and Bäuml, A. J. (2014). Detection of enteric pathogens by the nodosome. *Trends Immunol* **35**, 123-130.

Keestra, A. M., Winter, M. G., Auburger, J. J., Frässle, S. P., Xavier, M. N., Winter, S. E., Kim, A., Poon, V., Ravesloot, M. M., Waldenmaier, J. F., Tsolis, R. M., Eigenheer, R. A., and Bäuml, A. J. (2013). Manipulation of small Rho GTPases is a pathogen-induced process detected by NOD1. *Nature* **496**, 233-237.

Keller, H., Boyer, L., and Abad, P. (2016). Disease susceptibility in the Zig-Zag model of host-microbe interactions: only a consequence of immune suppression. *Mol Plant Pathol* 17, 475-479.

Keller, M., Rüegg, A., Werner, S., and Beer, H. D. (2008). Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* 132, 818-831.

Kim, Y. M., Talanian, R. V., Li, J., and Billiar, T. R. (1998). Nitric oxide prevents IL-1beta and IFN-gamma-inducing factor (IL-18) release from macrophages by inhibiting caspase-1 (IL-1beta-converting enzyme). *J Immunol* 161, 4122-4128.

Kleino, A., and Silverman, N. (2012). UnZIPping mechanisms of effector-triggered immunity in animals. *Cell Host Microbe* 11, 320-322.

Knust, Z., Blumenthal, B., Aktories, K., and Schmidt, G. (2009). Cleavage of Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1 is required for full biologic activity. *Infect Immun* 77, 1835-1841.

König, B., and König, W. (1993). Induction and suppression of cytokine release (tumour necrosis factor-alpha; interleukin-6, interleukin-1 beta) by Escherichia coli pathogenicity factors (adhesions, alpha-haemolysin). *Immunology* 78, 526-533.

Kopecki, Z., O'Neill, G. M., Arkell, R. M., and Cowin, A. J. (2011). Regulation of focal adhesions by flightless i involves inhibition of paxillin phosphorylation via a Rac1-dependent pathway. *J Invest Dermatol* 131, 1450-1459.

Kouokam, J. C., Wai, S. N., Fällman, M., Dobrindt, U., Hacker, J., and Uhlin, B. E. (2006). Active cytotoxic necrotizing factor 1 associated with outer membrane vesicles from uropathogenic Escherichia coli. *Infect Immun* 74, 2022-2030.

Lamkanfi, M., and Dixit, V. M. (2014). Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 157, 1013-1022.

Landraud, L., Gauthier, M., Fosse, T., and Boquet, P. (2000). Frequency of Escherichia coli strains producing the cytotoxic necrotizing factor (CNF1) in nosocomial urinary tract infections. *Lett Appl Microbiol* 30, 213-216.

Landraud, L., Gibert, M., Popoff, M. R., Boquet, P., and Gauthier, M. (2003). Expression of cnf1 by Escherichia coli J96 involves a large upstream DNA region including the hlyCABD operon, and is regulated by the RfaH protein. *Mol Microbiol* 47, 1653-1667.

Lech, M., Lorenz, G., Kulkarni, O. P., Grosser, M. O., Stigrot, N., Darisipudi, M. N., Günthner, R., Wintergerst, M. W., Anz, D., Susanti, H. E., and Anders, H. J. (2015). NLRP3 and ASC suppress lupus-like autoimmunity by driving the immunosuppressive effects of TGF-β receptor signalling. *Ann Rheum Dis* 74, 2224-2235.

Lee, G. S., Subramanian, N., Kim, A. I., Aksenitjevich, I., Goldbach-Mansky, R., Sacks, D. B., Germain, R. N., Kastner, D. L., and Chae, J. J. (2012). The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca<sup>2+</sup> and cAMP. *Nature* 492, 123-127.

- Lei, N., Franken, L., Ruzehaji, N., Offenhäuser, C., Cowin, A. J., and Murray, R. Z. (2012). Flightless, secreted through a late endosome/lysosome pathway, binds LPS and dampens cytokine secretion. *J Cell Sci* *125*, 4288-4296.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* *86*, 973-983.
- Lemichez, E. (2017). New Aspects on Bacterial Effectors Targeting Rho GTPases. *Curr Top Microbiol Immunol* *399*, 155-174.
- Lemonnier, M., Landraud, L., and Lemichez, E. (2007). Rho GTPase-activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology. *FEMS Microbiol Rev* *31*, 515-534.
- Lerm, M., Selzer, J., Hoffmeyer, A., Rapp, U. R., Aktories, K., and Schmidt, G. (1999). Deamidation of Cdc42 and Rac by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1: activation of c-Jun N-terminal kinase in HeLa cells. *Infect Immun* *67*, 496-503.
- Li, H., Kobayashi, M., Blonska, M., You, Y., and Lin, X. (2006). Ubiquitination of RIP is required for tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem* *281*, 13636-13643.
- Li, J., Yin, H. L., and Yuan, J. (2008). Flightless-I regulates proinflammatory caspases by selectively modulating intracellular localization and caspase activity. *J Cell Biol* *181*, 321-333.
- Liu, X., Zhang, Z., Ruan, J., Pan, Y., Magupalli, V. G., Wu, H., and Lieberman, J. (2016). Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* *535*, 153-158.
- Lopez-Castejon, G., Luheshi, N. M., Compan, V., High, S., Whitehead, R. C., Flitsch, S., Kirov, A., Prudovsky, I., Swanton, E., and Brough, D. (2013). Deubiquitinases regulate the activity of caspase-1 and interleukin-1 $\beta$  secretion via assembly of the inflammasome. *J Biol Chem* *288*, 2721-2733.
- Lu, B., Nakamura, T., Inouye, K., Li, J., Tang, Y., Lundbäck, P., Valdes-Ferrer, S. I., Olofsson, P. S., Kalb, T., Roth, J., Zou, Y., Erlandsson-Harris, H., Yang, H., Ting, J. P., Wang, H., Andersson, U., Antoine, D. J., Chavan, S. S., Hotamisligil, G. S., and Tracey, K. J. (2012). Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature* *488*, 670-674.
- Lupfer, C., Thomas, P. G., Anand, P. K., Vogel, P., Milasta, S., Martinez, J., Huang, G., Green, M., Kundu, M., Chi, H., Xavier, R. J., Green, D. R., Lamkanfi, M., Dinarello, C. A., Doherty, P. C., and Kanneganti, T. D. (2013). Receptor interacting protein kinase 2-mediated mitophagy regulates inflammasome activation during virus infection. *Nat Immunol* *14*, 480-488.
- Man, S. M., and Kanneganti, T. D. (2015). Regulation of inflammasome activation. *Immunol Rev* *265*, 6-21.

Marei, H., Carpy, A., Woroniuk, A., Vennin, C., White, G., Timpson, P., Macek, B., and Malliri, A. (2016). Differential Rac1 signalling by guanine nucleotide exchange factors implicates FLII in regulating Rac1-driven cell migration. *Nat Commun* 7, 10664.

Martinon, F., Mayor, A., and Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 27, 229-265.

Mathews, R. J., Robinson, J. I., Battellino, M., Wong, C., Taylor, J. C., Biologics in Rheumatoid Arthritis Genetics and Genomics Study Syndicate, B. R. A. G. G. S. S., Eyre, S., Churchman, S. M., Wilson, A. G., Isaacs, J. D., Hyrich, K., Barton, A., Plant, D., Savic, S., Cook, G. P., Sarzi-Puttini, P., Emery, P., Barrett, J. H., Morgan, A. W., and McDermott, M. F. (2014). Evidence of NLRP3-inflammasome activation in rheumatoid arthritis (RA); genetic variants within the NLRP3-inflammasome complex in relation to susceptibility to RA and response to anti-TNF treatment. *Ann Rheum Dis* 73, 1202-1210.

Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296, 301-305.

McEwan, D. L., Kirienko, N. V., and Ausubel, F. M. (2012). Host translational inhibition by *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A Triggers an immune response in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Host Microbe* 11, 364-374.

Medzhitov, R. (2009). Approaching the asymptote: 20 years later. *Immunity* 30, 766-775.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., and Janeway, C. A. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 2, 253-258.

Meng, G., and Strober, W. (2010). New insights into the nature of autoinflammatory diseases from mice with Nlrp3 mutations. *Eur J Immunol* 40, 649-653.

Meunier, E., and Broz, P. (2017). Evolutionary Convergence and Divergence in NLR Function and Structure. *Trends Immunol*

Meunier, E., Dick, M. S., Dreier, R. F., Schürmann, N., Kenzelmann Broz, D., Warming, S., Roose-Girma, M., Bumann, D., Kayagaki, N., Takeda, K., Yamamoto, M., and Broz, P. (2014). Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases. *Nature* 509, 366-370.

Meysick, K. C., Mills, M., and O'Brien, A. D. (2001). Epitope mapping of monoclonal antibodies capable of neutralizing cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 69, 2066-2074.

Mills, E. L., Kelly, B., and O'Neill, L. A. J. (2017). Mitochondria are the powerhouses of immunity. *Nat Immunol* 18, 488-498.

Mishra, B. B., Rathinam, V. A., Martens, G. W., Martinot, A. J., Kornfeld, H., Fitzgerald, K. A., and Sasseti, C. M. (2013). Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 $\beta$ . *Nat Immunol* 14, 52-60.

- Monteleone, M., Stow, J. L., and Schroder, K. (2015). Mechanisms of unconventional secretion of IL-1 family cytokines. *Cytokine* *74*, 213-218.
- Mourao-Sa, D., Roy, S., and Blander, J. M. (2013). Vita-PAMPs: signatures of microbial viability. *Adv Exp Med Biol* *785*, 1-8.
- Müller, A. J., Hoffmann, C., Galle, M., Van Den Broeke, A., Heikenwalder, M., Falter, L., Misselwitz, B., Kremer, M., Beyaert, R., and Hardt, W. D. (2009). The *S. Typhimurium* effector SopE induces caspase-1 activation in stromal cells to initiate gut inflammation. *Cell Host Microbe* *6*, 125-136.
- Muñoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martínez-Colón, G., Smith, B. L., Rajendiran, T. M., and Núñez, G. (2013). K<sup>+</sup> efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity* *38*, 1142-1153.
- Murakami, T., Ockinger, J., Yu, J., Byles, V., McColl, A., Hofer, A. M., and Horng, T. (2012). Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 11282-11287.
- O'Donnell, M. A., Legarda-Addison, D., Skountzos, P., Yeh, W. C., and Ting, A. T. (2007). Ubiquitination of RIP1 regulates an NF-kappaB-independent cell-death switch in TNF signaling. *Curr Biol* *17*, 418-424.
- O'Neill, L. A., Golenbock, D., and Bowie, A. G. (2013). The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* *13*, 453-460.
- Ofengeim, D., and Yuan, J. (2013). Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* *14*, 727-736.
- Orlowski, G. M., Colbert, J. D., Sharma, S., Bogyo, M., Robertson, S. A., and Rock, K. L. (2015). Multiple Cathepsins Promote Pro-IL-1 $\beta$  Synthesis and NLRP3-Mediated IL-1 $\beta$  Activation. *J Immunol* *195*, 1685-1697.
- Park, S., Juliana, C., Hong, S., Datta, P., Hwang, I., Fernandes-Alnemri, T., Yu, J. W., and Alnemri, E. S. (2013). The mitochondrial antiviral protein MAVS associates with NLRP3 and regulates its inflammasome activity. *J Immunol* *191*, 4358-4366.
- Pétrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F., and Tschopp, J. (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* *14*, 1583-1589.
- Philpott, D. J., Sorbara, M. T., Robertson, S. J., Croitoru, K., and Girardin, S. E. (2014). NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat Rev Immunol* *14*, 9-23.
- Piccini, A., Carta, S., Tassi, S., Lasiglié, D., Fossati, G., and Rubartelli, A. (2008). ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1 $\beta$  and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 8067-8072.

Piteau, M., Papatheodorou, P., Schwan, C., Schlosser, A., Aktories, K., and Schmidt, G. (2014). Lu/BCAM adhesion glycoprotein is a receptor for Escherichia coli Cytotoxic Necrotizing Factor 1 (CNF1). *PLoS Pathog* 10, e1003884.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-2088.

Porta, H., Cancino-Rodezno, A., Soberón, M., and Bravo, A. (2011). Role of MAPK p38 in the cellular responses to pore-forming toxins. *Peptides* 32, 601-606.

Py, B. F., Kim, M. S., Vakifahmetoglu-Norberg, H., and Yuan, J. (2013). Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. *Mol Cell* 49, 331-338.

Qu, Y., Misaghi, S., Izrael-Tomasevic, A., Newton, K., Gilmour, L. L., Lamkanfi, M., Louie, S., Kayagaki, N., Liu, J., Kömüves, L., Cupp, J. E., Arnott, D., Monack, D., and Dixit, V. M. (2012). Phosphorylation of NLRC4 is critical for inflammasome activation. *Nature* 490, 539-542.

Rane, C. K., and Minden, A. (2014). P21 activated kinases: structure, regulation, and functions. *Small GTPases* 5,

Rathinam, V. A., and Fitzgerald, K. A. (2016). Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. *Cell* 165, 792-800.

Ratner, A. J., Hippe, K. R., Aguilar, J. L., Bender, M. H., Nelson, A. L., and Weiser, J. N. (2006). Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins. *J Biol Chem* 281, 12994-12998.

Rippere-Lampe, K. E., O'Brien, A. D., Conran, R., and Lockman, H. A. (2001). Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor type 1 (cnf(1)) attenuates the virulence of uropathogenic Escherichia coli. *Infect Immun* 69, 3954-3964.

Rossol, M., Pierer, M., Raulien, N., Quandt, D., Meusch, U., Rothe, K., Schubert, K., Schöneberg, T., Schaefer, M., Krügel, U., Smajilovic, S., Bräuner-Osborne, H., Baerwald, C., and Wagner, U. (2012). Extracellular Ca<sup>2+</sup> is a danger signal activating the NLRP3 inflammasome through G protein-coupled calcium sensing receptors. *Nat Commun* 3, 1329.

Rühl, S., and Broz, P. (2015). Caspase-11 activates a canonical NLRP3 inflammasome by promoting K(+) efflux. *Eur J Immunol* 45, 2927-2936.

Saavedra, P. H., Demon, D., Van Gorp, H., and Lamkanfi, M. (2015). Protective and detrimental roles of inflammasomes in disease. *Semin Immunopathol* 37, 313-322.

