



HAL
open science

Rôle des protéines secrétées par le TPS dans la virulence bactérienne

Adèle Renier

► **To cite this version:**

Adèle Renier. Rôle des protéines secrétées par le TPS dans la virulence bactérienne. Virologie. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALV083 . tel-04529223

HAL Id: tel-04529223

<https://theses.hal.science/tel-04529223>

Submitted on 2 Apr 2024

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Virologie - Microbiologie - Immunologie

Unité de recherche : Institut de Biologie Structurale

Rôle des protéines secrétées par le TPS dans la virulence bactérienne

Exploring Two Partner Secretion in virulence of Gram-negative bacteria

Présentée par :

Adèle RENIER

Direction de thèse :

Ina ATTREE
DIRECTRICE DE RECHERCHE, Université Grenoble Alpes

Directrice de thèse

Rapporteurs :

Sarah BIGOT
DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS délégation Rhône Auvergne
Christophe BELOIN
DIRECTEUR DE RECHERCHE, Institut Pasteur

Thèse soutenue publiquement le **6 novembre 2023**, devant le jury composé de :

Ina ATTREE DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS délégation Alpes	Directrice de thèse
Sarah BIGOT DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS délégation Rhône Auvergne	Rapporteuse
Christophe BELOIN DIRECTEUR DE RECHERCHE, Institut Pasteur	Rapporteur
Corinne MERCIER PROFESSEURE DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes	Présidente
Sigolène LECUYER CHARGÉE DE RECHERCHE, CNRS délégation Rhône Auvergne	Examinatrice



Remerciements

J'aimerais d'abord remercier les rapporteurs Sarah Bigot et Christophe Beloin d'avoir accepté d'évaluer mon travail, ainsi que Sigolène Lecuyer pour participer à ce jury en tant qu'examinatrice et à Corinne Mercier d'avoir accepté de présider ce jury en plus d'avoir présidé mon CSI. Merci également à Andréa Dessen et Max Maurin d'avoir fait partie de mon CSI, vos conseils et suggestions m'ont aidée et encouragée à poursuivre ce projet.

Ina, merci de m'avoir fait confiance. Merci pour ton encadrement lors de ces trois années, tes conseils qui m'ont guidés pour l'avance de ce projet. Ta passion pour Pseudo et ton exigence m'ont poussé à dépasser mes limites et à poursuivre ce projet très challenging mais fascinant !

Viviana, merci pour m'avoir encadrée et intégrée au projet ExIA. Ta pédagogie et tes précieux conseils m'ont permis de me former aux techniques du laboratoire et m'ont permis de pouvoir travailler sur mon propre projet par la suite, ce qui n'aurait pas été possible sans toi. C'était un plaisir de travailler à tes côtés, ça me manque les mouches et *P. entomophila* ...

Merci à Stéphanie pour m'avoir formée à la culture cellulaire, à la microscopie et aux drosophiles. Merci pour tout le temps que tu m'as accordé et pour les nombreux conseils qui m'ont permis d'avancer.

Merci à Marie-Claire d'avoir pris le temps de corriger ce travail, tes conseils et tes remarques m'ont beaucoup aidée.

Merci également à Antoine pour ton aide et tes conseils tout au long de ce projet ainsi que la réalisation du modèle de PtdA, à Mylène pour ton aide quand j'en avais besoin et merci à Yvan pour m'avoir donné les outils nécessaires à ce projet et l'aide pour l'administration avec le CHU, votre aide m'a été précieuse.

Merci à l'ensemble de l'équipe PBRC pour leur accueil.

Merci aux jeunes de PBRC, Victor Aimé et Serena pour tous les bons moments passés avec vous au labo et en dehors.

Merci aux membres du bureau 369, Clara, Perrine et Séraphine pour votre accueil, merci pour nos discussions entre deux manips et pour toutes ces belles orchidées.

En particulier merci à mes compagnons de rédaction et de The Crew Victor et Clara pour votre soutien quotidien pendant cette période (dans le placard à thésards et ailleurs).

Merci à Arthur qui a participé au lancement du projet PtdA, merci pour ton aide et ta compagnie pendant les manips qui ont rendu ces tentatives de western blot moins tristes.

Merci à Loréline, ma super stagiaire avec qui j'ai eu le plaisir de travailler pendant 2 mois. Merci pour ton sérieux, ta curiosité, ta bonne humeur et tes BOUM (on aura quand même bien rigolé).

J'aimerai également remercier l'ensemble des personnes responsables des différentes plateformes, merci à Daphna Fenel qui a réalisé les expériences de microscopie électronique et Guy Shoen pour leurs conseils et leur aide, merci à Jean-Philippe Kleman pour la formation et les précieux conseils pour mes expériences de microscopie et merci à Aline Le Roy de m'avoir formée à la DLS et aidée lorsque j'en avais besoin.

Merci à GRAL qui a financé ce projet.

Merci à mes grands-parents, Nelly et Claude qui m'ont toujours aidée et soutenue depuis mon enfance.

Merci à mes parents, Gilles et Sophie qui ont toujours été là pour moi. Merci pour votre soutien, pour votre amour inconditionnel et pour m'avoir toujours encouragée. Merci de m'avoir aidée à décompresser pendant ces trois années de thèse, mais surtout d'avoir toujours été là pour rire et passer de supers moments avec moi depuis toujours.

Merci à mes frères Marius et Roméo pour tous les bons moments passés ensemble depuis qu'on est petits et pour vos memes quotidiens qui me font toujours rire.

Merci aussi à ma belle-famille pour m'avoir permis de m'aérer la tête pendant les sorties randos ou escalades près de Grenoble.

Merci également à toutes les personnes qui m'ont permis de décompresser le temps d'une soirée ou d'un week-end, merci à mes amis d'un peu partout.

Enfin, un immense merci à Marc. Je te dédie cette thèse car sans toi elle n'existerait tout simplement pas. Merci pour ta patience, de m'avoir toujours soutenue et encouragée, d'avoir toujours cru en moi. J'ai énormément de chance de t'avoir à mes côtés (oui, j'en profite parce que tu ne peux pas contester) et je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu m'apportes. Merci d'être là, merci d'être toi.

Abréviations

A. baumannii

ADN

ADPRT

Amp

ANOVA

ARN

B. pertussis

BCA

BLSE

BSA

cAMP

C. elegans

CDI

c-di-GMP

CdrA

CFTR

CFU

DLS

DMEM

DO₆₀₀

DOPC

DUF3739

E. coli

ELISA

ExIA

ExoS

ExoU

FC

GAP

GFP

Gm

Acinetobacter baumannii

Acide désoxyribonucléique

ADP ribosyltransferase

Ampicilline

Analyse de la variance

Acide ribonucléique

Bordetella pertussis

Bicinchoninic acid Assay

β-lactamases à spectre étendu

Bovine Serum Albumin ou albumine de sérum bovin

Cyclic adenosine monophosphate

Caenorhabditis elegans

Contact-Dependent-growth Inhibition

Cyclic Diguanosine Monophosphate

cyclic diguanylate-regulated TPS partner A

cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

Colony Forming Units

Dynamic Light Scattering

Dulbecco's Modified Eagle Medium

Densité optique à 600nm

1,2-dioleoyol-sn-glycero-3-phosphocholine

Domain of unknown function 3739

Escherichia coli

Enzyme-Linked Immuno Assay

Exolysine A

Exotoxine S

Exotoxine U

Fold Change

GTPase Activating Protein

Green Fluorescent Protein

Gentamicine

<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
HMW	High Molecular Weight
HRP	Peroxydase de raifort (Horseradish Peroxidase)
IgG	ImmunoGlobines G
IMAC	Chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés
IP	Iodure de Propidium
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Kan	Kanamycine
LB	Luria-Bertani Broth
MEB	Microscopie électronique à Balayage
MOI	Multiplicity Of Infection
MOPS	Acide 3-morpholino-1-propanesulfonique
MPOC	Maladie Pulmonaire Obstructive Chronique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Pbp2	Penicillin Biding Protein 2
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PdtA	Phosphate Depletion regulated TPS partner A
PdtB	Phosphate Depletion regulated TPS partner B
PFA	Paraformaldéhyde
PIA	<i>Pseudomonas</i> Isolation Agar
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
POTRA	Polypeptide Transport-Associated
QS	Quorum Sensing
RNAseq	Séquençage d'ARN
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SCFM2	Synthetic Cystic Fibrosis Medium 2
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SLIC	Sequence and Ligation Independent Cloning
SNP	Single nucleotide polymorphism