Saleh, M., Mathison, J. C., Wolinski, M. K., Bensinger, S. J., Fitzgerald, P., Droin, N., Ulevitch, R. J., Green, D. R., and Nicholson, D. W. (2006). Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspase-12-deficient mice. *Nature* 440, 1064-1068.

Schmid-Burgk, J. L., Chauhan, D., Schmidt, T., Ebert, T. S., Reinhardt, J., Endl, E., and Hornung, V. (2016). A Genome-wide CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short



Palindromic Repeats) Screen Identifies NEK7 as an Essential Component of NLRP3 Inflammasome Activation. *J Biol Chem* 291, 103-109.

Schmidt, G., and Aktories, K. (2004). Cytotoxic Necrotizing Factors: Rho-Activating Toxins from *Escherichia coli*. *EcoSal Plus* 1,

Schmidt, G., Sehr, P., Wilm, M., Selzer, J., Mann, M., and Aktories, K. (1997). Gln 63 of Rho is deamidated by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature* 387, 725-729.

Shenoy, A. R., Wellington, D. A., Kumar, P., Kassa, H., Booth, C. J., Cresswell, P., and MacMicking, J. D. (2012). GBP5 promotes NLRP3 inflammasome assembly and immunity in mammals. *Science* 336, 481-485.

Shi, H., Wang, Y., Li, X., Zhan, X., Tang, M., Fina, M., Su, L., Pratt, D., Bu, C. H., Hildebrand, S., Lyon, S., Scott, L., Quan, J., Sun, Q., Russell, J., Arnett, S., Jurek, P., Chen, D., Kravchenko, V. V., Mathison, J. C., Moresco, E. M., Monson, N. L., Ulevitch, R. J., and Beutler, B. (2016). NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component. *Nat Immunol* 17, 250-258.

Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., Zhuang, Y., Cai, T., Wang, F., and Shao, F. (2015). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 526, 660-665.

Shimada, K., Crother, T. R., Karlin, J., Dagvadorj, J., Chiba, N., Chen, S., Ramanujan, V. K., Wolf, A. J., Vergnes, L., Ojcius, D. M., Rentsendorj, A., Vargas, M., Guerrero, C., Wang, Y., Fitzgerald, K. A., Underhill, D. M., Town, T., and Arditi, M. (2012). Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity* 36, 401-414.

Stehlik, C., and Dorfleutner, A. (2007). COPs and POPs: modulators of inflammasome activity. *J Immunol* 179, 7993-7998.

Stuart, L. M., and Boyer, L. (2013). RhoGTPases--NODEs for effector-triggered immunity in animals. *Cell Res* 23, 980-981.

Stuart, L. M., Paquette, N., and Boyer, L. (2013). Effector-triggered versus pattern-triggered immunity: how animals sense pathogens. *Nat Rev Immunol* 13, 199-206.

Stutz, A., Kolbe, C. C., Stahl, R., Horvath, G. L., Franklin, B. S., van Ray, O., Brinkschulte, R., Geyer, M., Meissner, F., and Latz, E. (2017). NLRP3 inflammasome assembly is regulated by phosphorylation of the pyrin domain. *J Exp Med*

Subramanian, N., Natarajan, K., Clatworthy, M. R., Wang, Z., and Germain, R. N. (2013). The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation. *Cell* 153, 348-361.

Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805-820.

Ting, J. P., Lovering, R. C., Alnemri, E. S., Bertin, J., Boss, J. M., Davis, B. K., Flavell, R. A., Girardin, S. E., Godzik, A., Harton, J. A., Hoffman, H. M., Hugot, J. P., Inohara, N., Mackenzie,

- A., Maltais, L. J., Nunez, G., Ogura, Y., Otten, L. A., Philpott, D., Reed, J. C., Reith, W., Schreiber, S., Steimle, V., and Ward, P. A. (2008). The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity* *28*, 285-287.
- Torrino, S., Visvikis, O., Doye, A., Boyer, L., Stefani, C., Munro, P., Bertoglio, J., Gacon, G., Mettouchi, A., and Lemichez, E. (2011). The E3 ubiquitin-ligase HACE1 catalyzes the ubiquitylation of active Rac1. *Dev Cell* *21*, 959-965.
- Valeva, A., Walev, I., Kemmer, H., Weis, S., Siegel, I., Boukhallouk, F., Wassenaar, T. M., Chavakis, T., and Bhakdi, S. (2005). Binding of Escherichia coli hemolysin and activation of the target cells is not receptor-dependent. *J Biol Chem* *280*, 36657-36663.
- van Bruggen, R., Köker, M. Y., Jansen, M., van Houdt, M., Roos, D., Kuijpers, T. W., and van den Berg, T. K. (2010). Human NLRP3 inflammasome activation is Nox1-4 independent. *Blood* *115*, 5398-5400.
- Van Gorp, H., Saavedra, P. H., de Vasconcelos, N. M., Van Opdenbosch, N., Vande Walle, L., Matusiak, M., Prencipe, G., Insalaco, A., Van Hauwermeiren, F., Demon, D., Bogaert, D. J., Dullaers, M., De Baere, E., Hochepped, T., Dehoorne, J., Vermaelen, K. Y., Haerynck, F., De Benedetti, F., and Lamkanfi, M. (2016). Familial Mediterranean fever mutations lift the obligatory requirement for microtubules in Pyrin inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, 14384-14389.
- Vance, R. E., Isberg, R. R., and Portnoy, D. A. (2009). Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. *Cell Host Microbe* *6*, 10-21.
- Vande Walle, L., Jiménez Fernández, D., Demon, D., Van Laethem, N., Van Hauwermeiren, F., Van Gorp, H., Van Opdenbosch, N., Kayagaki, N., and Lamkanfi, M. (2016). Does caspase-12 suppress inflammasome activation. *Nature* *534*, E1-4.
- Vande Walle, L., Van Opdenbosch, N., Jacques, P., Fossoul, A., Verheugen, E., Vogel, P., Beyaert, R., Elewaut, D., Kanneganti, T. D., van Loo, G., and Lamkanfi, M. (2014). Negative regulation of the NLRP3 inflammasome by A20 protects against arthritis. *Nature* *512*, 69-73.
- Vince, J. E., Wong, W. W., Gentle, I., Lawlor, K. E., Allam, R., O'Reilly, L., Mason, K., Gross, O., Ma, S., Guarda, G., Anderton, H., Castillo, R., Häcker, G., Silke, J., and Tschopp, J. (2012). Inhibitor of apoptosis proteins limit RIP3 kinase-dependent interleukin-1 activation. *Immunity* *36*, 215-227.
- Wang, T., Chuang, T. H., Ronni, T., Gu, S., Du, Y. C., Cai, H., Sun, H. Q., Yin, H. L., and Chen, X. (2006). Flightless I homolog negatively modulates the TLR pathway. *J Immunol* *176*, 1355-1362.
- Wang, X., Jiang, W., Yan, Y., Gong, T., Han, J., Tian, Z., and Zhou, R. (2014). RNA viruses promote activation of the NLRP3 inflammasome through a RIP1-RIP3-DRP1 signaling pathway. *Nat Immunol* *15*, 1126-1133.

- Welch, R. A. (2016). Uropathogenic *Escherichia coli*-Associated Exotoxins. *Microbiol Spectr* 4,
- Weng, D., Marty-Roix, R., Ganesan, S., Proulx, M. K., Vladimer, G. I., Kaiser, W. J., Mocarski, E. S., Pouliot, K., Chan, F. K., Kelliher, M. A., Harris, P. A., Bertin, J., Gough, P. J., Shayakhmetov, D. M., Goguen, J. D., Fitzgerald, K. A., Silverman, N., and Lien, E. (2014). Caspase-8 and RIP kinases regulate bacteria-induced innate immune responses and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 7391-7396.
- Wiles, T. J., Kulesus, R. R., and Mulvey, M. A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* 85, 11-19.
- Wiles, T. J., and Mulvey, M. A. (2013). The RTX pore-forming toxin  $\alpha$ -hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: progress and perspectives. *Future Microbiol* 8, 73-84.
- Wu, L., Chen, H., Curtis, C., and Fu, Z. Q. (2014). Go in for the kill: How plants deploy effector-triggered immunity to combat pathogens. [Corrected]. *Virulence* 5, 710-721.
- Xu, H., Yang, J., Gao, W., Li, L., Li, P., Zhang, L., Gong, Y. N., Peng, X., Xi, J. J., Chen, S., Wang, F., and Shao, F. (2014). Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pyrin inflammasome. *Nature* 513, 237-241.
- Yang, D., He, Y., Muñoz-Planillo, R., Liu, Q., and Núñez, G. (2015). Caspase-11 Requires the Pannexin-1 Channel and the Purinergic P2X7 Pore to Mediate Pyroptosis and Endotoxic Shock. *Immunity* 43, 923-932.
- Zhao, Y., and Shao, F. (2016). Diverse mechanisms for inflammasome sensing of cytosolic bacteria and bacterial virulence. *Curr Opin Microbiol* 29, 37-42.
- Zhao, Z. S., and Manser, E. (2005). PAK and other Rho-associated kinases--effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *Biochem J* 386, 201-214.
- Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I., and Tschopp, J. (2010). Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 11, 136-140.
- Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P., and Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469, 221-225.



# **Annexes**

## **Article collaboratif**

### **Lysosomal cholesterol hydrolysis couples efferocytosis to anti-inflammatory oxysterol production**

### **L'hydrolyse lysosomale du cholestérol couple l'efférocytose à la production d'oxystérol anti-inflammatoire**

Manon VIAUD\*, Stoyan IVANOV\*, Thibault BAROUILLET, Elsa GARCIA, François ORANGE, Isabelle DUGAIL, Laurent BOYER, Rodolphe GUINAMARD, Andrea BOCHEM, Kees G HOVINGH, Edward B THORP, Emmanuel L GAUTIER, Paul DASILBA-JARDINE et Laurent YVAN-CHARVET.

\*co-premier auteurs

Les macrophages régulent l'homéostasie tissulaire via le catabolisme des lipides plasmatiques et l'élimination des cellules mortes par un mécanisme proche de la phagocytose, appelé efférocytose, évitant ainsi le relargage du contenu immunogénique et lipidique des cellules ingérées. Afin d'éviter de trop se gorger en lipides et de se transformer en macrophages spumeux à l'origine du processus d'athérosclérose, les macrophages régulent l'excès de cholestérol ingéré en le ré-estérifiant dans les lysosomes ou en l'exportant. L'efflux de cholestérol est contrôlé par les protéines LXR (Liver X Receptors) qui détectent l'excès de cholestérol et sont impliquées dans les réponses anti-inflammatoires.

La lipase acide lysosomale (LIPA) est une enzyme hydrolysant les lipoprotéines contenues dans les lysosomes. Sa déficience cause la Maladie de Stockage des Esters de Cholestérol (MSEC) caractérisée entre autre par une dyslipidémie, un fonctionnement anormal du foie et une athérosclérose accélérée due à l'accumulation de dépôts lipidiques et l'infiltration de macrophages spumeux. Dans les macrophages, la LIPA hydrolyse les lipides endocytés pour induire leur oxydation mitochondriale, mais également les esters de cholestérol afin de faciliter l'efflux de cholestérol. De manière intéressante, la réexpression de la LIPA dans les cellules myéloïdes de souris invalidées pour la LIPA corrige la plupart des phénotypes inflammatoires et tissulaires pathogènes observés chez les patients MSEC. Ces travaux suggèrent que la LIPA joue un rôle dans l'homéostasie lipidique en prévenant l'inflammation métabolique, mais les mécanismes moléculaires conduisant à cette inflammation restent à déterminer.

Ici, l'équipe du Dr. YVAN-CHARVET a mis en évidence un phénotype inflammatoire systémique chez les patients atteints de MSEC. En cherchant par quel(s) mécanisme(s) la LIPA pouvait impacter le profil inflammatoire de ces patients, ils ont montré qu'elle régulait de manière opposée la polarisation des macrophages vers un profil pro- ou anti-inflammatoire, et que ceci corrélait fortement avec la capacité efférocytique de ces cellules.

J'ai participé à cette étude en confirmant l'implication de l'inflammasome NLRP3 dans la réponse inflammatoire induite par l'inhibition de la LIPA. De manière intéressante, dans ce modèle, NLRP3 est activé malgré l'absence de dommages lysosomaux ou de relargage des cathepsines et semble être une conséquence de l'accumulation d'esters de cholestérol. L'équipe du Dr. YVAN-CHARVET a également analysé le rôle de la NADPH oxydase qui est connue pour transloquer du cytosol vers les phagolysosomes pendant l'efférocytose où elle contrôle le pH et la production de ROS. En revanche, ils n'ont pas observé de différence de localisation de la NADPH oxydase ni d'acidification des lysosomes ou d'augmentation de la quantité de ROS dans les macrophages où la LIPA était inhibée. Ces résultats supportent l'hypothèse d'un mécanisme alternatif d'activation du NLRP3.

L'inhibition de la LIPA cause une réponse inflammatoire exagérée pendant l'efférocytose à cause d'un défaut de production de 25-hydroxycholestérol (25-HOC) d'une part, ce qui induit l'activation de l'inflammasome NLRP3, et de 27-hydroxycholestérol (27-HOC) d'autre part, ligand des LXR. Le défaut de 27-HOC empêche d'activer de façon appropriée les voies de signalisation médiée par les LXR, ce qui réduit l'efflux de cholestérol et l'élimination des cellules apoptotiques par les macrophages. Les défauts d'efférocytose dus à l'inhibition de la LIPA corrént également avec l'altération de la formation de lamellipodes dépendante de Rac1 et l'augmentation du stress oxydatif mitochondrial.

Chez la souris, l'inhibition de la LIPA bloque l'élimination des lymphocytes apoptotiques et des érythrocytes stressés par les macrophages résidents du foie et de la rate. Ce phénomène s'accompagne d'une splénomégalie et d'une accumulation de fer dans la rate en conditions hypercholestérolémiques. Ces résultats démontrent *in vivo* le rôle critique de la LIPA dans la capacité efférocytique des macrophages, laquelle est requise pour l'intégrité tissulaire en maintenant l'homéostasie lipidique et immunitaire.

Dans leur ensemble, ces travaux ont permis d'identifier l'hydrolyse lysosomale du cholestérol par la LIPA comme évènement central de l'efférocytose chez les macrophages en couplant le métabolisme lipidique à l'inflammation.






RESEARCH ARTICLE

# *Escherichia coli* $\alpha$ -Hemolysin Counteracts the Anti-Virulence Innate Immune Response Triggered by the Rho GTPase Activating Toxin CNF1 during Bacteremia

Mamady Diabate<sup>1,2,3</sup>, Patrick Munro<sup>1,2</sup>, Elsa Garcia<sup>1,2</sup>, Arnaud Jacquet<sup>2,4</sup>, Gregory Michel<sup>1,2</sup>, Sandrine Obba<sup>2,4</sup>, Diogo Goncalves<sup>2,4</sup>, Carmelo Luci<sup>2,5</sup>, Sandrine Marchetti<sup>2,4</sup>, Dieter Demon<sup>6</sup>, Clara Degos<sup>7</sup>, Yassina Bechah<sup>8</sup>, Jean-Louis Mege<sup>8</sup>, Mohamed Lamkanfi<sup>6</sup>, Patrick Auberger<sup>2,4</sup>, Jean-Pierre Gorvel<sup>7</sup>, Lynda Maria Stuart<sup>9</sup>, Luce Landraud<sup>1,2,3</sup>, Emmanuel Lemichez<sup>1,2\*</sup>, Laurent Boyer<sup>1,2\*</sup>

**1** INSERM, U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, C3M, Toxines Microbiennes dans la relation hôte pathogènes, Nice, France, **2** Université de Nice-Sophia-Antipolis, UFR Médecine, Nice, France, **3** Laboratoire de Bactériologie, CHU de Nice, Hôpital l'Archet, Nice, France, **4** INSERM, U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, C3M, Mort Cellulaire, Differentiation et Cancer, Nice, France, **5** CNRS UMR7275, IPMC, Sophia Antipolis, France, **6** Department of Medical Protein Research, VIB, Ghent, Belgium; Department of Biochemistry, Ghent University, Ghent, Belgium, **7** Aix-Marseille University UM 2, INSERM U 1104, CNRS UMR 7280, Marseille, France, **8** Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses Tropicales et Emergentes, CNRS UMR 6236, Faculté de Médecine, Marseille, France, **9** Benaroya Research Institute at Virginia Mason, Seattle, Washington, United States of America

 These authors contributed equally to this work.

\* [boyerl@unice.fr](mailto:boyerl@unice.fr) (LB); [lemichez@unice.fr](mailto:lemichez@unice.fr) (EL)



 OPEN ACCESS

**Citation:** Diabate M, Munro P, Garcia E, Jacquet A, Michel G, Obba S, et al. (2015) *Escherichia coli*  $\alpha$ -Hemolysin Counteracts the Anti-Virulence Innate Immune Response Triggered by the Rho GTPase Activating Toxin CNF1 during Bacteremia. PLoS Pathog 11(3): e1004732. doi:10.1371/journal.ppat.1004732

**Editor:** Karla J.F. Satchell, Northwestern University, Feinberg School of Medicine, UNITED STATES

**Received:** September 5, 2014

**Accepted:** February 6, 2015

**Published:** March 17, 2015

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

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

**Funding:** Our laboratory is supported by INSERM, Ligue Nationale contre le Cancer, the French Government (National Research Agency, ANR) through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE ANR-11-LABX-0028-01 and ANR A05135AS, Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC 3800, RAC13006AAA), and fellowship to M.D. from Infectiopol Sud. The funders had no

## Abstract

The detection of the activities of pathogen-encoded virulence factors by the innate immune system has emerged as a new paradigm of pathogen recognition. Much remains to be determined with regard to the molecular and cellular components contributing to this defense mechanism in mammals and importance during infection. Here, we reveal the central role of the IL-1 $\beta$  signaling axis and Gr1+ cells in controlling the *Escherichia coli* burden in the blood in response to the sensing of the Rho GTPase-activating toxin CNF1. Consistently, this innate immune response is abrogated in caspase-1/11-impaired mice or following the treatment of infected mice with an IL-1 $\beta$  antagonist. *In vitro* experiments further revealed the synergistic effects of CNF1 and LPS in promoting the maturation/secretion of IL-1 $\beta$  and establishing the roles of Rac, ASC and caspase-1 in this pathway. Furthermore, we found that the  $\alpha$ -hemolysin toxin inhibits IL-1 $\beta$  secretion without affecting the recruitment of Gr1+ cells. Here, we report the first example of anti-virulence-triggered immunity counteracted by a pore-forming toxin during bacteremia.

role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

## Author Summary

The pathogenic potentials of most microbes depend on a repertoire of virulence factors. Despite major progress in the understanding of the molecular mechanisms underlying the activities of bacterial effectors, little is known about how they cooperate during infection to overcome host immune defenses and promote microbial persistence. Here, we investigated the roles of two uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) effectors that are coordinately expressed,  $\alpha$ -hemolysin (HlyA) and cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1). We demonstrated that the HlyA toxin is critical for bacterial stability in the blood and showed that one important role of HlyA is to inhibit the CNF1-induced host response. Collectively, these findings reveal why the coordinated activities of HlyA and CNF1 are necessary for the full virulence of UPEC. Moreover, they unravel a HlyA-driven counter-defense mechanism used by bacteria to facilitate their survival.

## Introduction

Bacteremia caused by extraintestinal strains of pathogenic *Escherichia coli* is a leading cause of death worldwide [1,2]. Among these pathogens, uropathogenic *E. coli* (UPEC) is a major etiological agent of bacteremia [1,2]. Therefore, it is essential to define the mechanisms by which virulence factors of UPEC and innate immune signaling pathways control the bacterial burden in the blood.

The major virulence factors of UPEC have been characterized at the molecular level [3–6]. These factors include the presence of a specialized adhesive appendage and specific metabolic pathways as well as protein toxins; together, these features enable UPEC to efficiently colonize the urinary tract and translocate into the bloodstream of the host [7–9]. Two highly prevalent bacterial toxins,  $\alpha$ -hemolysin (HlyA) and cytotoxic necrotizing factor-1 (CNF1), work together to damage and disrupt the cohesion of the uroepithelium, which additionally leads to the worsening of the host inflammatory reaction [10–12]. The high prevalences of *hlyA* and *cnf1* in uroseptic strains of UPEC suggest the possible functions of both of these toxins during bacteremia [9,13,14]. In contrast, it has not been determined whether both toxins contribute to the pathogen burden during bacteremia. HlyA belongs to a group of pore-forming leukotoxins that contain RTX repeats [13–15]. Depending on its concentration and on the type of cell intoxicated, HlyA either displays cytolytic activity or hijacks innate immune signaling pathways [13,16–18]. However, its role during bacteremia remains to be determined. The gene encoding the CNF1 toxin is located downstream from the  $\alpha$ -hemolysin operon and is co-expressed with HlyA [19,20]. All CNF1-positive uroseptic strains display a hemolytic phenotype [9]. The CNF1 toxin possesses an enzymatic activity that is responsible for the posttranslational deamidation of a specific glutamine residue in a subset of small Rho GTPases, namely, Rac, Cdc42 and RhoA [21]. This type of modification increases the flux of activated Rho proteins and augments signaling through their downstream signaling pathways [21].

The activation of small Rho GTPases by virulence factors is a common trait of various enteric and extraintestinal Gram-negative pathogens. This activation of Rho GTPases confers upon bacteria the property to invade epithelial cells and tissues as well as to hijack inflammatory cell responses [22–25]. Emerging studies have indicated that cells are capable of perceiving the abnormal activation of Rac/Cdc42 induced by virulence factors of pathogens and translating this information via NOD1 and RIP1/RIP2 kinase signaling pathways into danger signals [26,27]. This innate immune mechanism involving the sensing of pathogens is here referred to as anti-virulence immunity (AVI), and it shares similarities with effector-triggered immunity (ETI),

the mechanism by which plants sense the activities of bacterial effectors [28,29]. It will be important to define whether and how AVI triggers pathogen destruction in collaboration with the recognition of conserved microbial-associated patterns by pattern recognition receptors (PRR).

Inflammatory caspases, such as caspase-1 and caspase-11, drive innate immune responses to a variety of bacterial stimuli, such as microbe-associated molecular patterns (MAMPs) [e.g., lipopolysaccharide (LPS) or muramyl dipeptide (MDP)], as well as toxin-driven membrane damage [30]. Pathogen perception by NOD-like receptors triggers the assembly of inflammatory caspases in an operational ASC-dependent inflammasome complex that carries out the processing and release of the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  [31,32]. The activation of inflammatory caspases by various type III injected effectors of *Salmonella*, notably those activating the small GTPase Rac, largely accounts for the induction of inflammatory responses triggered by enteric epithelial cells [33–35]. The means by which pathogenic bacteria overcome inflammatory responses, notably those driven by caspases, and succeed in infecting their hosts largely remains to be elucidated.

Here, we investigate the manner by which virulence factors of UPEC and innate immune signaling pathways impact the outcome of bacteremia. To this end, we focused on the role of CNF1 and HlyA, two toxins produced by UPEC, on pathogen burden in the bloodstream and on animal survival.

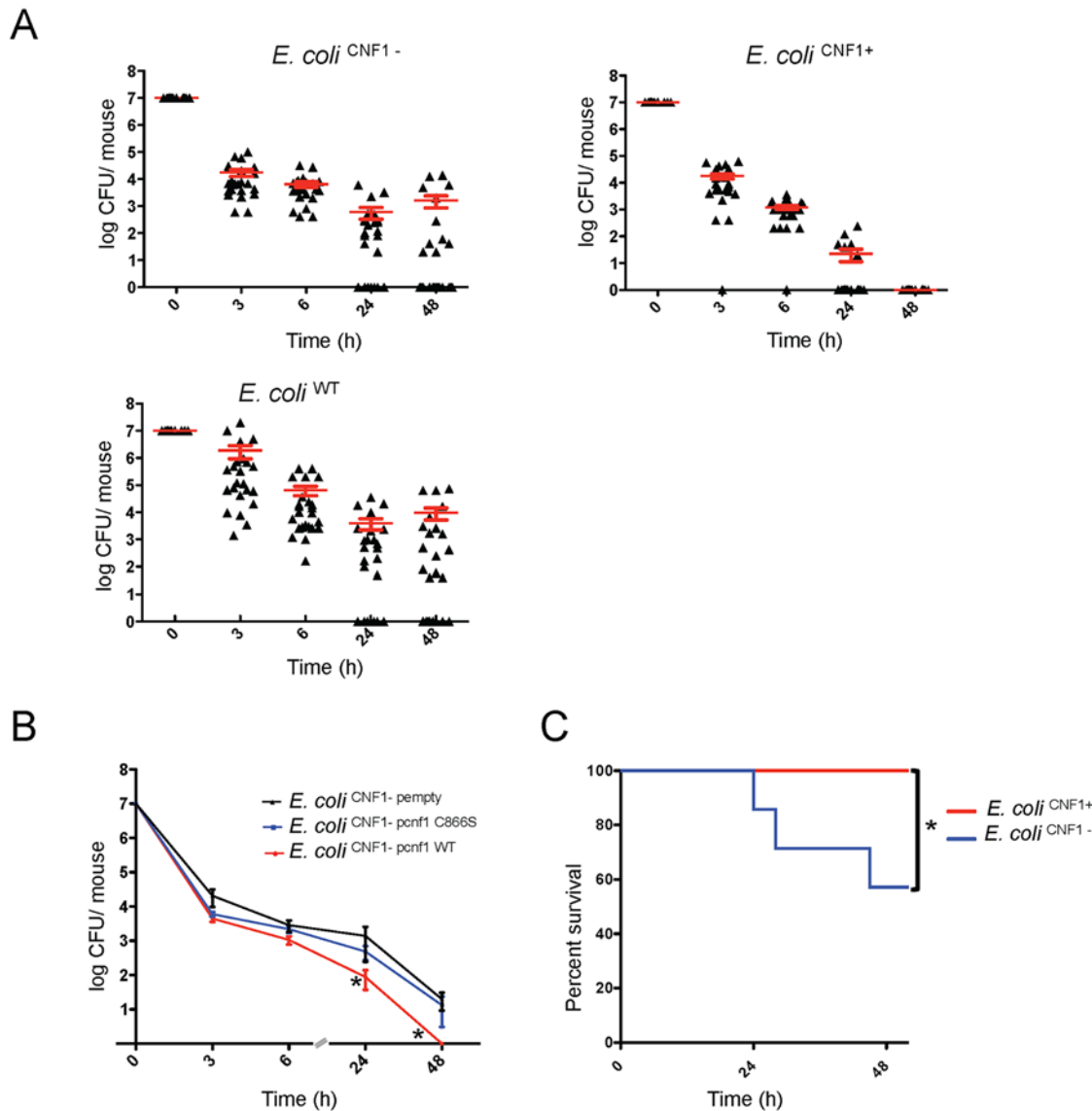
## Results

### CNF1 activity decreases pathogen load and favors host survival during bacteremia

We first assessed the role of the CNF1 toxin in determining *E. coli* burden during the course of bacteremia in the absence of interference from the other toxin, HlyA. For this purpose, we generated both an *hlyA*<sup>-</sup> deletion mutant (referred to as *E. coli*<sup>CNF1+</sup>) and an *hlyA cnf1*<sup>-</sup> double deletion mutant (referred to as *E. coli*<sup>CNF1-</sup>) from *E. coli*<sup>WT</sup> UTI89. By characterizing the strains at the genetic and functional levels, we determined that the two mutants and the wild-type strain had identical growth properties (S1 and S2 Figs). BALB/c mice were then infected intravenously with *E. coli*<sup>CNF1+</sup> or *E. coli*<sup>CNF1-</sup> isogenic strains, and the pathogen load was monitored by the serial dilution of blood samples and the enumeration of CFUs (Fig. 1A). We found that the kinetics of clearance from the bloodstream of the *E. coli*<sup>CNF1+</sup> strain was very different (Fig. 1A). The *E. coli*<sup>CNF1+</sup> strain was rapidly cleared, with no bacteria detectable at 48 h p.i. compared with *E. coli*<sup>WT</sup> and *E. coli*<sup>CNF1-</sup>, which produced 10<sup>4</sup> and 10<sup>3</sup> CFU/mouse, respectively, at 48 h p.i. (Fig. 1A). We next assessed whether the rapid clearance of the *E. coli*<sup>CNF1+</sup> strain was actually due to the enzymatic activity of CNF1. We tested this hypothesis by complementing the *E. coli*<sup>CNF1-</sup> strain with either an expression vector of wild-type CNF1 (*E. coli*<sup>CNF1- pcnf1</sup>) or an expression vector of the catalytically inactive mutant CNF1 C866S (*E. coli*<sup>CNF1- pcnf1 C866S</sup>) (Fig. 1B). We found that *E. coli*<sup>CNF1- pcnf1</sup> bacteria were cleared more rapidly from the blood than *E. coli*<sup>CNF1- pcnf1 C866S</sup> (Fig. 1B). Together, these results indicate that CNF1 activity promotes the eradication of bacteria from the bloodstream.