SST3

Système de sécrétion de type III

SVF

Sérum de Veau Fœtal

Tc

Tétracycline

TPS

Two Partner Secretion

Nom complet de l'acide aminé	Code à une lettre	Code à trois lettres
Alanine	A	Ala
Arginine	R	Arg
Asparagine	N	Asn
Aspartate	D	Asp
Cystéine	C	Cys
Glutamate	E	Glu
Glutamine	Q	Gln
Glycine	G	Gly
Histidine	H	His
Isoleucine	I	Ile
Leucine	L	Leu
Lysine	K	Lys
Méthionine	M	Met
Phénylalanine	F	Phe
Proline	P	Pro
Sérine	S	Ser
Thréonine	T	Thr
Tryptophane	W	Trp
Tyrosine	Y	Tyr
Valine	V	Val

Tableau 1. Liste des acides aminés ainsi que leur code à 1 lettre et à 3 lettres.

Table des matières

Remerciements.....	1
Abréviations.....	3
Table des matières.....	7
Liste des figures.....	11
Liste des tableaux.....	13
Introduction générale.....	15
I. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
I.1 Le genre <i>Pseudomonas</i>	17
I.2 Les infections à <i>P. aeruginosa</i>	18
a) Infections aiguës.....	20
i) Pneumonies.....	20
ii) Bactériémies.....	20
iii) Infections urinaires.....	21
iv) Autres infections.....	21
b) Infections chroniques.....	22
i) Mucoviscidose.....	22
ii) Autres infections.....	23
I.3 Un pathogène résistant aux antibiotiques	24
I.4 Phylogénie de <i>P. aeruginosa</i>	27
I.5 Facteurs de virulence	29
II. Mode de vie de <i>P. aeruginosa</i>	32
II.1 Vie planctonique	32
II.2 Biofilm	33
a) Définition et mécanisme de formation d'un biofilm.....	33
b) Quorum Sensing (QS).....	36
c) Régulation de la formation du biofilm.....	37
d) Stratégies anti-biofilm.....	38
II.3 Agrégats	40
a) Facteurs d'auto-agrégation.....	42
b) Régulation de l'auto-agrégation.....	44
c) Rôle de l'auto-agrégation.....	45

i)	Agrégats et biofilm	45
ii)	Protection contre le stress	46
iii)	Interactions hôte-pathogène	47
III.	Les systèmes de sécrétion à deux partenaires (TPS)	48
III.1	Mécanisme de sécrétion du système de sécrétion à deux partenaires	48
III.2	Caractéristiques des protéines TpsB	53
III.3	Caractéristiques des protéines TpsA	57
III.4	Différentes familles de TpsA	58
a)	Cytolysine/hémolysine	58
b)	Inhibition de croissance due au contact (CDI)	59
c)	Adhésines	61
d)	Autres TPS	64
V.	Objectifs de la thèse	64
Résultats		67
Partie 1 : Rôle de PdtA dans la biologie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		69
I.	Introduction	69
II.	Définition d'une souche modèle PdtA+	72
II.1	Production et validation des anticorps dirigés contre PdtA	72
a)	Production des anticorps polyclonaux de lapin	72
b)	Production de fragments de PdtA dans <i>E. coli</i>	73
c)	Validation des anticorps polyclonaux anti-PdtA	75
II.2	Identification de souches cliniques produisant PdtA de façon constitutive .	75
II.3	Caractérisation génomique et phénotypique des souches cliniques PdtA+ .	76
a)	Les souches PdtA+ appartiennent aux différents clades phylogénétiques de <i>P. aeruginosa</i>	76
b)	Mesure de la cytotoxicité des souches PdtA+	84
c)	Etude de la motilité de <i>P. aeruginosa</i> exprimant PdtA	85
II.4	Production de PdtA au cours de la croissance de <i>P. aeruginosa</i>	89
III.	PdtA est associée aux membranes	90
IV.	Analyse phénotypique	93
IV.1	Adhésion aux cellules eucaryotes	94
IV.2	Auto-agrégation des bactéries produisant PdtA	97
a)	Milieu SCFM2	97
b)	Observation des agrégats par microscopie	98

c) Mise au point d'un protocole pour quantifier les agrégats.....	100
d) Dynamic Light Scattering (DLS).....	103
IV.3. Etude de la formation de biofilms.....	105
IV.4 Cytotoxicité	106
IV.5 Analyse transcriptomique.....	109
V. Etude préliminaire de la structure de PdtA	113
VI. Présence d'anticorps anti-PdtA dans les sérums de patients	115
V.1 Mise en place d'un ELISA permettant la détection d'anticorps anti-PdtA ...	116
V.2 Criblage de sérums de patients.....	117
V.3 Immunofluorescence avec certains sérums sélectionnés.....	121
VII. Conclusion	122
Partie 2 : Etude de protéines ExIA-like chez différentes espèces de <i>Pseudomonas</i>.....	125
I. Introduction.....	125
II. Publication	126
III. Résultats complémentaires	155
IV. Conclusion	157
Discussion générale.....	161
Partie 1 : Rôle de PdtA dans la biologie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	163
Partie II : Etude de protéines ExIA-like chez différentes espèces de <i>Pseudomonas</i>.....	169
Matériel & Méthodes	173
Bibliographie.....	199
Annexes	229

Liste des figures

Figure 1. Différentes niches environnementales et fonctions de plusieurs espèces du genre <i>Pseudomonas</i> .	18
Figure 2. Schéma représentant différents sites d'infections de <i>P. aeruginosa</i> .	19
Figure 3. Prévalence des pathogènes respiratoires responsables d'infection chronique en fonction de l'âge des patients ayant la mucoviscidose.	23
Figure 4. Carte représentant le pourcentage des souches de <i>P. aeruginosa</i> résistantes aux carbapénèmes selon les pays d'Europe en 2020.	26
Figure 5. Mortalité due aux différents pathogènes à cause de l'antibiorésistance.	27
Figure 6. Phylogénie de l'espèce <i>P. aeruginosa</i> .	28
Figure 7. Schéma du flagelle et du pilus.	30
Figure 8. Schéma des deux modèles de la formation de biofilm.	35
Figure 9. Formation de biofilm.	38
Figure 10. Agrégats de <i>P. aeruginosa</i> visualisés par microscopie électronique à balayage (MEB).	41
Figure 11. Mécanisme d'interactions homotypiques d'auto-agglutinines.	43
Figure 12. Système de sécrétion de type V.	48
Figure 13. Structure de la partie C-terminale de HiA.	50
Figure 14. Mécanisme du système de sécrétion à deux partenaires (TPS).	53
Figure 15. Structure du complexe BAM. (Iadanza et al, 2020).	54
Figure 16. Structure de FhaC.	56
Figure 17. TPS identifiés chez <i>P. aeruginosa</i> .	57
Figure 18. Mécanisme des systèmes CDI.	60
Figure 19. Structure de CdrA.	63
Figure 20. Domaines identifiés dans PdtA.	69
Figure 21. Organisation génétique des gènes <i>pdtA</i> et <i>pdtB</i> .	70
Figure 22. Régulation de PdtA par les systèmes BfmRS, PhoBR et VreAIR.	71
Figure 23. Représentation de PdtA.	73
Figure 24. Validation des anticorps polyclonaux contre PdtA.	74
Figure 25. Production de PdtA dans 46 souches cliniques et trois souches de référence PAO1, PA14 et PA7.	76
Figure 26. Détermination du clade des souches PdtA ⁺ .	79
Figure 27. Comparaison du promoteur de <i>pdtA</i> dans les souches cliniques et les souches de références.	80
Figure 28. Matrice des SNP identifiés dans les séquences de <i>vreI</i> .	81
Figure 29. Matrice des SNP identifiés dans les séquences de <i>phoB</i> .	81
Figure 30. Comparaison des protéines PdtA des différentes souches cliniques.	83
Figure 31. Cytotoxicité des souches cliniques PdtA ⁺ .	85
Figure 32. Présence et fonction du flagelle et du pilus des souches cliniques PdtA ⁺ .	87
Figure 33. Alignement et conservation des séquences protéiques de PilA dans les trois souches de référence.	88
Figure 34. Production de PdtA au cours de la croissance de trois souches cliniques.	90
Figure 35. Visualisation de PdtA à la surface des bactéries par immunofluorescence.	92
Figure 36. Croissance des souches <i>PaG30</i> et <i>PaG30ΔpdtA</i> en milieu LB.	93
Figure 37. Test d'adhésion aux cellules eucaryotes.	96