To discern whether there is a link between the effects of CNF1 on pathogen burden and strain virulence, we monitored the deaths of infected animals. To this end, *E. coli*<sup>CNF1-</sup> bacteria were injected at a dose sufficient to kill half of the mice by 48 h p.i. Animal survival following injection with the different isogenic mutants was monitored (Fig. 1C). We found that all of the mice infected with *E. coli*<sup>CNF1+</sup> survived, whereas the group of mice infected with *E. coli*<sup>CNF1-</sup> displayed only 57% survival (Fig. 1C).

Taken together, our data establish that CNF1 activity has a detrimental effect on the bacterial burden in the blood and that it protects against pathogen-induced animal death.



**Fig 1. Infection with *E. coli* encoding CNF1 triggers clearance of bacteria from blood and mouse survival.** (A) Female BALB/c mice were intravenously infected with  $10^7$  CFUs of *E. coli* expressing CNF1, *E. coli* UT189 $\Delta$ hlyA (*E. coli* CNF1<sup>+</sup>), or with the isogenic mutant UT189 $\Delta$ hlyA/ $\Delta$ cnf1 (*E. coli* CNF1<sup>-</sup>) or the parental strain UT189 (*E. coli* UT189) prior to the collection of peripheral blood at 3, 6, 24 and 48 h for the measurement of bacteremia (n = 25–30). The red line indicates the mean values. (B) Female BALB/c mice were intravenously infected with  $10^7$  CFUs of the *E. coli* CNF1<sup>-</sup> strain transformed with a control empty plasmid (*E. coli* CNF1<sup>-</sup> empty), with a plasmid encoding the CNF1-inactive mutant C866S (*E. coli* CNF1<sup>-</sup> pcnf1 C866S) or with a plasmid encoding *E. coli* CNF1 WT (*E. coli* CNF1<sup>-</sup> pcnf1 WT) prior to the collection of peripheral blood at 3, 6, 24 and 48 h for the measurement of bacteremia (n = 6–12). For both (A) and (B), the data are expressed as the mean  $\pm$  SEM (n = 6–30) at a \*p < 0.05. (C) BALB/c mouse survival was monitored for 52 h after intravenous injection of  $2 \cdot 10^8$  CFUs of *E. coli* CNF1<sup>+</sup> or the isogenic mutant, *E. coli* CNF1<sup>-</sup> (n = 20). \*p < 0.05 using the Gehan-Breslow-Wilcoxon chi-squared test.

doi:10.1371/journal.ppat.1004732.g001

### CNF1 potentiates the LPS-triggered secretion of IL-1 $\beta$ in an inflammatory caspase-dependent manner

We hypothesized that CNF1 activity has a negative impact on bacterial burden via the modulation of LPS-driven antimicrobial host responses. We assessed this conjecture by profiling the cytokines and chemokines secreted by primary monocytes isolated from the blood of mice after various experimental treatments. The monocytes were challenged with ultrapure LPS, with CNF1 alone, or with a combination of both factors. We used an unbiased approach that utilized

an ELISArray semi-quantitative cytokine/chemokine screen to measure the levels of the following factors: IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , KC, IL-6, IL-1 $\alpha$ , MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$ , RANTES, MCP1, IL-12, MDC, MIG, IL17, IP10, TARC, EOTAXIN, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-23, INF $\gamma$ , TNF $\beta$ 1, GM-CSF, and G-CSF. Fig. 2A shows the panel of cytokines that were synergistically induced by LPS+CNF1 compared to ultrapure LPS or CNF1 alone. The results are presented as fold inductions compared to untreated monocytes for each treatment condition Figs. (2A and S3). The panel of cytokines produced by the monocytes treated with CNF1 alone is presented (S4A Fig). Other molecular mediators, such as the IL-4 and IL-10 anti-inflammatory cytokines, showed no significant induction in the monocytes treated with LPS+CNF1 (Fig. 2A). In support of our *in vitro* analysis results, we measured higher increases in these inflammatory mediators in the sera of mice infected with *E. coli*<sup>CNF1+</sup> compared with *E. coli*<sup>CNF1-</sup> (S4B Fig). Collectively, these results show that CNF1 activity potentiates the LPS-triggered secretion of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , and IL-6 primarily, as well as the secretion of the chemokines MCP1, MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$ , and KC.

We next performed quantitative analysis of the impact of CNF1 activity on the monocyte responses to LPS. Primary monocytes isolated from the blood of naïve mice were treated with endotoxin-free CNF1 or with the catalytically inactive mutant CNF1 C866S. In the monocytes treated with recombinant purified CNF1, we observed the production of KC (75 +/- 5 pg/ml), which was strictly dependent upon the activity of CNF1 (Fig. 2B). Control experiments with ultrapure LPS alone or in combination with the catalytically inactive mutant CNF1 C866S triggered the secretion of KC (120 +/- 10 pg/ml). Strikingly, we observed a 3-fold increase in the production of KC (350 +/- 10 pg/ml) in the cells treated with both LPS and CNF1 compared with those treated with ultrapure LPS alone (Fig. 2B). The co-stimulation of monocytes with CNF1 and LPS resulted in a 12-fold increase in IL-6 secretion and a 2-fold increase in IL-1 $\beta$  secretion compared with stimulation with LPS alone (Fig. 2C and D). This synergy was detected with doses of CNF1 as low as 10 ng/ml and was of the same magnitude as that observed with the ATP treatment (S4C Fig). We also observed that CNF1 acts synergistically with other Toll-like receptors (TLR) ligands, such as Pam3CSK4 (TLR1/TLR2 agonist) and FSL-1 (TLR2/TLR6 agonist) (S4D Fig). IL-1 $\beta$  is an important mediator of inflammatory responses and is notably important in enabling the host to mount an efficient antibacterial immune response [36,37]. As a first approach, to evaluate the role of IL-1 $\beta$  in the elimination of pathogens, we treated infected mice with an IL-1 $\beta$  antagonist (KINERET). We found that this treatment dramatically antagonized the clearance of *E. coli*<sup>CNF1+</sup> (Fig. 2E).

Collectively, our data pointed for the importance of the synergic induction of IL-1 $\beta$  by LPS+CNF1 in promoting efficient bacterial clearance from the bloodstream.

## CNF1 anti-virulence immunity is mediated by caspase-1

Given the critical role of IL-1 $\beta$  signaling in the elimination of bacteria, we next aimed to precisely determine the components required for IL-1 $\beta$  maturation. IL-1 $\beta$  is expressed as a pro-form (proIL-1 $\beta$ ) that is processed by caspases-1/11 to generate the mature p17-secreted active form [38,39]. We further assessed the effects of the interplay between LPS and CNF1 on IL-1 $\beta$  maturation. This interaction was evaluated by immunoblotting to determine the level of secretion of p17 IL-1 $\beta$  into the medium of monocytes upon co-stimulation with LPS+CNF1 (Fig. 3A and B). Our results confirmed that CNF1 acts at the level of IL-1 $\beta$  maturation/secretion rather than at the level of IL-1 $\beta$  expression (Fig. 3A and B). We observed the complete inhibition of the release of p17 IL-1 $\beta$  in the monocytes treated with the pan-caspase inhibitor QVD as well as in the monocytes isolated from caspase-1/11 (C1-C11)-impaired mice (Fig. 3A and B). Notably, these results indicate that CNF1 plays a critical role in promoting the



intravenously infected with  $10^7$  CFUs of *E. coli* expressing CNF1 (*E. coli*<sup>CNF1+</sup>) + PBS as a control or with an *E. coli*<sup>CNF1+</sup> + IL-1 $\beta$  antagonist (Kineret; 1.5 mg/kg) prior to the collection of peripheral blood at 3, 6, 24 and 48 h for the measurement of bacteremia (n = 10). P-values <0.05 (\*); and P-values <0.01 (\*\*\*) were considered statistically significant.

doi:10.1371/journal.ppat.1004732.g002

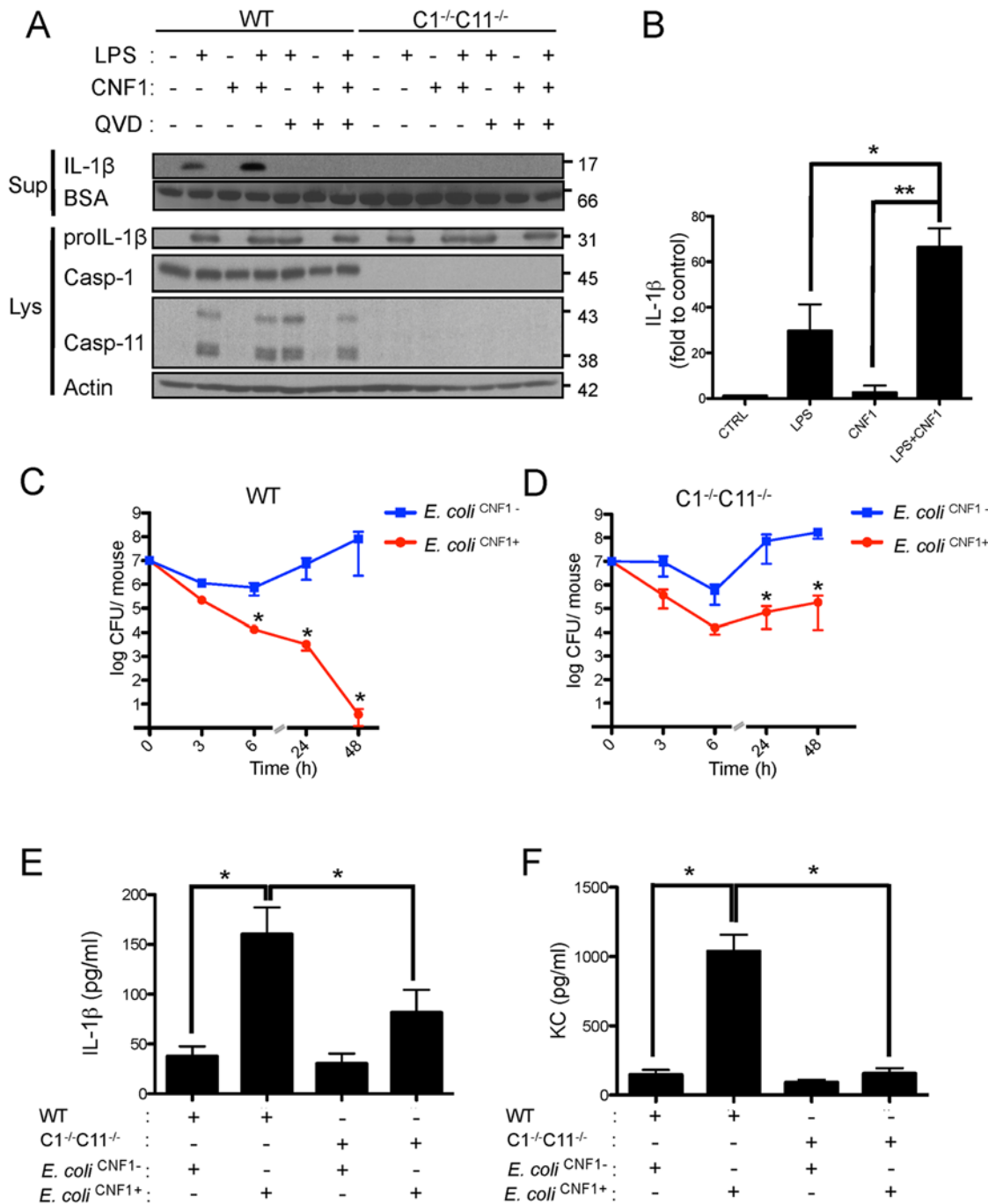
caspase-1/11-dependent maturation/secretion of IL-1 $\beta$  by monocytes challenged with LPS. We next assessed the interplay between inflammatory caspases and CNF1 during UPEC-induced bacteremia. To this end, we measured bacterial loads in the blood of C1-C11-impaired mice infected with *E. coli*<sup>CNF1+</sup> or *E. coli*<sup>CNF1-</sup>. We compared the kinetics of the bacterial burden in these animals with those of their wild-type congenic C57BL/6 littermates. In the wild-type animals, we measured a decrease in the bacterial load in the animals infected with *E. coli*<sup>CNF1+</sup>, with no bacteria detectable in the blood at 48 h, compared with the presence of  $10^7$  CFU/animal in the blood of the mice infected with *E. coli*<sup>CNF1-</sup> (Fig. 3C). In contrast with the wild-type mice, the *E. coli*<sup>CNF1+</sup> burden in the C1-C11-impaired mice remained high, reaching  $10^5$  CFU/animal at 48 h p.i. (Fig. 3D). These results indicate that inflammatory caspases-1/11 play major roles in the clearance of bacteria from the bloodstream as triggered by CNF1.