Figure 38. Croissance et production de PdtA dans le milieu SCMF2.	98
Figure 39. Observation des agrégats médiés par PdtA par microscopie.	99
Figure 40. Protocole mis au point pour mesurer le pourcentage de bactéries agrégées.....	101
Figure 41. Quantification des agrégats en milieu LB et SCFM2.	102
Figure 42. Analyse de la taille des bactéries dans les cultures bactériennes de <i>PaG30</i> et <i>PaG30ΔpdtA</i> par diffusion dynamique de la lumière.	104
Figure 43. Quantification du biofilm à la surface air-liquide.	106
Figure 44. Implication de PdtA dans la cytotoxicité.....	108
Figure 45. Expression différentielle des gènes des bactéries agrégées ou non agrégées..	110
Figure 46. Visualisation par microscopie électronique et modélisation de PdtA.	114
Figure 47. Mise en place d'un ELISA pour détecter des anticorps anti-PdtA.	117
Figure 48. Criblage de sérums de patients.....	118
Figure 49. ELISA des sérums de patients infectés par <i>P. aeruginosa</i> contre PdtA ^{CTD} et Pbp2.	120
Figure 50. Immunofluorescence avec les anticorps anti-PdtA isolés dans le sérum 11.	121
Figure 51. Mécanisme d'action de la protéine ExIA.	125
Figure 52. Cytotoxicité de <i>P. entomophila</i> sur les macrophages S2 de drosophiles.	156
Figure 53. Comparaison des protéines ExIA-like dans différents backgrounds génétiques.	157
Figure 54. Mécanisme d'assemblage de deux protéines Ag43.....	167
Figure 55. Schéma représentant le fonctionnement de la SLIC.....	178
Figure 56. Principe de la délétion d'un gène par double recombinaison homologue.	180

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste des acides aminés et code à 1 lettre et à 3 lettres.....	6
Tableau 2. Prévalence de <i>P. aeruginosa</i> selon les prélèvements réalisés à l'hôpital.	19
Tableau 3. Prévalence et rang de <i>P. aeruginosa</i> dans les infections hospitalières	20
Tableau 4. Exemple d'adhésines impliquées dans l'auto-agrégation décrites dans la littérature.....	42
Tableau 5. Liste des peptides utilisés pour la production d'anticorps anti-PdtA.....	73
Tableau 6. Caractéristique des génomes séquencés.....	77
Tableau 7. Récapitulatif des caractéristiques testées des 9 souches PdtA ⁺	89
Tableau 8. Gènes exprimés différemment entre les bactéries <i>PaG30</i> agrégées VS <i>PaG30ΔpdtA</i>	111
Tableau 9. Liste des souches utilisées lors du projet.....	177
Tableau 10. Liste des antibiotiques et des concentrations utilisées selon l'organisme.....	177
Tableau 11. Liste des primers.....	181
Tableau 12. Liste des plasmides.....	182
Tableau 13. Liste des anticorps utilisés et la concentration utilisée en fonction du type d'expérience.....	187
Tableau 14. Composition des milieux pour les tests de « swimming » et de « twitching »..	189
Tableau 15. Liste des produits utilisés pour le milieu SCFM2 et leur concentration.....	193

Introduction générale

- I. *Pseudomonas aeruginosa*
- II. Mode de vie de *P. aeruginosa*
- III. Les systèmes de sécrétion à deux partenaires
- IV. Objectifs de la thèse

I. *Pseudomonas aeruginosa*

I.1 Le genre *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* regroupe plusieurs organismes largement répandus dans l'environnement avec une prédilection pour les zones humides. Ces bactéries sont capables d'infecter de nombreux hôtes comme par exemple les plantes, les insectes et les mammifères dont l'homme (**Figure 1**) (Scales et al., 2014). Plusieurs espèces environnementales sont utilisées dans l'industrie, comme *Pseudomonas putida* qui est étudiée pour ses propriétés de bio-remédiation, notamment pour la restauration de sites contaminés par des métaux lourds grâce à ses propriétés d'oxydation de certains métaux (X. Wu et al., 2011) ainsi que pour les métabolites secondaires qu'elle produit comme les polyhydroxyalcanoates (PHA) à chaîne moyenne qui ont des propriétés intéressantes et pourraient être une alternative biodégradable aux polymères actuellement utilisés dans l'industrie biotechnologique (Loeschcke and Thies, 2015). De plus, certaines espèces de *Pseudomonas* comme *P. putida* et *Pseudomonas fluorescens* favorisent la croissance des plantes, en éliminant des micro-organismes pathogènes pour les plantes mais aussi en synthétisant des hormones qui stimulent la croissance des plantes comme l'acide indole-3-acétique qui est une phytohormone (X. Wu et al., 2011) et par la production de composés organiques volatiles, comme le 2-butanone par exemple qui est produit par la souche SS101 de *P. fluorescens* (Park et al., 2015).

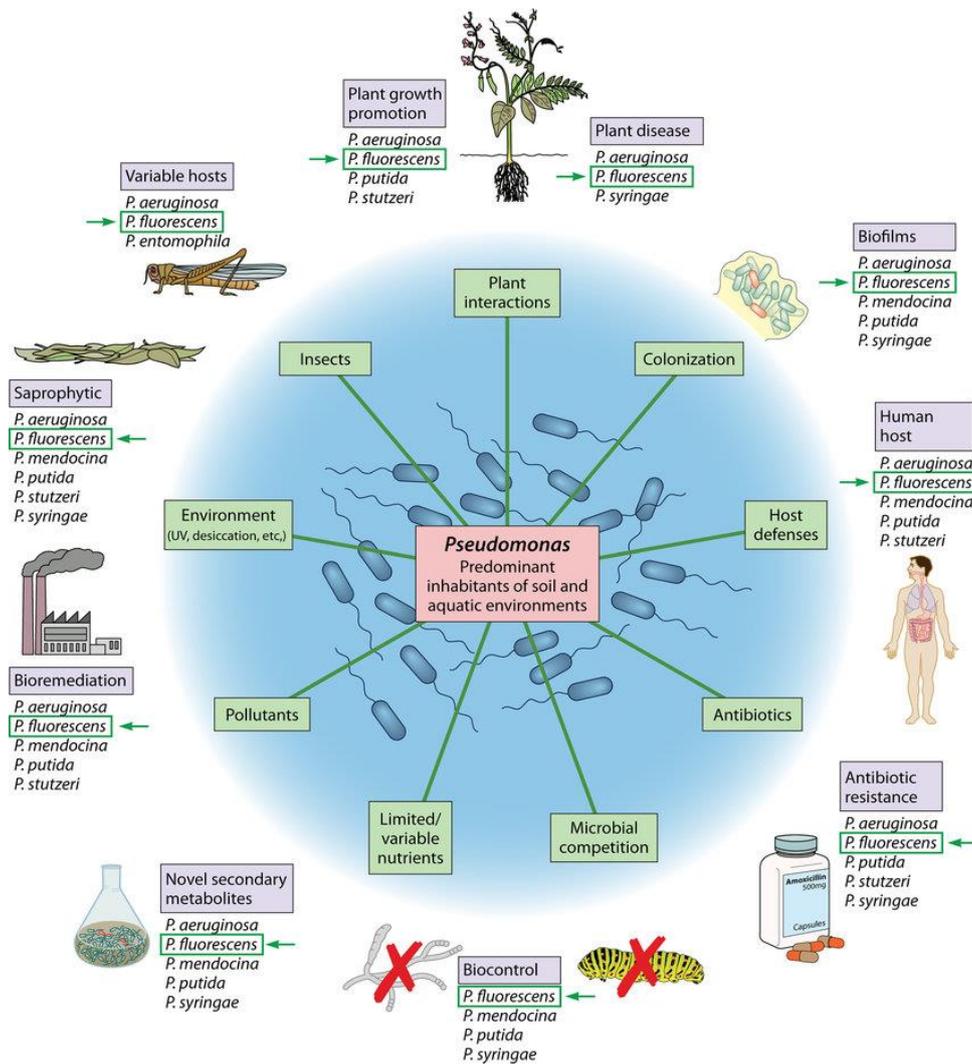


Figure 1. Différentes niches environnementales et fonctions de plusieurs espèces du genre *Pseudomonas*. (Scales et al., 2014).

Les techniques de séquençage de génomes entiers étant de plus en plus accessibles, les études phylogénétiques sont plus précises et permettent désormais de différencier plusieurs sous-espèces de *Pseudomonas*. Le nombre d'espèces évolue donc constamment : en 2015, 144 espèces étaient reconnues (Gomila et al., 2015) contre 259 espèces en 2021 (Girard et al., 2021). Parmi elles, 25 espèces sont associées aux humains mais la plupart des infections liées à des *Pseudomonas* sont dues à *Pseudomonas aeruginosa*.

1.2 Les infections à *P. aeruginosa*

P. aeruginosa est une bactérie ubiquitaire dans l'environnement. C'est un pathogène opportuniste qui infecte très peu les individus sains mais peut provoquer des infections chez les patients affaiblis, notamment chez les patients hospitalisés. C'est le 4^{ème} pathogène le plus fréquent responsable d'infections nosocomiales en 2018, responsable de 7,7% des infections

nosocomiales (Mission Spares, 2018). *P. aeruginosa* est capable de provoquer des infections chez les patients immunodéprimés comme les patients ayant le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) ou ayant un cancer. Lorsque les barrières cutanées sont fragilisées, comme chez les grands brûlés par exemple, *P. aeruginosa* peut également provoquer une infection. Elle peut aussi se développer sur les cathéters et les sondes utilisées à l'hôpital. Enfin, elle peut persister chez l'hôte et provoquer des infections chroniques, notamment dans les voies respiratoires des patients atteints de la mucoviscidose. C'est pourquoi on retrouve *P. aeruginosa* dans tous les types de prélèvements réalisés à l'hôpital, démontrant la capacité de *P. aeruginosa* à infecter plusieurs sites (Tableau 2).

	Pourcentage d'infection causées par <i>P. aeruginosa</i>	Rang de <i>P. aeruginosa</i>
Hémoculture	6%	6 ^{ème}
Dispositif intravasculaire	15.1%	3 ^{ème}
Urine	4.8%	5 ^{ème}
Prélèvement respiratoire	25.9%	2 ^{ème}

Tableau 2. Prévalence de *P. aeruginosa* selon les prélèvements réalisés à l'hôpital.

Le pourcentage de *P. aeruginosa* parmi les différents pathogènes retrouvés dans les différents types de prélèvements est indiqué, ainsi que le rang de *P. aeruginosa*. Source : Santé publique France surveillance de l'antibiorésistance en Etablissement de santé (données 2018).

P. aeruginosa est donc capable de provoquer plusieurs types d'infections, aiguës comme chroniques et dans divers sites d'infections. Ces différents types d'infections seront développés dans la suite de cette partie, et sont schématisés dans la **figure 2**.

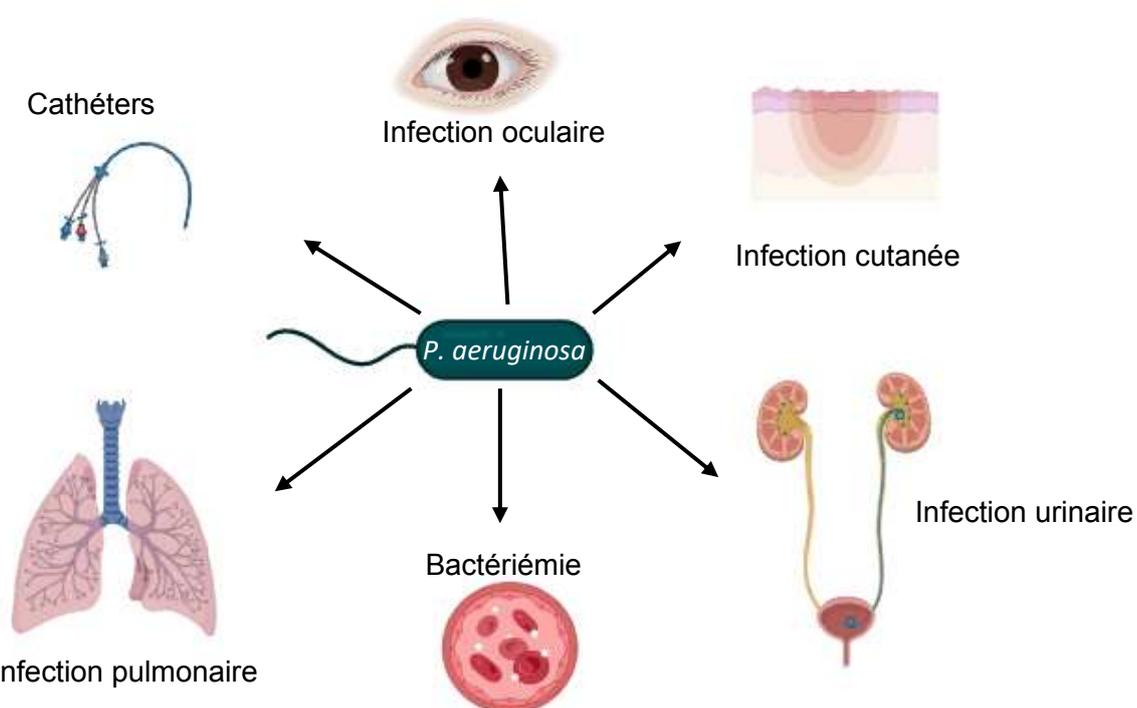


Figure 2. Schéma représentant différents sites d'infections de *P. aeruginosa*.

a) Infections aiguës

Ce sont des infections brèves et associées à des symptômes sévères. *P. aeruginosa* est le deuxième pathogène le plus fréquent responsable des pneumonies acquises à l'hôpital derrière *Staphylococcus aureus* (**Tableau 3**). Il est également le deuxième pathogène le plus fréquemment retrouvé lors des infections nosocomiales de la peau, parmi l'ensemble des pathogènes responsables de ces infections.