In an approach designed to be complementary to our functional approach, we analyzed the roles of inflammatory caspases in the initiation of the CNF1-dependent innate immune responses during bacteremia. To this end, we measured the levels of the IL-1 $\beta$  and KC cytokines in the sera of infected C1-C11-impaired mice and their congenic wild-type littermates. The wild-type infected with *E. coli*<sup>CNF1+</sup> displayed higher levels of IL-1 $\beta$  and KC than the WT mice infected with *E. coli*<sup>CNF1-</sup> (Fig. 3E and F). Interestingly, in the C1-11-impaired mice infected with *E. coli*<sup>CNF1+</sup>, we measured dramatic decreases in the levels of KC and IL-1 $\beta$  in the sera compared with the wild-type mice (Fig. 3E and F). This finding is consistent with the fact that inflammatory caspases-1/11 are critical determinants in the CNF1-triggered cytokine response during bacteremia. Next, we aimed to determine whether the CNF1-triggered IL-1 $\beta$  secretion involved caspase-1 or caspase-11 using bone marrow-derived macrophages isolated from caspase-1 or caspase-11 single knock-out mice. Additionally, we analyzed the effect of CNF1 on macrophages of mice in which the inflammasome adaptor ASC was knocked out. We measured the inhibition of CNF1-triggered IL-1 $\beta$  secretion in macrophages isolated from caspase-1 or ASC but not caspase-11 knock-out mice (Fig. 4A). Thus, our analysis pinpointed the major roles of caspase-1 and ASC in the secretion of IL-1 $\beta$  triggered by CNF1+LPS. In addition, we measured that the activity of caspase-1 increased when monocytes were treated with LPS+CNF1 (Fig. 4B). We then investigated the role of the GTPase Rac in IL-1 $\beta$  secretion triggered by CNF1+LPS. To this aim, we expressed a mutant of Rac2 bearing the modification catalyzed by CNF1 (Rac2<sup>Q61E</sup>). We observed that the expression of Rac2<sup>Q61E</sup> in the macrophages challenged with LPS promoted the secretion of the p17 form of IL-1 $\beta$  (Fig. 4C). Finally, we were able to detect an association between Rac2 and caspase-1 upon CNF1+LPS treatment specifically by co-immunoprecipitation (Fig. 4D).

Our results identify the Rac/caspase-1/IL-1 $\beta$  signaling axis as a major component of the CNF1-induced elimination of *Escherichia coli* from the bloodstream.

### HlyA counteracts CNF1-triggered immunity

We sought to determine the manner by which pathogenic bacteria cope with anti-virulence immunity. Although HlyA has been shown to interfere with innate immune responses that occur during urinary tract infections, its role during bacteremia is still unknown. We experimentally addressed this question by analyzing the effect of HlyA on CNF1-triggered protection against bacteremia in mice. We observed that all *E. coli* strains expressing HlyA displayed increased stability in the blood compared with the other strains, independent of the presence or absence

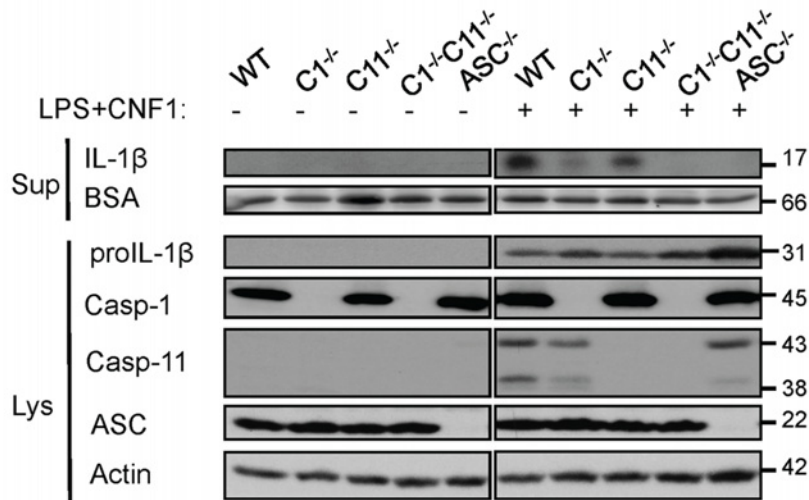


**Fig 3. CNF1-triggered immunity requires inflammatory caspases.** (A and B) IL-1 $\beta$  production and maturation/secretion after treatment with CNF1, LPS or CNF1 (1  $\mu$ g/ml) + LPS (100 ng/ml) for 10 h. Actin and BSA were used as loading controls. (B) Graph showing the quantification of IL-1 $\beta$  secretion normalized to the control (n = 3). (C and D) Female C57BL/6 WT (C) or congenic C1<sup>-/-</sup>C11<sup>-/-</sup> mice (D) were intravenously infected with 10<sup>7</sup> CFUs of *E. coli* CNF1<sup>+</sup> or with the isogenic CNF1-deleted mutant (*E. coli* CNF1<sup>-/-</sup>) prior to the collection of peripheral blood at 3, 6, 24 and 48 h for bacteremia measurements. The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM (n = 7–8). (E and F) Analysis of the circulating levels of IL-1 $\beta$  (E) and KC (F) in the mouse sera by ELISA. Serum samples from mice infected with 10<sup>7</sup> *E. coli* CNF1<sup>+</sup> or with the isogenic mutant *E. coli* CNF1<sup>-/-</sup> were collected at 3 h after intravenous infection and analyzed by ELISA (n = 3). P-values < 0.05 (\*); and P-values < 0.01 (\*\*) were considered statistically significant.

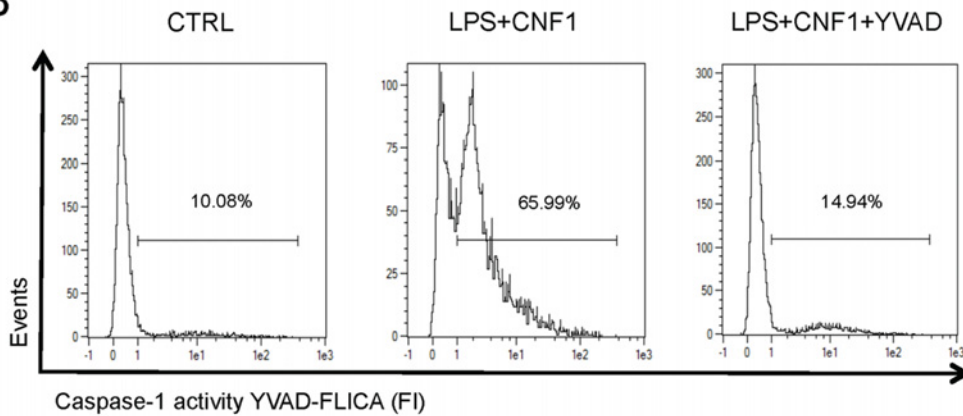
doi:10.1371/journal.ppat.1004732.g003



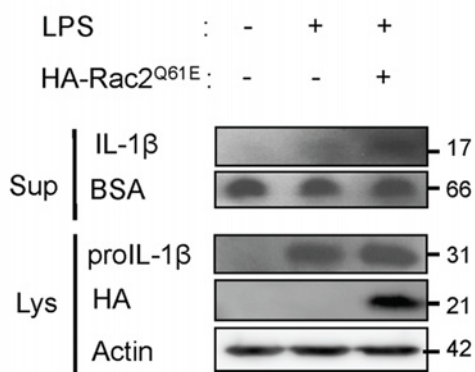
A



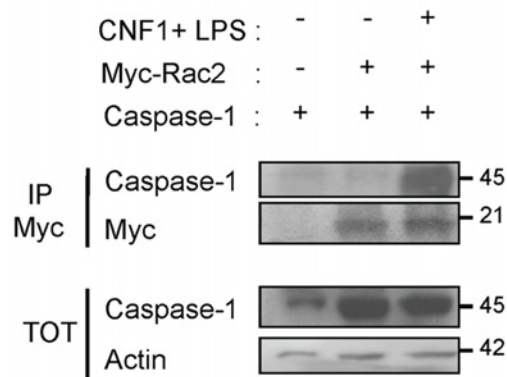
B



C

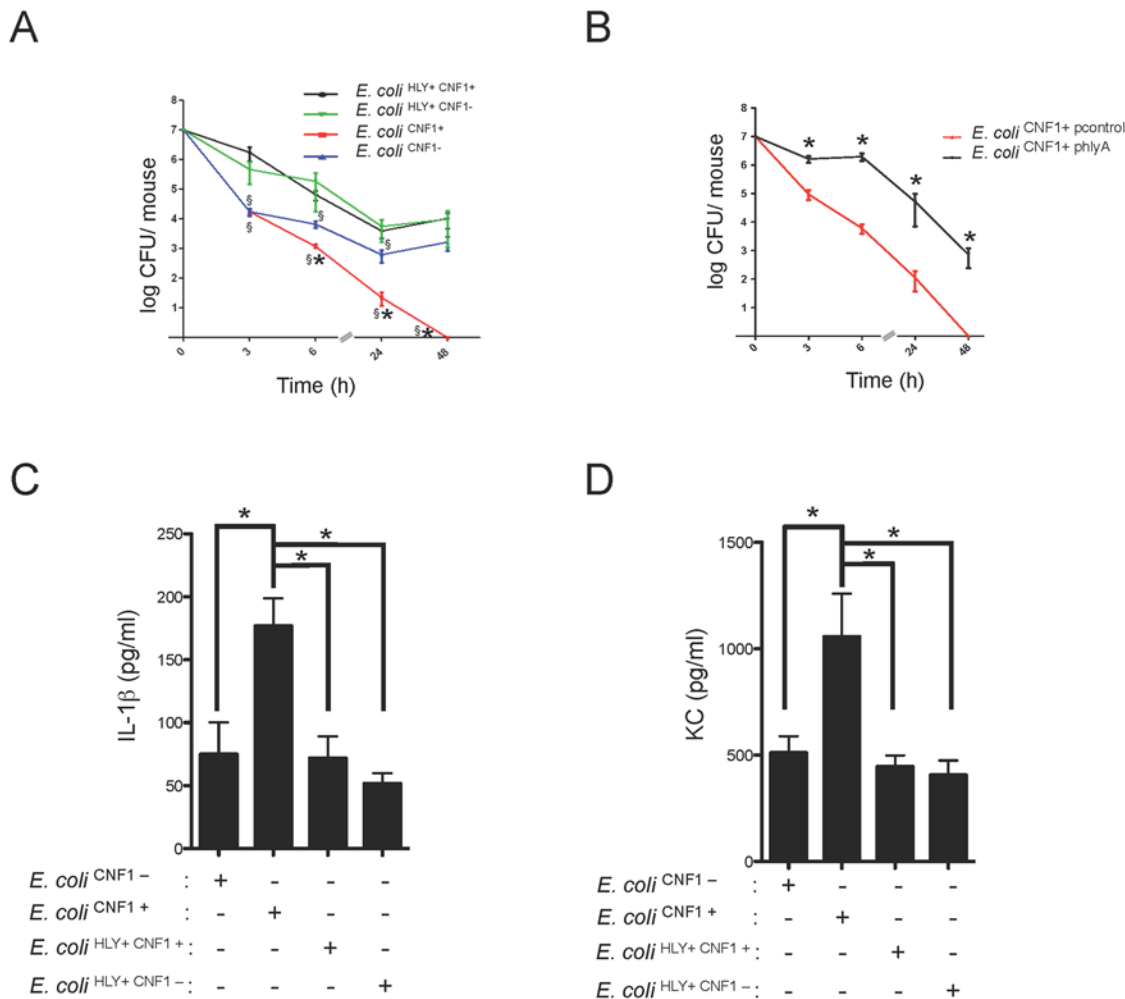


D



**Fig 4. CNF1-triggered IL-1 $\beta$  maturation requires activated Rac, ASC and caspase-1.** (A) Western blot analysis of the production and maturation/secretion of IL-1 $\beta$  by primary macrophages following treatment with CNF1, LPS or CNF1+LPS for 10 h. Actin and BSA were used as loading controls. (B) Quantification of caspase-1 activity in macrophages following treatment with CNF1+LPS for 6 h using YVAD-Fluorescent Labelled Inhibitor Caspase-1 Activity (FLICA). (C) Western blot analysis of macrophages IL-1 $\beta$  maturation/secretion upon transfection of HA-Rac2<sup>Q61E</sup> and LPS treatment. (D) Co-immunoprecipitation of Myc-Rac2 and caspase-1 using an anti-Myc antibody following the treatment of HEK 293T cells with CNF1+LPS for 6 h.

doi:10.1371/journal.ppat.1004732.g004



**Fig 5. HlyA counteracts the CNF1-induced host response.** (A) Female BALB/c mice were intravenously infected with  $10^7$  CFUs of *E. coli* expressing CNF1 (*E. coli*<sup>CNF1+</sup>) or with  $10^7$  CFUs of one of the isogenic mutants, *E. coli*<sup>CNF1-</sup>, *E. coli*<sup>HLY+ CNF1+</sup> or *E. coli*<sup>HLY+ CNF1-</sup>, prior to the collection of peripheral blood at 3, 6, 24 and 48 h for bacteremia measurements. The data are presented as a line graph (n = 20–30; mean  $\pm$  SEM). P-values < 0.05 compared to *E. coli*<sup>CNF1-</sup> are indicated by (\*); and P-values < 0.05 compared to *E. coli*<sup>HLY+ CNF1+</sup> are indicated by (§). (B) Female BALB/c mice were intravenously infected with  $10^7$  CFUs of the UT189 $\Delta$ *hlyA* strain transformed with a control empty plasmid (*E. coli*<sup>CNF1+ pcontrol</sup>) or with a plasmid encoding HlyA (*E. coli*<sup>CNF1+ phlyA</sup>) prior to the collection of peripheral blood at 3, 6, 24 and 48 h for bacteremia measurements (n = 6–12). (C and D) Analysis of the circulating levels of IL-1 $\beta$  and KC in the sera of C57BL/6 mice were measured by ELISA. Serum samples from mice infected with  $10^7$  CFUs of *E. coli*<sup>HLY+ CNF1+</sup> or with  $10^7$  CFUs of one of the isogenic mutants, *E. coli*<sup>CNF1+</sup>, *E. coli*<sup>HLY+ CNF1-</sup>, or *E. coli*<sup>CNF1-</sup>, were collected at 3 h after intravenous infection and analyzed by ELISA (n = 6). P-values < 0.05 (\*) and P-values < 0.01 (\*\*\*) were considered statistically significant.

doi:10.1371/journal.ppat.1004732.g005

of CNF1 (Fig 5A). We noticed a reduced bacterial burden in the *E. coli*<sup>CNF1-</sup> strain compared with *E. coli*<sup>HLY+ CNF1-</sup>. This reduction in the bacterial burden was the greatest in the *E. coli*<sup>CNF1+</sup> strain. We next complemented the *E. coli*<sup>CNF1+</sup> strain with a plasmid encoding HlyA (*E. coli*<sup>CNF1+ phlyA</sup>). We found that the complementation of *E. coli*<sup>CNF1+</sup> with the HlyA expression plasmid stabilized the bacterial load in the blood (Fig 5B). These results show that HlyA protects *E. coli* against host responses, particularly those triggered by CNF1, thereby promoting bacterial stability in the blood.