Type d'infection	Pourcentage	Rang de <i>P. aeruginosa</i>
Pneumonies	13.94%	2 ^{ème}
Infection urinaire	4.62%	5 ^{ème}
Infection de la peau	9.29%	2 ^{ème}
Bactériémie	4.78%	5 ^{ème}

Tableau 3. Prévalence et rang de *P. aeruginosa* dans les infections hospitalières (Santé publique France, 2017)

Les infections nosocomiales dues à *P. aeruginosa* les plus fréquentes parmi l'ensemble des infections provoquées par *P. aeruginosa* sont des infections urinaires et des pneumonies, qui comptent pour 24,55% et 23,29% respectivement des infections nosocomiales causées par *P. aeruginosa* (Santé publique France, 2017).

i) Pneumonies

Les pneumonies associées à *P. aeruginosa* sont principalement acquises à l'hôpital et rarement dans la communauté. En effet, une étude internationale de 2018 a montré que 4,2% des pneumonies acquises dans la communauté sont dues à une infection à *P. aeruginosa*, contre 13,9% dans les hôpitaux (**Tableau 3**). La prévalence de *P. aeruginosa* dans les pneumonies acquises dans la communauté est la même sur l'ensemble des continents. Plusieurs facteurs de risques ont été identifiés comme une colonisation antérieure par la bactérie, une trachéotomie, une bronchectasie, une assistance respiratoire invasive et une maladie pulmonaire obstructive chronique sévère (Restrepo et al., 2018). De plus, les patients ayant ces facteurs de risques ont plus de probabilité d'être infectés par une bactérie résistante aux antibiotiques. Les pneumonies associées à *P. aeruginosa* acquises à l'hôpital sont souvent associées à une ventilation mécanique dans les unités de soins intensifs et ont un taux de mortalité élevé allant de 32% à 42,8% (Fujitani et al., 2011).

ii) Bactériémies

P. aeruginosa est capable de traverser les barrières épithéliales et endothéliales et atteindre la circulation sanguine (Pont et al., 2022), ce qui est alors appelé une bactériémie. La plupart

du temps, le pathogène est rapidement éliminé de la circulation sanguine, mais il peut persister. Si l'infection persiste on parle alors de septicémie. Le taux de mortalité associé à une septicémie à *P. aeruginosa* a été évaluée à 30% après 30 jours d'infection. Ce taux est supérieur au taux de mortalité associé aux infections du sang par les autres bactéries Gram-négatives ou par *S. aureus* (Ioannou et al., 2023).

Plusieurs facteurs de risque de développer une septicémie à *P. aeruginosa* ont été identifiés : la prise récente d'antibiotique, une hospitalisation récente, une immunodéficience ou encore la présence d'un cathéter intraveineux ou urinaire. Le site d'entrée de *P. aeruginosa* dans le sang peut être soit un premier site d'infection, soit l'introduction d'un dispositif médical donnant directement l'accès au sang. La majorité des bactériémies sont consécutives à une infection pulmonaire (Dambrauskiene et al., 2009).

iii) Infections urinaires

Les infections urinaires acquises en établissement de santé sont les infections nosocomiales les plus répandues, représentant entre 20% et 49% des infections nosocomiales, et 7 à 10% de ces infections sont dues à *P. aeruginosa*. Une infection urinaire à *P. aeruginosa* est associée à un haut taux de mortalité, allant de 18% pour une infection de 30 jours et augmentant jusqu'à 34% pour une infection qui dure 90 jours. Les patients ayant d'autres maladies comme une maladie du foie chronique ont un taux de mortalité plus élevé. De même, lorsque le traitement antibiotique n'est pas adapté à la souche, le taux de mortalité est plus élevé (Lamas Ferreira et al., 2017).

iv) Autres infections

Les kératites sont une inflammation de la cornée qui, dans les cas sévères, peuvent conduire à une perte partielle ou totale de la vue. La cause peut être un traumatisme à la suite de l'exposition à un agent chimique ou aux UV par exemple, ou microbiologique. Pour ce dernier cas, certains facteurs de risques ont été identifiés, comme le port de lentille de contact ou une opération oculaire précédant la kératite (Green et al., 2008). Parmi les kératites chez les patients ayant des lentilles de contact, *P. aeruginosa* est le pathogène le plus fréquent et est à l'origine de la plupart des cas graves qui peuvent menacer la qualité de la vision du patient (Hebert et al., 2020). La plupart des dommages lors des kératites bactériennes sont dus à la stimulation trop importante du système immunitaire (Hilliam et al., 2020). *P. aeruginosa* peut également provoquer des infections cutanées, notamment chez les grands brûlés qui ont leurs barrières endothéliales et épithéliales fragilisées. *P. aeruginosa* est l'un des pathogènes les plus fréquemment associés à ce type d'infections (D. C. Wu et al., 2011).

Si les infections aiguës ne sont pas traitées correctement ou si elles sont traitées trop tardivement, elles peuvent devenir chroniques.

b) Infections chroniques

i) Mucoviscidose

La mucoviscidose est la maladie génétique rare la plus fréquente en France. En 2020, 7000 personnes avaient cette maladie et elle concerne 1 naissance sur 45000 en France. Dans les années 1960, l'espérance de vie des personnes atteintes de la mucoviscidose était de 5 ans. Grâce aux progrès thérapeutiques, elle est aujourd'hui de 50 ans. Cette maladie touche principalement les poumons, mais aussi le système digestif et reproducteur.

La mucoviscidose est due à une modification du gène *cftr* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). La protéine codée par ce gène est un transporteur membranaire qui forme un canal permettant l'échange d'ions chlorures entre la cellule et le milieu extracellulaire. Elle fait partie de la famille des transporteurs ABC (ATP binding cassette), qui hydrolysent l'ATP pour fournir l'énergie nécessaire au transport de leur substrat (Cheung et al., 2008). Elle est présente dans les cellules des différentes muqueuses, notamment respiratoires et digestives. Lorsque le gène est muté, le canal dysfonctionne et les ions chlorures ne sont plus transportés correctement (Rich et al., 1990), et sont bloqués dans la cellule. Cela provoque l'augmentation de la viscosité du mucus et de son épaisseur. Ce mucus épais encombre les bronches, ce qui provoque une toux chronique et sur le long terme une insuffisance respiratoire. De plus, cela empêche la clairance muco-ciliaire, qui permet normalement aux voies respiratoires d'expulser les particules et les pathogènes inhalés (Hill et al., 2018; Wine et al., 2018). Les poumons des patients atteints de la mucoviscidose constituent un milieu riche et propice à l'établissement d'infections bactériennes (Allen et al., 2020) : en effet, en plus de la clairance muco-ciliaire qui est affectée, d'autres facteurs sont modifiés dans les voies respiratoires. Le monoxyde d'azote, qui est un antibactérien, est produit en plus faible quantité, et les cellules épithéliales des voies respiratoires présentent plus de sites de liaisons pour les bactéries. Cela explique que les bactéries entrent et s'installent plus facilement dans les voies respiratoires de ces patients. Les bactéries ont une capacité d'adaptation à cet environnement, en formant notamment des biofilms, ce qui explique la persistance et la chronicité des infections (Chmiel and Davis, 2003).

Les principaux pathogènes infectant les patients atteints de la mucoviscidose sont *S. aureus* et *P. aeruginosa*, qui peuvent coexister. Les infections chroniques provoquent une inflammation et une dégradation des tissus des voies respiratoires, déjà endommagés.

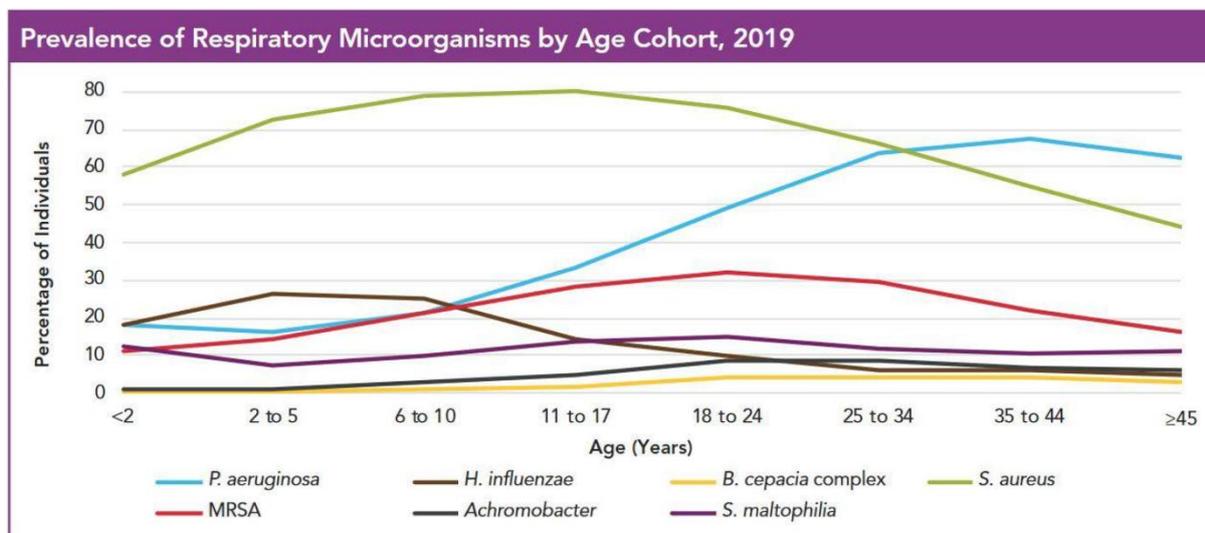


Figure 3. Prévalence des pathogènes respiratoires responsables d'infection chronique en fonction de l'âge des patients ayant la mucoviscidose.

P. aeruginosa est le pathogène le plus fréquent chez les adultes de plus de 35 ans, les patients plus jeunes sont plus souvent infectés par *S. aureus* (Manos, 2021).

P. aeruginosa est le principal pathogène responsable des infections chroniques chez les adultes atteints de la mucoviscidose (**Figure 3**) puisqu'il concerne jusqu'à 60% à 70% de ces patients (Crull et al., 2018). Les bactéries peuvent être éliminées lorsqu'elles sont traitées au début de l'infection mais il devient très difficile de les éradiquer une fois qu'elles se sont implantées sous forme de biofilm, comme ce sera décrit dans la deuxième partie de l'introduction.

Une infection chronique à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose augmente le risque de mortalité. Une étude a montré que le risque de mortalité double pour les patients ayant une infection à *P. aeruginosa* et est multiplié par 8 lorsque la souche est résistante aux antibiotiques (Durda-Masny et al., 2021).

ii) Autres infections

Une infection chronique à *P. aeruginosa* est également associée à d'autres pathologies, notamment pulmonaires, comme la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC). Cette maladie provoque une inflammation chronique du poumon, ce qui peut provoquer plusieurs symptômes dont une toux chronique et la production de mucus. Environ 10% des patients atteints de la MPOC ont une infection chronique à *P. aeruginosa*, et les patients ayant été exposés aux antibiotiques sont plus à risque de développer une infection chronique (Gallego et al., 2014).

P. aeruginosa est également capable de provoquer des infections urinaires chroniques en formant des biofilms sur les cathéters (Cole et al., 2014). Chez les personnes diabétiques ayant des plaies chroniques, *P. aeruginosa* ainsi que d'autres pathogènes comme *S. aureus* peuvent provoquer une infection chronique robuste et persistante, ce qui crée des lésions supplémentaires au niveau de la plaie (Goldufsky et al., 2015). *P. aeruginosa* est également l'un des pathogènes les plus fréquemment retrouvés dans des otites moyennes suppurées chroniques (Mansoor et al., 2009).

P. aeruginosa est donc capable d'infecter de nombreux sites et peut provoquer des infections rapides et sévères mais aussi persister et provoquer des infections chroniques, difficiles à traiter. De plus, ce pathogène est résistant à de nombreux antibiotiques, ce qui constitue une menace pour la santé humaine.

I.3 Un pathogène résistant aux antibiotiques

Les isolats cliniques de *P. aeruginosa* montrent une résistance aux différentes classes d'antibiotiques. On distingue trois types de mécanismes de résistance :

1) Résistance intrinsèque

P. aeruginosa est résistante naturellement à plusieurs antibiotiques, dont les aminoglycosides, les fluoroquinolones et les β -lactamines, grâce à sa membrane externe faiblement perméable, ce qui empêche l'entrée des antibiotiques. La présence de pompes à efflux tripartite permet à la bactérie d'expulser les antibiotiques. *P. aeruginosa* possède plusieurs systèmes de pompe à efflux, dont les pompes MexXY-OprM, MexAB-OprM, MexCD-OprJ et MexEF-OprN, qui sont codées par des gènes du « core génome » (Valot et al., 2015). Ces pompes à efflux sont composées de trois protéines : une protéine adaptatrice périplasmique, tel que MexX, un transporteur de résistance-nodulation-division cellulaire tel que MexY et un facteur de membrane externe formant un canal comme OprM en prenant le système MexXY-OprM comme exemple. MexX forme un complexe avec MexY, associé à la membrane interne. Ensemble, ces protéines forment un canal transpériplasmique et permettent de capturer des substrats dans le cytoplasme ou le périplasme et de les expulser (Lorusso et al., 2022). Enfin, *P. aeruginosa* produit des enzymes capables d'inactiver certains antibiotiques, comme la β -lactamase AmpC codée par un gène du « core genome » de *P. aeruginosa* (Valot et al., 2015).

2) Résistance acquise

D'autres mécanismes de résistance peuvent être acquis par transfert horizontal de gènes de résistance ou par des mutations, permettant à *P. aeruginosa* de résister à d'autres classes

d'antibiotiques. En particulier la prolifération de plasmides permettant la production de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) (Farshadzadeh et al., 2014) et de métallob- β -lactamases capables d'inactiver les carbapénèmes est très préoccupante (Hong et al., 2015). Les carbapénèmes font partie de la famille des β -lactames, à spectre très large et résistantes à la plupart des β -lactamases. Ainsi, lorsqu'une bactérie devient résistante aux carbapénèmes, les options de traitement sont très limitées. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a classé les souches de *P. aeruginosa* résistantes aux carbapénèmes deuxièmes sur sa liste de priorité critique des pathogènes contre lesquels il est urgent de développer de nouveaux traitements (Organization, 2019).

3) Résistance adaptative

P. aeruginosa a également la capacité de s'adapter à la présence d'antibiotiques. La formation de biofilms est un exemple de résistance adaptative (Breidenstein et al., 2011), comme nous le verrons dans la deuxième partie de l'introduction.

En 2020, 7,6% des 8 367 souches de *P. aeruginosa* isolées en Europe étaient résistantes à au moins trois classes d'antibiotiques et 3,1% étaient résistantes aux aminosides, carbapénèmes, céphalosporines, fluoroquinolones et pénicillines (WHO Regional Office for Europe; 2022). Comme le montre la **figure 4**, la proportion de souches résistantes aux carbapénèmes varie beaucoup d'un pays à l'autre, allant de moins de 5% à plus de 50%.



Figure 4. Carte représentant le pourcentage des souches de *P. aeruginosa* résistantes aux carbapénèmes selon les pays d'Europe en 2020.

Au Danemark, Finlande, Pays-Bas et Suède, moins de 5% des souches isolées étaient résistantes aux carbapénèmes. 6 pays ont recensé plus de 50% de souches résistantes (Bélarus, Bosnie-Herzégovine, Monténégro, Moldavie, Serbie et Ukraine). Source : WHO Regional Office for Europe; 2022.

Cette résistance à de nombreux antibiotiques est déjà responsable de nombreux décès dans le monde. On estime que 4,95 millions de personnes infectées par une bactérie résistante aux antibiotiques sont décédées en 2019 et parmi les décès, $\frac{1}{4}$ est directement attribuable à cette résistance. *P. aeruginosa* fait partie des 6 pathogènes majeurs responsables de décès à cause de leur résistance aux antibiotiques en 2019, avec *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* et *Acinetobacter baumannii* (Figure 5). Ces 6 pathogènes sont responsables d'environ $\frac{3}{4}$ des décès associés à l'antibiorésistance (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022).