We went on to determine at which level HlyA acts to prevent CNF1-triggered bacterial clearing. We first investigated whether HlyA has a blocking effect on the activation of the GTPase Rac by CNF1. We detected no modification in the CNF1-mediated activation of Rac when cells were co-incubated with HlyA (S5 Fig). Thus, we hypothesize that HlyA acts

downstream of the activation of Rac at the level of cytokine production/secretion. Consistent with this hypothesis, we measured lower levels of IL-1 $\beta$  and KC in the bloodstream of the mice infected with HlyA-expressing *E. coli* strains (Fig. 5C and D).

Taken together, our data indicate that HlyA inhibits CNF1-induced pro-inflammatory cytokine responses.

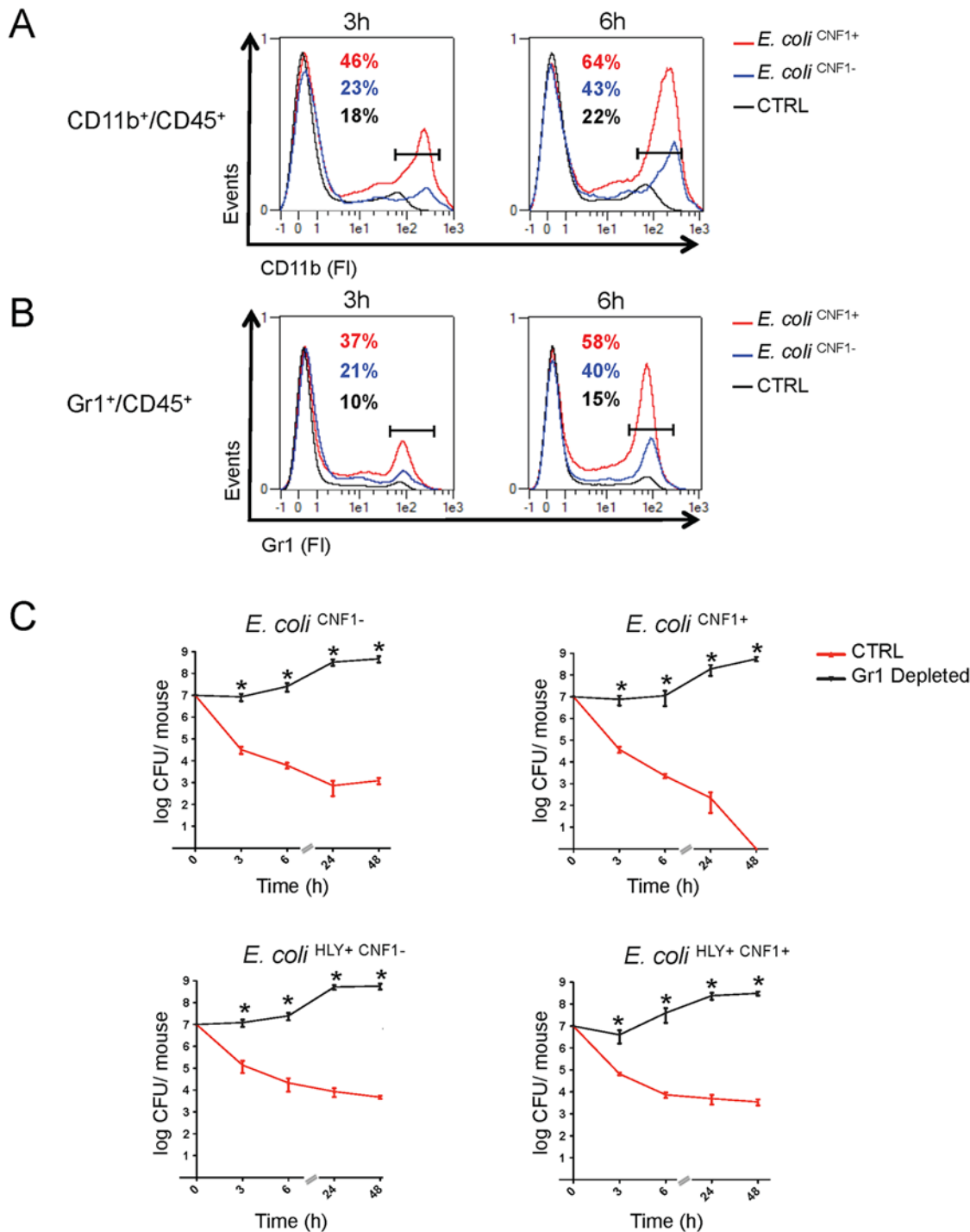
### Gr1<sup>+</sup> cells are crucial effectors of anti-*E. coli* responses in the blood

Next, we aimed to further identify the key immune effector cells that control the rapid clearance of *E. coli* exacerbated by the Rho-activating toxin CNF1 during bacteremia. We monitored the levels of circulating innate immune cells in the blood at an early time period of infection with either the *E. coli*<sup>CNF1+</sup> strain or the *E. coli*<sup>CNF1-</sup> strain. The data were analyzed as the percent of CD45-positive cells, a white blood cell marker, to exclude contamination by red blood cells. We first monitored circulating innate immune cells, including monocytes, neutrophils and granulocytes, using the CD11b marker. Interestingly, we measured higher percentages of CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> cells at both 3 h and 6 h p.i. in the blood of the mice infected with *E. coli*<sup>CNF1+</sup> (3 h: 46% and 6 h: 64%) compared with *E. coli*<sup>CNF1-</sup> (3 h: 23% and 6 h: 43%). Control mice injected with PBS showed lower levels of CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> (3 h: 18% and 6 h: 22%) (Fig. 6A). We found that chemokines, such as MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$ , MCP-1, and RANTES as well as KC were secreted by the monocytes treated with CNF1 *in vitro* and were increased in the sera of the mice at 3 h p.i. for the *E. coli*<sup>CNF1+</sup> strain compared with *E. coli*<sup>CNF1-</sup> (S4B Fig). Because these chemokines are involved in chemotaxis as well as in the activation of neutrophils, we hypothesized that the clearance of the bacteria was due to cooperation between inflammatory monocytes and neutrophils. To test this hypothesis, we monitored the subpopulation of Gr1<sup>+</sup> cells, including inflammatory monocytes and neutrophils, in the blood of infected mice. Mice infected with *E. coli*<sup>CNF1+</sup> showed 37% and 58% Gr1<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> cells at 3 h and 6 h, respectively, compared with only 21% and 40% when the mice were infected with *E. coli*<sup>CNF1-</sup> (Fig. 6B). These findings indicated that there was an increased recruitment of Gr1<sup>+</sup> cells triggered by CNF1. The recruitment of Gr1<sup>+</sup> cells was not reduced in the C1-C11 impaired mice (S6A Fig). Furthermore, the recruitment triggered by CNF1 was not impaired in HlyA-expressing *E. coli* (S6B Fig). To demonstrate the key role of Gr1<sup>+</sup> cells in the clearance of *E. coli* expressing CNF1, we depleted this subpopulation, including inflammatory monocytes (Gr1<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>) and neutrophils (Gr1<sup>+</sup> F4/80<sup>-</sup>), prior to infection. We measured an 80% reduction in the Gr1<sup>+</sup> cell population following the injection of anti-Gr1<sup>+</sup> (Ly-6G) monoclonal antibodies (RB6–8C5) (S7 Fig). We found that the depletion of Gr1<sup>+</sup> cells was sufficient to block *E. coli* clearance during bacteremia and to prevent the rapid clearance of the *E. coli*<sup>CNF1+</sup> strain (Fig. 6B).

Altogether, we show that Gr1<sup>+</sup> recruitment is required but is not sufficient for the anti-virulence immunity triggered by the Rho GTPase-activating toxin CNF1. In addition, we demonstrate that Gr1<sup>+</sup> cells are critical for the clearance of *E. coli* from the bloodstream.

## Discussion

The sensing of the activities of pathogen-encoded virulence factors is emerging as a paradigm of innate immune sensing. However, *in vivo* proof of the contribution of such sensing to mammalian immunity during infection is still scarce. Furthermore, the mechanisms by which pathogenic bacteria cope with the capacities of hosts to detect their virulence remain to be elucidated. As a major discovery, we demonstrated here the capacity of the host to control bacteremia through the exacerbation of LPS-driven IL-1 $\beta$ -mediated antimicrobial responses by CNF1 activity. This host feature relies on Rac/ASC/caspase-1 and the secretion of pro-inflammatory cytokines/chemokines, which in turn mobilize Gr1<sup>+</sup> cells. Importantly, we



**Fig 6. Gr1<sup>+</sup> cell subpopulations are necessary for the rapid clearance of the CNF1<sup>+</sup> strain from the blood.** (A and B) Flow cytometry analysis of peripheral blood isolated from mice intravenously infected with 10<sup>7</sup> CFUs of *E. coli*<sup>CNF1+</sup>, *E. coli*<sup>CNF1-</sup> or PBS (control). Percentages of cells expressing (A) CD45 and CD11b or (B) CD45 and Gr1 are indicated (n = 5). (C) BALB/c mice were injected either with an anti-Gr1 antibody or vehicle, and after 48 h, they were inoculated intravenously with 10<sup>7</sup> CFUs of *E. coli*<sup>HLY+CNF1+</sup> or with 10<sup>7</sup> CFUs of one of the isogenic mutants, *E. coli*<sup>CNF1+</sup>, *E. coli*<sup>HLY+CNF1-</sup>, or *E. coli*<sup>CNF1-</sup>, prior to the collection of peripheral blood at 3, 6, 24 and 48 h for the measurement of CFUs via the plating of serial dilutions. P-values < 0.05 (\*) were considered statistically significant.

doi:10.1371/journal.ppat.1004732.g006

described a yet unappreciated role of HlyA in impairing these innate immune responses downstream or in parallel with Gr1<sup>+</sup> cell recruitment. We also established that pathogen burden and animal death were maximal for the HlyA-positive strains.

Inappropriate, excessive or absent innate immune responses have dramatic consequences on human health. Thus, it is critical to decipher the manner by which the host determines the pathogenic potential of a microbe and responds commensurately [40,41]. It is currently unclear how anti-virulence immunity (AVI) systems of detection work together with the recognition of MAMPs to control inflammation and bacterial virulence. Because CNF1 intoxicates cells without the involvement of additional bacterial factors, it can be used to address this critical question. In this work, we report that the detection of CNF1 activity amplifies the cellular LPS response to a large panel of pro-inflammatory cytokines, including IL-1 $\beta$ , by 2- to 12-fold, thereby producing a more potent immune response. Analysis of the IL-1 $\beta$  level in the sera of mice infected with *E. coli*<sup>CNF1+</sup> indicated that they exhibited a 3-fold higher response and better resistance to infection than those infected with isogenic *E. coli*<sup>CNF1-</sup>. Our study provides both *in vitro* and *in vivo* evidence that AVI works in concert with MAMP-triggered responses to amplify the innate immune response and ultimately improve host viability. We speculate that this cooperation between AVI and MAMP-triggered immunity is a means by which the host gauges the pathogenic potential of a microbe and tailors a response commensurate with the estimated threat level.

The sensing of the activities of bacterial virulence factors has recently emerged as a conserved means of detecting pathogens. Rho GTPases are targeted by various virulence factors encoded by pathogenic bacteria. These virulence factors either post-translationally modify Rho GTPases by deamidation, glucosylation, adenylation, or ADP-ribosylation or mimic exchange factors or GTPase-activating proteins, thereby hijacking the GTP/GDP cycle and causing inappropriate activation or inactivation of the critical regulators of these cycles, which include Rho, Rac and Cdc42 GTPases [21]. Interestingly, recent studies have indicated that animal hosts have evolved dedicated strategies for detecting the activities of these virulence factors [26,27,42,43]. Indeed, based on our work focusing on CNF1 and studies of *Salmonella typhimurium* SopE/E2 virulence factors, we can speculate that the abnormal activation of Rac/Cdc42 triggers the assembly of an anti-virulence immune complex involving NOD1 and RIP kinases to promote NF- $\kappa$ B activation and in parallel to assemble a Rac/ASC/caspase-1 complex for the maturation of IL-1 $\beta$  during infections [27,35]. In addition, a recent study has implicated the NLR pyrin as a sensor of the inactivation of the Rho GTPase RhoA by virulence factors via a mechanism that leads to the activation of the pyrin inflammasome and inflammatory caspase-1 [42]. Taken together, these studies indicate that, in parallel with the PRR detection of MAMPS, the host monitors changes in the GTP/GDP cycles of Rho GTPases rather than monitoring each post-translational modification individually, a process that would require a large repertoire of receptors.

Our observation that CNF1 induces an immune response that is detrimental to bacteria raises the question of why CNF1 has been evolutionarily conserved in the UPEC genome. Several reports have established that the CNF1 toxin can trigger the disruption of epithelial cell junctions, promote cell migration and induce the internalization of bacteria into epithelial cells [25]. One hypothesis is that CNF1 has been evolutionarily conserved as an invasion factor to help bacteria cross epithelia during the early stages of infection. Our results led us to speculate that CNF1 has become genetically associated with HlyA to protect the bacteria from an otherwise detrimental CNF1-induced innate immune response. Indeed, the CNF1 and HlyA toxins are co-transcribed within a highly conserved PAI, and epidemiological studies have established that CNF1 is always expressed in association with HlyA [12,19,44,45]. Interestingly, the functional relationship between these toxins described here offers a new framework through which

to understand the molecular basis of their tight genetic link and explains why *E. coli* that express both of these toxins are pathogenic to mammals. Consistent with this idea, our work sheds light on the manner by which pathogenic bacteria cope with AVI. We report a yet unappreciated role of HlyA in the impairment of innate immune responses. In this role, HlyA has major influences on bacterial burden and host viability. Our genetic analysis revealed that HlyA protects microbes from both CNF1-dependent and CNF1-independent detrimental effects. Mice infected with *E. coli* expressing CNF1, but not HlyA, showed an increase in the IL-1 $\beta$  and KC proinflammatory cytokine levels. Given that the bacterial load is minimal under these conditions, this finding cannot be ascribed to increased LPS exposure. It is possible that HlyA targets host immune cell signaling to prevent the production of inflammatory cytokines. This idea is supported by our findings that HlyA did not impair the CNF1-induced activation of Rac, although it blocked the secretion of IL-1 $\beta$ . Further, we showed that bacteria expressing HlyA, but not CNF1, showed an increase in persistence of one log unit in the blood compared with bacteria that were deficient in both toxins. Although HlyA acted primarily to counteract the host recognition of CNF1 activity in our model, it most likely has additional effects on other components of the innate immune response to *E. coli*, including phagocytosis or detection by the immune system of other bacterial components [18]. A common feature of pathogenic bacteria is the production of a wide range of pore-forming toxins of various sizes, which have specific ionic and molecular selectivities. It will be important to establish which types of pore-forming toxins are able to block innate immunity and to what extent HlyA blocks the recognition of other factors produced by *E. coli*.