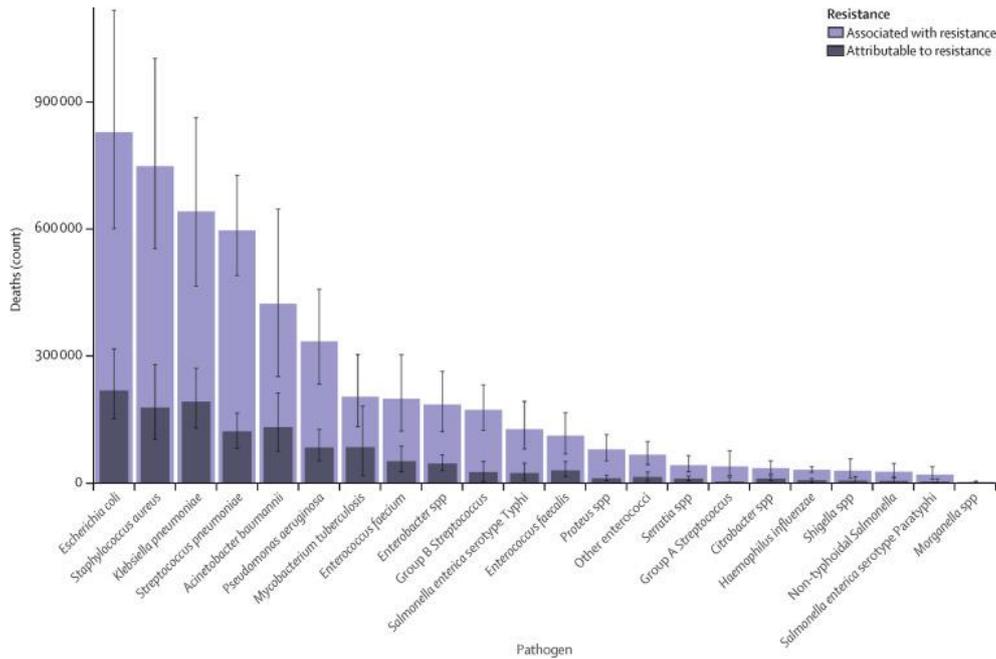


Figure 5. Mortalité due aux différents pathogènes à cause de l'antibiorésistance. (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022).

I.4 Phylogénie de *P. aeruginosa*

Le génome de *P. aeruginosa* est l'un des plus grands du monde bactérien, allant de 5,5 à 7Mpb (Subedi et al., 2018). En comparaison, *S. aureus* a un génome d'environ 2,8Mpb et *E. coli* d'environ 5Mpb. *P. aeruginosa* possède un grand génome accessoire, ce qui explique la variation de la taille du génome d'une souche à l'autre. Le génome accessoire est composé des gènes qui sont présents chez certaines souches, mais pas toutes (Kung et al., 2010). En effet, seul 1% des gènes du pangénome de *P. aeruginosa* font partie du « core génome », défini par les gènes présents dans toutes les souches de l'espèce *P. aeruginosa* (Freschi et al., 2019). Le génome de *P. aeruginosa* comporte de nombreux gènes impliqués dans la régulation de l'expression des gènes, permettant à cette bactérie de s'adapter à de nombreuses conditions et de survivre dans différents environnements (Galán-Vásquez et al., 2011). En effet, les gènes impliqués dans la régulation représentent 12% de la totalité des gènes de *P. aeruginosa*. Ils forment des réseaux de régulation, impliqués dans des processus biologiques importants comme la formation de biofilm, la production de certains facteurs de virulence et le Quorum Sensing (QS) entre autres.

Les souches de *P. aeruginosa* appartiennent à 5 clades phylogénétiques, ce qui montre la diversité génétique de cette espèce (Figure 6). Les groupes 1 et 2 sont majoritaires puisqu'ils représentent à eux deux 98% des isolats séquencés. Il y a de nombreuses différences entre chaque clade, dont le facteur de virulence majeur employé par la bactérie pour sa

pathogénicité. Les souches des clades 1 et 2 possèdent toutes les gènes codant pour le système de sécrétion de type III (SST3). Cependant, les deux clades se distinguent par la présence d'un gène codant pour une exotoxine spécifique à chaque clade : *exoS* pour le clade 1 et *exoU* pour le clade 2. Les souches du clade 3 sont très différentes des autres, la souche de référence PA7 ne partage que 93,5% d'identité moyenne des nucléotides (ANI pour Average Nucleotide Identity en anglais) avec les autres souches (Roy et al., 2010). PA7 ainsi que les autres souches du clade 3 n'ont pas le locus codant pour le SST3. Elles possèdent un facteur de virulence, ExlA, qui n'est pas présent dans les clades 1 et 2 (Elsen et al., 2014). Cette toxine est sécrétée par le système de sécrétion à deux partenaires (système TPS pour Two-Partner Secretion en anglais) qui sera décrit dans le troisième chapitre de cette introduction. Les clades 4 et 5 ont une position intermédiaire entre les clades 1 et 2 et le clade 3. L'année dernière, le clade 3 a été reconnu comme une espèce à part, appelée *Pseudomonas paraeruginosa* (Rudra et al., 2022).

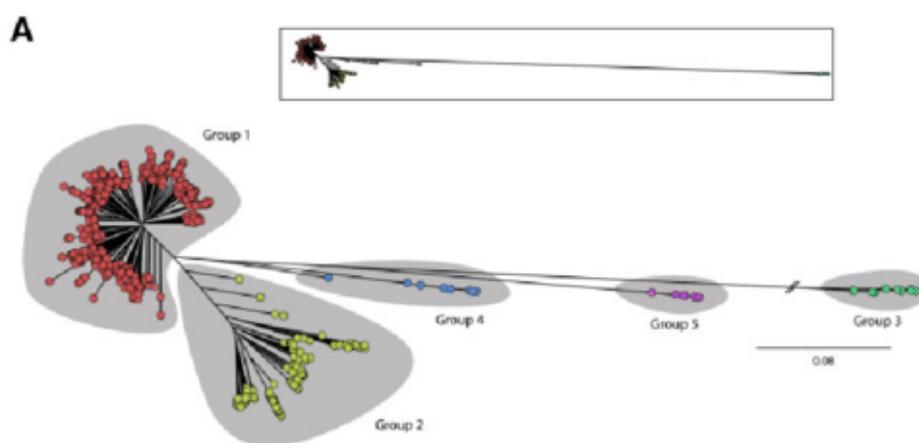


Figure 6. Phylogénie de l'espèce *P. aeruginosa*.

Le cadre montre les distances réelles entre les différents clades. Dans l'arbre présenté, la branche du clade 3 a été coupée afin de pouvoir visualiser les différents clades. Les souches sont réparties en 5 clades, avec la majorité des souches appartenant aux clades 1 et 2. (Freschi et al., 2019).

D'autres différences existent entre les clades 1 et 2 et le clade 3. Un système de sécrétion de type II hypothétique (PA2672-2677) présent dans les souches du clade de PAO1 (la souche de référence du clade 1) est absent du génome de PA7 (la souche de référence du clade 3). En revanche, PA7 possède un autre système de sécrétion de type II qui n'est pas présent dans PAO1 (Roy et al., 2010), nommé Txc (Cadoret et al., 2014). Un autre facteur de virulence a été identifié dans le génome de PA7, qui est absent du génome de PAO1 et PA14 (la souche de référence du clade 2) : la protéine PumA. Cette protéine a un domaine TIR (Toll Interleukin Receptor domain) et empêche la signalisation des cytokines et des récepteurs TLR, ce qui

permet à la bactérie d'échapper à la défense immunitaire innée (Imbert et al., 2017). Une autre différence entre le clade 3 et les clades 1 et 2 est le système de pompe à efflux MexXY/OprM. En effet, dans les souches du clade de PA7 il a été montré que MexXY interagissait avec OprA plutôt qu'avec OprM afin d'expulser certains antibiotiques (Singh et al., 2020). La protéine OprA est absente de la plupart des souches de *P. aeruginosa*, elle est spécifique des souches du clade 3 (Morita et al., 2012).

I.5 Facteurs de virulence

P. aeruginosa possède un arsenal de facteurs de virulence qui lui permet d'infecter et de coloniser son hôte, incluant différents appendices extracellulaires, plusieurs systèmes de sécrétion et des exopolysaccharides.

a) Appendices

P. aeruginosa possède des appendices à sa surface qui lui permettent de se déplacer : un unique flagelle polaire, qui lui permet de nager dans les milieux liquides (Berg, 2003), et des pili de type IV qui lui permettent de se déplacer sur une surface solide. Ce mouvement, appelé « twitching » en anglais est dû à l'extension, la fixation puis la rétraction des pili de type IV (Skerker and Berg, 2001; Talà et al., 2019). *P. aeruginosa* peut également se déplacer sur une surface semi-solide. Ce mouvement est appelé « swarming » en anglais, et correspond au déplacement des bactéries sur des surfaces semi-solides comme une gélose contenant de 0.5 à 0.7% d'agarose. Il se produit lorsqu'il y a une limitation en nitrogène et dépend de la présence de certains acides aminés. Le « swarming » nécessite la production à la fois du flagelle et des pili de type IV (Köhler et al., 2000).

Le flagelle est composé de plusieurs protéines, qui composent différentes parties du flagelle. Une première partie est ancrée dans la membrane, et est responsable de la rotation du flagelle. Ensuite, le filament est principalement composé de la protéine FliC et se termine par la protéine FliD. Un crochet permet le lien entre ces deux parties (**Figure 7, A**)(Rattanachak et al., 2022).

Le pilus est principalement constitué de la protéine PilA, qui polymérise pour former le filament. La protéine PilY1, au bout du filament est une adhésine impliquée dans l'attachement du pilus à une surface et à la formation de biofilm notamment (Webster et al., 2022). D'autres protéines forment la partie basale du pilus, ancrée dans la membrane (**Figure 7,B**)(Burdman et al., 2011).

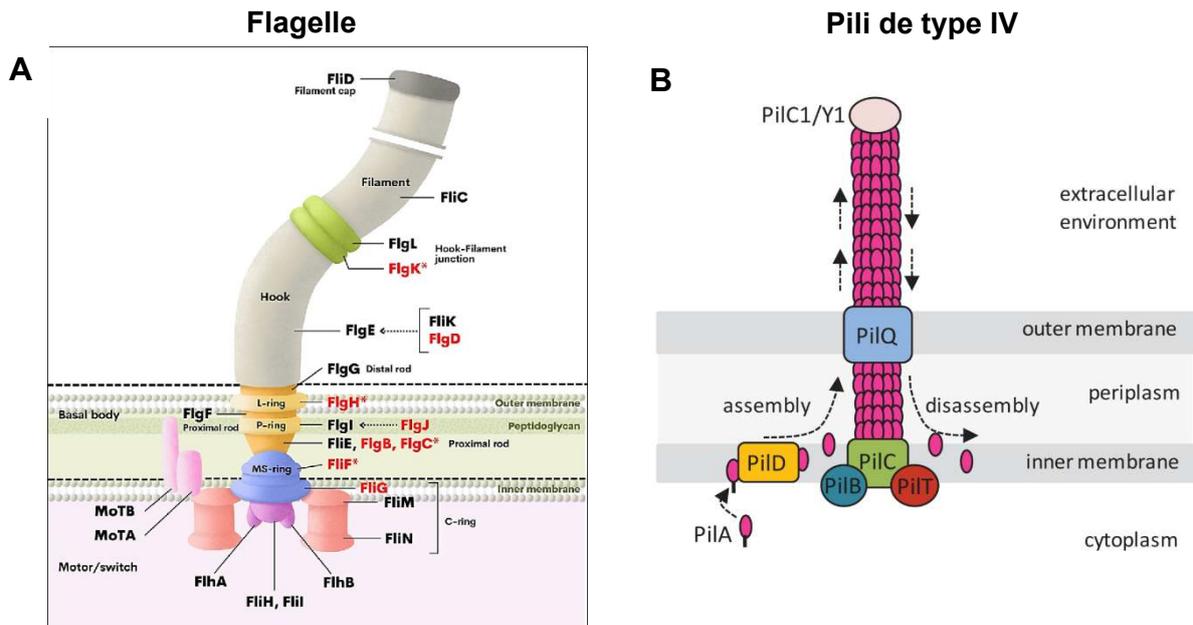


Figure 7. Schéma du flagelle et du pilus.

A. Protéines impliquées dans la formation du flagelle (Burdman et al., 2011). **B.** Schéma de l'assemblage du pilus (Rattanachak et al., 2022).

En plus d'être impliqués dans la mobilité, le flagelle et les pili sont impliqués dans l'adhésion (Beaussart et al., 2014; Haiko and Westerlund-Wikström, 2013) et dans la pathogénicité (Feldman et al., 1998; Marko et al., 2018).

b) Systèmes de sécrétion

Il existe différents types de système de sécrétion (SST) chez *P. aeruginosa* qui permettent de sécréter différents facteurs de virulence.

➤ SST3

Le SST3 est un assemblage macromoléculaire de protéines, aussi appelé nano-seringue moléculaire (Lombardi et al., 2019) qui permet de transloquer des toxines directement dans la membrane de la cellule hôte. La machinerie du SST3 est composée d'un corps basal, inséré dans la membrane interne et externe, d'une nano-aiguille et d'un translocon (Hauser, 2009). L'aiguille est constituée de la protéine PscF, qui polymérise pour former le canal de sécrétion (Pastor et al., 2005). Le translocon est composé des protéines PopB, PopD et PcrV. PopB et PopD s'insèrent dans la membrane des cellules de l'hôte et forment un pore, ce qui permet la translocation des effecteurs du SST3 dans les cellules hôtes (Faudry et al., 2006; Kundracik et al., 2022). Il y a quatre effecteurs du SST3 : ExoT, ExoY, ExoU et ExoS. Les toxines ExoT et ExoY sont retrouvées dans l'ensemble des souches ayant le SST3, cependant ExoS et

ExoU sont généralement exclusives (Shaver and Hauser, 2004), comme cela a été décrit plus haut.

➤ SST2

Trois SST2 ont été décrits chez *P. aeruginosa* : le système Xcp, le système Hxc et le système Txc, qui n'est présent que dans les souches du clade de PA7. Ce dernier permet la sécrétion de la protéine CbpE, qui a la capacité de se lier à la chitine (Cadoret et al., 2014). Le système Hxc permet la sécrétion de la phosphatase LapA, qui ne se fait que lorsque la concentration en phosphate est faible (Ball et al., 2002). Finalement, le système Xcp permet l'exportation de plusieurs effecteurs, dont l'exotoxine A ToxA et les protéases LasA et LasB (Bleves et al., 2010).

➤ SST5

Le SST5 comporte plusieurs sous-types de système de sécrétion dont le système de sécrétion à deux partenaires (TPS). *P. aeruginosa* encode au moins 5 systèmes TPS, qui seront décrits dans la partie III de cette introduction.

➤ SST6

Le SST6 a la particularité de permettre l'injection de toxines dans les cellules eucaryotes mais également procaryotes. Il existe trois SST6 chez *P. aeruginosa*, appelés SST6 H1, H2 et H3. Le SST6 H1 permet d'injecter des toxines dans les cellules procaryotes uniquement et il est exprimé lors d'infections chroniques par *P. aeruginosa* (Mougous et al., 