Multicellular organisms have evolved sophisticated defense mechanisms to counter microbial attack. In turn, successful microbial pathogens have evolved strategies to overcome host defenses, leading to the occurrence of diseases or chronic infections [46]. In plants, a similar system of detection of the activities of virulence factors has been termed “effector-triggered immunity” [28]. Interestingly, in this model, the pathogen-evolved mechanism counteracting the innate immune defense response has been called a “counter-defense mechanism” [47]. In our model, HlyA counteracts the CNF1-induced host cytokine response. By analogy, if we consider that CNF1 is sensed by the innate immune defense system, HlyA must be considered as a counter-defense effector used by *E. coli* to counteract the CNF1-induced host response. The data presented in the present work support a model in which HlyA acts as a major virulence factor that protects microbes from both CNF1-dependent and CNF1-independent innate immune defenses during bacteremia. Based on this model, pore-forming toxins might represent viable drug targets for the treatment of UPEC bacteremia.

## Materials and Methods

### Ethics statement

This study was carried out in strict accordance with the guidelines of the Council of the European Union (Directive 86/609/EEC) regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. The protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee on the Ethics of Animal Experiments of Nice, France (reference: NCE/2012–64).

### Bacterial strains and toxins

The *E. coli* UTI89 clinical isolate was originally obtained from a patient with cystitis [48] and was a kind gift from E. Oswald. The UTI89 streptomycin-resistant (SmR) evolved strain (WT) and isogenic mutants were grown in Luria-Bertani (LB) medium supplemented with streptomycin (200  $\mu$ g/ml). The CNF1 strain was transformed with a pQE30 plasmid (Qiagen) (*E. coli*<sup>CNF1- pempty</sup>), with pQE30-CNF1 (*E. coli*<sup>CNF1- pcnf1 WT</sup>) or with pQE30-CNF1 C866S

(*E. coli*<sup>CNF1- pcnf1 C866S</sup>) and grown in LB supplemented with ampicillin (100  $\mu$ g/ml) plus IPTG (200  $\mu$ M) for the infection experiments. The *E. coli*<sup>CNF1+</sup> strain was transformed with pBR322 (*E. coli*<sup>CNF1+ pcontrol</sup>) or with pEK50 (a plasmid bearing an operon encoding HlyA (*hlyCABD*)) (*E. coli*<sup>CNF1+ phlyA</sup>) and grown in LB supplemented with ampicillin (100  $\mu$ g/ml). The DH10B K12 *E. coli* strain (Life technologies) was transformed with either pEK50 (K12-pHlyA) (a plasmid bearing the operon encoding HlyA (*hlyCABD*)) or the pCR2.1 (K12-pLacZ). The pEK50 plasmid and anti-HlyA antibody were a kind gift from V. Koronakis. The anti-TolC antibody was a kind gift from C. Wandersman. For the infections, a 1/50 dilution of an overnight culture of each strain was inoculated and grown to OD<sub>600</sub> = 1.2. Bacteria were either washed in culture medium and diluted to obtain the corresponding MOI for the cell culture infection experiments or were harvested by centrifugation and washed twice in PBS before dilution in PBS to obtain the desired bacterial concentrations for the mouse infection experiments. Recombinant wild-type cytotoxic necrotizing factor-1 (CNF1) and its catalytically inactive form (CNF1-C866S; CNF1 CS) were produced and purified as previously reported [49]. The recombinant proteins were passed through a polymyxin B column (AffinityPak Detoxi-Gel, Pierce). The lack of endotoxin content was verified using a colorimetric LAL assay (LAL QCL-1000, Cambrex). Each stock of the CNF1 preparation (2 mg/ml) was shown to contain less than 0.5 endotoxin units/ml.

### Generation of isogenic bacterial mutant strains

The multi-step procedure used to substitute the *hlyA* and *cnf1* genes in the bacterial chromosome was performed as previously described [50]. Briefly, the pMLM135 plasmid (*cat*, *rpsL*+) was used to transform the UTI89 streptomycin-resistant (SmR) evolved strain. The integration of pMLM135 into the chromosome was selected by plating cells on chloramphenicol-containing medium at 42°C. Excision of the *hlyA* or *cnf1* gene from the chromosome was selected by plating cells on medium containing streptomycin (200  $\mu$ g/ml). The chromosomal deletions were verified by PCR and by the monitoring of the loss of HlyA and/or CNF1 activity in the deleted strains (S1 Fig). We verified that the isogenic mutant strains had growth properties that were identical to those of the UTI89 strain (S2 Fig). The sequences of the primers used in this study are available upon request.

### Cell lines and primary monocytes

Murine monocytic cells were obtained from pooled blood from 5–10 mice. Monocytes were isolated using a Ficoll-Paque (GE Healthcare) gradient technique. Adherent cells were maintained in M medium [RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS (Lonza), 2 mmol/L L-glutamine, 1 mM pyruvate, 10 mM HEPES, penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100  $\mu$ g/ml)]. When indicated, M-CSF was added as previously described [51]. Cells were transfected using the Amaxa mouse macrophage nucleofactor kit according to the manufacturer's instructions with pCDNA3.1-HA-Rac2Q61E, pRK5-Myc-Rac2, pCAGGS-Caspase-1, pCDNA3.1 or pRK5. Monocyte isolation was confirmed by flow cytometry analysis using F4/80 and CD11b antibodies (Cedarlane). HEP-2 cells and HEK 293T cells were obtained from ATCC (CCL-23 and CRL-3216) and maintained according to ATCC instructions. HEK 293T cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Life technologies) according to the manufacturer's instructions.

### Mouse model of infection

Female BALB/c and C57BL/6 mice (6–8 weeks old) were purchased from Janvier (Le Genest St Isle, France). Caspase-1/11-impaired (also designated as ICE KO) and congenic C57BL/6

mice have been previously described and were kindly provided by R. Flavell [52]. These mice are genetically identical to mice that are now also available from Jackson Laboratories (Stock #016621). Caspase-11 knock-out mice have been previously described by VM Dixit (Genentech). Caspase-1 knock-out mice were generated by D. Dieter and M. Lamkanfy. Their generation will be described elsewhere. Mice were injected i.v. with  $10^7$  CFUs of *E. coli* as previously described [8,53]. For the determination of bacteremia, blood was collected from the tail vein at the indicated times post-infection, serially diluted in sterile PBS and plated on LB plates containing streptomycin (200  $\mu$ g/ml) or ampicillin (100  $\mu$ g/ml) for the strains transformed with pQE30- or the pBR322-derived plasmids, and the plates were incubated for 16 h at 37°C. Injection quality was controlled by plating blood samples obtained from the mice at 5 min after injection. Note that the kinetics for the experiments using the transformed strains were terminated after 24 h because we observed that without selective pressure, the plasmid was stable for up to 24 h. For cytokine analysis, plasma was collected (1200 $\times$ g, 4°C, 5 min) and stored at -20°C.

### *In vivo* Gr1<sup>+</sup> cell depletion

Mice were injected intraperitoneally with a monoclonal anti-Gr1 antibody (RB6-8C5, 100  $\mu$ g/20 g body weight). After 48 h, the depletion of Gr1<sup>+</sup> cells was verified in four mice by analyzing F4/80 and/or Gr1-stained white blood cells by flow cytometry. The anti-Gr1-injected mice were then infected with either UTI89 or UTI89 isogenic mutants.

### Cytokine assays, Caspase-1 assay and antibodies

ELISAs were performed according to the manufacturer's instructions (Qiagen, MEM-003A, MEM-004A, MEM-006A, MEM-008A, and MEM-009A). Cytokine concentrations were determined by ELISA and by IL-1 $\beta$  maturation and visualized by western blotting according to the manufacturer's instructions (KC, TNF $\alpha$  and IL-6, R&D Systems, USA; IL-1 $\beta$ , Raybiotech, USA). Caspase-1 activity was measured using FAM-YVAD-FMK caspase-1 assay kit (ImmunoChemistry Technologies) according to the manufacturer's instructions. Antibodies used in this study are: anti-IL-1 $\beta$ /IL-1F2 (R&D systems), anti-Caspase-1 (M-20, SantaCruz), anti-Caspase-11 (17D9, Novus), anti-ASC (AL177, Adipogen), anti-HA (16B12, Covance), anti-Myc (9E10, Roche), anti-Rac (102/Rac1, BD Biosciences), anti-GAPDH (FL335, SantaCruz), anti- $\beta$ -actin (AC-74, Sigma).

### Activated RacGTPase pull-down

Primary monocytes ( $5 \times 10^6$  cells per condition) were treated with 1  $\mu$ g/ml of CNF1 toxin for 6 h with or without addition at identical MOI (MOI of 0.5) of live K12 *E. coli* expressing HlyA (K12-pHlyA) or LacZ (K12-pLacZ) as a control. Cells were lysed at 4°C using a lysis buffer (Tris 25mM pH 7.5, NaCl 150mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, EGTA 0.5mM, TritonX100 0.5%, glycerol 4%) and Pull-down assays were performed using 50  $\mu$ g of GST-PAK<sup>70-106</sup>. Proteins were resolved on 12% SDS-PAGE followed by transfer on PVDF membranes. Equal amount of proteins engaged in the Pull-down assays was confirmed by immunoblotting anti- $\beta$ -actin.

### Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Prism V5.0b software (GraphPad, La Jolla, CA). Unless stated otherwise, comparisons between two groups were performed using the Mann-Whitney nonparametric test, and comparisons among three or more groups were conducted



with the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test. P-values < 0.05 (\*) and P-values < 0.01 (\*\*) were considered statistically significant.

## Supporting Information

**S1 Fig. Genomic and phenotypic characterization of isogenic UTI89 mutants.** (A) PCR amplification of bacterial genomic DNA of UTI89 (*E. coli*<sup>HLY+CNF1+</sup>) and the isogenic mutants UTI89 $\Delta$ *hlyA* (*E. coli*<sup>CNF1+</sup>), UTI89 $\Delta$ *cnf1* (*E. coli*<sup>HLY+CNF1-</sup>), and UTI89 $\Delta$ *hlyA*  $\Delta$ *cnf1* (*E. coli*<sup>CNF1-</sup>) using PCR primers specific for the flanking regions of *cnf1* (upper panel) and for the flanking regions of *hlyA* (lower panel) (representative results of n = 3). (B) Hemolytic activity of *E. coli*<sup>HLY+CNF1+</sup> and the isogenic mutants *E. coli*<sup>CNF1+</sup>, *E. coli*<sup>HLY+CNF1-</sup>, and *E. coli*<sup>CNF1-</sup> plated on sheep blood agar plates (representative results of n = 3). (C) Bacteria were lysed after 16 h of culture in LB, and the biological activities of CNF1 in *E. coli*<sup>HLY+CNF1+</sup>, the isogenic mutants *E. coli*<sup>CNF1+</sup>, *E. coli*<sup>HLY+CNF1-</sup>, and *E. coli*<sup>CNF1-</sup>, and control untreated cells were assessed after 24 h by HEp-2 multinucleation quantification as previously described [49]. (TIF)

**S2 Fig. Growth properties and expression of HlyA and CNF1 toxins in the UTI89 strain and in isogenic mutants.** (A and B) *E. coli*<sup>HLY+CNF1+</sup> and the isogenic mutants *E. coli*<sup>CNF1+</sup>, *E. coli*<sup>HLY+CNF1-</sup>, and *E. coli*<sup>CNF1-</sup> were cultured in LB medium at 37°C. (A) OD600 was measured over time to monitor bacterial growth (n = 3). (B) RNA samples were prepared by TRIzol extraction followed by DNase1 (Qiagen) digestion to prevent DNA contamination. Toxin expression was monitored by qRT-PCR, normalized to 16S RNA and expressed relative to WT UTI89 (n = 3; mean  $\pm$  SD). (TIF)

**S3 Fig. ELISArray analysis of the culture supernatants of monocytes treated with CNF1, LPS or with both CNF1 and LPS.** Monocytes (5x10<sup>5</sup> cells per condition) isolated from mouse blood were treated for 10 h with PBS (control) or with 1  $\mu$ g/ml of CNF1 toxin or with 100 ng/ml LPS or with both 1  $\mu$ g/ml of CNF1 toxin and 100 ng/ml LPS. The supernatants of the monocyte cultures were analyzed using mouse ELISArray kits. The data are shown as fold inductions compared to the control condition [n = 3; mean (SD)]. (TIF)

**S4 Fig. Analysis of cytokine secretion triggered by CNF1 *in vitro* and *in vivo*.** (A) Cytokine array of monocytes treated with CNF1 or the inactive mutant CNF1C866S. Monocytes (5x10<sup>5</sup> cells per condition) isolated from mouse blood were treated with 1  $\mu$ g/ml of CNF1 toxin for 10 h with or without 1  $\mu$ g/ml of the catalytically inactive CNF1C866S mutant. (B) ELISArray analysis of the sera of mice infected with *E. coli*<sup>CNF1+</sup> or *E. coli*<sup>CNF1-</sup>. The mouse sera were analyzed using mouse ELISArray kits. The data are shown as fold inductions compared to the control condition [n = 3; mean (SD)]. (C) Primary monocytes (5x10<sup>5</sup> cells per condition) were treated with PBS (control) or with 0.005 to 5 mM ATP for 10 h with or without 100 ng/ml LPS and compared with primary monocytes (5x10<sup>5</sup> cells per condition) treated with 0.001 to 1  $\mu$ g/ml CNF1 toxin for 10 h with or without 100 ng/ml LPS (n = 3). (D) Primary monocytes (5x10<sup>5</sup> cells per condition) treated for 10 h with Pam3CSK4 or FSL-1 alone or in combination with 1  $\mu$ g/ml CNF1 toxin or with 1  $\mu$ g/ml of the catalytically inactive CNF1C866S mutant. IL-1 $\beta$  cytokine secretion was analyzed by ELISA (n = 3). (TIF)

**S5 Fig. Impact of the HlyA toxin on CNF1-triggered Rac activation.** (A) Primary monocytes (5x10<sup>6</sup> cells per condition) were treated with 1  $\mu$ g/ml of CNF1 toxin for 6 h with or without the

addition at identical MOI (MOI of 0.5) of live K12 *E. coli* transformed with a plasmid bearing the operon encoding HlyA (*hlyCABD*) (K12-pHlyA) or LacZ (K12-pLacZ) as a control. The cells were lysed, and the GTP-bound Rac was isolated using a GST-Pak pull-down assay. Samples were analyzed by immunoblotting. (B and C) *E. coli* K12-pLacZ or K12-pHlyA were grown statically in tissue culture media for 6 h. (B) Hemolytic activity of *E. coli* K12-pHlyA. Drops of culture of *E. coli* K12-pLacZ and K12-pHlyA were spotted on sheep blood agar plates and incubated at 37°C for 6 h. (C) Production and secretion of HlyA by K12-pHlyA. *E. coli* K12-pLacZ or K12-pHlyA pellets (Pellet) or filtered supernatant (Sup) were analyzed by immunoblotting anti-HlyA toxin (anti-HlyA) and anti-TolC outer membrane protein (anti-TolC) used as a control. (TIF)

**S6 Fig. Flow cytometry analysis of the Gr1<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup> populations.** (A and B) Flow cytometry analysis of peripheral blood isolated from mice intravenously infected with 10<sup>7</sup> CFUs of (A) *E. coli*<sup>CNF1+</sup>, *E. coli*<sup>CNF1-</sup> (B) *E. coli*<sup>CNF1+HLY-</sup>, or *E. coli*<sup>CNF1+HLY+</sup>. The percentages of cells expressing CD45 and CD11b or CD45 and Gr1 are indicated (n = 5). (TIF)

**S7 Fig. Flow cytometry analysis of the antibody-triggered depletion of the Gr1<sup>+</sup> population.** Flow cytometry analysis of white blood cells isolated after 48 h by Ficoll-Paque gradient to assess the depletion of the Gr1<sup>+</sup> population (pooled blood samples from 3 mice). (TIF)

## Acknowledgments

We acknowledge Olivier Dussurget, Amel Mettouchi, Pierre Marty, Johan Courjon, Thomas Henry, Vassilis Koronakis, Cécile Wandersman, Vishva Dixit, Jean-Ehrland Ricci, Anne Doye, Gilles Flatau, Caroline Stefani, Bernard Ferrua and Daniel Hamaoui for advice, materials and/or technical support. The authors greatly acknowledge the C3M animal room facility. We thank Olivier Dussurget, Amel Mettouchi, Orane Visvikis and Marcel Deckert for critical reading of the manuscript.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MD PM EG AJ GM DG SO CL SM CD YB JLM PA JPG LMS LL EL LB. Performed the experiments: MD PM EG CL AJ GM DG SO SM CD YB LB. Analyzed the data: MD PM CL AJ JLM PA JPG LMS LL EL LB. Contributed reagents/materials/analysis tools: DD ML. Wrote the paper: EL LB.

## References

1. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 2003; 348: 1546–1554. PMID: [12700374](#)
2. Russo TA, Johnson JR Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis.* 2000; 181: 1753–1754. PMID: [10823778](#)
3. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol.* 2008; 85: 11–19. doi: [10.1016/j.yexmp.2008.03.007](#) PMID: [18482721](#)
4. Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013; 358: 3–32. doi: [10.1007/82\\_2012\\_303](#) PMID: [23340801](#)
5. Hannan TJ, Totsika M, Mansfield KJ, Moore KH, Schembri MA et al. Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. *FEMS Microbiol Rev.* 2012; 36: 616–648. doi: [10.1111/j.1574-6976.2012.00339.x](#) PMID: [22404313](#)

6. Welch RA, Burland V, Plunkett G, Redford P, Roesch P et al. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 17020–17024. PMID: [12471157](#)
7. Nagy G, Altenhoefer A, Knapp O, Maier E, Dobrindt U et al. Both alpha-haemolysin determinants contribute to full virulence of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Microbes Infect*. 2006; 8: 2006–2012. PMID: [16787757](#)
8. Alteri CJ, Mobley HL *Escherichia coli* physiology and metabolism dictates adaptation to diverse host microenvironments. *Curr Opin Microbiol*. 2012; 15: 3–9. doi: [10.1016/j.mib.2011.12.004](#) PMID: [22204808](#)
9. Dubois D, Delmas J, Cady A, Robin F, Sivignon A et al. Cyclomodulins in urosepsis strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 2010; 48: 2122–2129. doi: [10.1128/JCM.02365-09](#) PMID: [20375237](#)
10. Smith YC, Rasmussen SB, Grande KK, Conran RM, O'Brien AD Hemolysin of Uropathogenic *Escherichia coli* Evokes Extensive Shedding of the Uroepithelium and Hemorrhage in Bladder Tissue Within the First 24 Hours After Intraurethral Inoculation of Mice. *Infect Immun*. 2008;
11. Rippere-Lampe KE, Lang M, Ceri H, Olson M, Lockman HA et al. Cytotoxic necrotizing factor type 1-positive *Escherichia coli* causes increased inflammation and tissue damage to the prostate in a rat prostatitis model. *Infect Immun*. 2001; 69: 6515–6519. PMID: [11553597](#)
12. Real JM, Munro P, Buisson-Touati C, Lemichez E, Boquet P et al. Specificity of immunomodulator secretion in urinary samples in response to infection by alpha-hemolysin and CNF1 bearing uropathogenic *Escherichia coli*. *Cytokine*. 2007; 37: 22–25. PMID: [17382555](#)
13. Linhartova I, Bumba L, Masin J, Basler M, Osicka R et al. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol Rev*. 2010; 34: 1076–1112. doi: [10.1111/j.1574-6976.2010.00231.x](#) PMID: [20528947](#)
14. Welch RA Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol Microbiol*. 1991; 5: 521–528. PMID: [2046545](#)
15. Bhakdi S, Bayley H, Valeva A, Walev I, Walker B et al. Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and *Escherichia coli* hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Arch Microbiol*. 1996; 165: 73–79. PMID: [8593102](#)
16. Gadeberg OV, Orskov I, Rhodes JM Cytotoxic effect of an alpha-hemolytic *Escherichia coli* strain on human blood monocytes and granulocytes in vitro. *Infect Immun*. 1983; 41: 358–364. PMID: [6345395](#)
17. Gur C, Copenhagen-Glazer S, Rosenberg S, Yamin R, Enk J et al. Natural Killer Cell-Mediated Host Defense against Uropathogenic *E. coli* Is Counteracted by Bacterial HemolysinA-Dependent Killing of NK Cells. *Cell Host Microbe*. 2013; 14: 664–674. doi: [10.1016/j.chom.2013.11.004](#) PMID: [24331464](#)
18. Wiles TJ, Mulvey MA The RTX pore-forming toxin alpha-hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: progress and perspectives. *Future Microbiol*. 2013; 8: 73–84. doi: [10.2217/fmb.12.131](#) PMID: [23252494](#)
19. Landraud L, Gibert M, Popoff MR, Boquet P, Gauthier M Expression of *cnf1* by *Escherichia coli* J96 involves a large upstream DNA region including the *hlyCABD* operon, and is regulated by the *RfaH* protein. *Mol Microbiol*. 2003; 47: 1653–1667. PMID: [12622819](#)
20. Leeds JA, Welch RA *RfaH* enhances elongation of *Escherichia coli* *hlyCABD* mRNA. *J Bacteriol*. 1996; 178: 1850–1857. PMID: [8606157](#)
21. Aktories K, Barbieri J Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nat Rev Micro*. 2005; 3: 397–410. PMID: [15821726](#)
22. Galan JE Common themes in the design and function of bacterial effectors. *Cell Host Microbe*. 2009; 5: 571–579. doi: [10.1016/j.chom.2009.04.008](#) PMID: [19527884](#)
23. Bruno VM, Hannemann S, Lara-Tejero M, Flavell RA, Kleinstein SH et al. *Salmonella* Typhimurium type III secretion effectors stimulate innate immune responses in cultured epithelial cells. *PLoS Pathog*. 2009; 5: e1000538. doi: [10.1371/journal.ppat.1000538](#) PMID: [19662166](#)
24. Munro P, Flatau G, Doye A, Boyer L, Oregoni O et al. Activation and proteasomal degradation of rho GTPases by cytotoxic necrotizing factor-1 elicit a controlled inflammatory response. *J Biol Chem*. 2004; 279: 35849–35857. PMID: [15152002](#)
25. Lemonnier M, Landraud L, Lemichez E Rho GTPase-activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology. *FEMS Microbiol Rev*. 2007; 31: 515–534. PMID: [17680807](#)
26. Boyer L, Magoc L, De Jardin S, Cappillino M, Paquette N et al. Pathogen-derived effectors trigger protective immunity via activation of the Rac2 enzyme and the IMD or Rip kinase signaling pathway. *Immunity*. 2011; 35: 536–549. doi: [10.1016/j.immuni.2011.08.015](#) PMID: [22018470](#)
27. Keestra AM, Winter MG, Auburger JJ, Frassle SP, Xavier MN et al. Manipulation of small Rho GTPases is a pathogen-induced process detected by NOD1. *Nature*. 2013; 496: 233–237. doi: [10.1038/nature12025](#) PMID: [23542589](#)

28. Jones JD, Dangi JL The plant immune system. *Nature*. 2006; 444: 323–329. PMID: [17108957](#)
29. Stuart LM, Paquette N, Boyer L Effector-triggered versus pattern-triggered immunity: how animals sense pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2013; 13: 199–206. doi: [10.1038/nri3398](#) PMID: [23411798](#)
30. Broz P, Monack DM Molecular mechanisms of inflammasome activation during microbial infections. *Immunol Rev*. 2011; 243: 174–190. doi: [10.1111/j.1600-065X.2011.01041.x](#) PMID: [21884176](#)
31. Keller M, Ruegg A, Werner S, Beer HD Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell*. 2008; 132: 818–831. doi: [10.1016/j.cell.2007.12.040](#) PMID: [18329368](#)
32. Kostura MJ, Tocci MJ, Limjuco G, Chin J, Cameron P et al. Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86: 5227–5231. PMID: [2787508](#)
33. Friebel A, Ilchmann H, Aepfelbacher M, Ehrbar K, Machleidt W et al. SopE and SopE2 from *Salmonella typhimurium* activate different sets of RhoGTPases of the host cell. *J Biol Chem*. 2001; 276: 34035–34040. PMID: [11440999](#)
34. Lara-Tejero M, Sutterwala FS, Ogura Y, Grant EP, Bertin J et al. Role of the caspase-1 inflammasome in *Salmonella typhimurium* pathogenesis. *J Exp Med*. 2006; 203: 1407–1412. PMID: [16717117](#)
35. Muller AJ, Hoffmann C, Galle M, Van Den Broeke A, Heikenwalder M et al. The *S. Typhimurium* effector SopE induces caspase-1 activation in stromal cells to initiate gut inflammation. *Cell Host Microbe*. 2009; 6: 125–136. doi: [10.1016/j.chom.2009.07.007](#) PMID: [19683679](#)
36. Dinarello CA Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann N Y Acad Sci*. 1998; 856: 1–11. PMID: [9917859](#)
37. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. 2013; 39: 1003–1018. doi: [10.1016/j.immuni.2013.11.010](#) PMID: [24332029](#)
38. Franchi L, Munoz-Planillo R, Nunez G Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol*. 2012; 13: 325–332. doi: [10.1038/ni.2231](#) PMID: [22430785](#)
39. Petrilli V, Dostert C, Muruve DA, Tschopp J The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2007; 19: 615–622. PMID: [17977705](#)
40. Sansonetti PJ The innate signaling of dangers and the dangers of innate signaling. *Nat Immunol*. 2006; 7: 1237–1242. PMID: [17110939](#)
41. Vance RE, Isberg RR, Portnoy DA Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and non-pathogenic microbes by the innate immune system. *Cell Host Microbe*. 2009; 6: 10–21. doi: [10.1016/j.chom.2009.06.007](#) PMID: [19616762](#)
42. Xu H, Yang J, Gao W, Li L, Li P et al. Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the PIR1 inflammasome. *Nature*. 2014;
43. Wang X, Parashar K, Sitaram A, Bliska JB The GAP Activity of Type III Effector YopE Triggers Killing of *Yersinia* in Macrophages. *PLoS Pathog*. 2014; 10: e1004346. doi: [10.1371/journal.ppat.1004346](#) PMID: [25165815](#)
44. Caprioli A, Falbo V, Ruggeri FM, Minelli F, Orskov I et al. Relationship between cytotoxic necrotizing factor production and serotype in hemolytic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 1989; 27: 758–761. PMID: [2656748](#)
45. Yamamoto S, Tsukamoto T, Terai A, Kurazono H, Takeda Y et al. Distribution of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from urine of cystitis patients. *Microbiol Immunol*. 1995; 39: 401–404. PMID: [8551971](#)
46. Finlay BB, McFadden G Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell*. 2006; 124: 767–782. PMID: [16497587](#)
47. Pumphlin N, Voinnet O RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat Rev Microbiol*. 2013; 11: 745–760. doi: [10.1038/nrmicro3120](#) PMID: [24129510](#)
48. Mulvey MA, Schilling JD, Hultgren SJ Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun*. 2001; 69: 4572–4579. PMID: [11402001](#)
49. Doye A, Boyer L, Mettouchi A, Lemichez E Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of Rho proteins by the CNF1 toxin. *Methods Enzymol*. 2006; 406: 447–456. PMID: [16472677](#)
50. Lemonnier M, Bouet JY, Libante V, Lane D Disruption of the F plasmid partition complex in vivo by partition protein SopA. *Mol Microbiol*. 2000; 38: 493–505. PMID: [11069673](#)
51. Jacquet A, Obba S, Boyer L, Dufies M, Robert G et al. Autophagy is required for CSF-1-induced macrophagic differentiation and acquisition of phagocytic functions. *Blood*. 2012; 119: 4527–4531. doi: [10.1182/blood-2011-11-392167](#) PMID: [22452982](#)
52. Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ et al. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*. 1995; 267: 2000–2003. PMID: [7535475](#)
53. Smith SN, Hagan EC, Lane MC, Mobley HL Dissemination and systemic colonization of uropathogenic *Escherichia coli* in a murine model of bacteremia. *MBio*. 2010; 1: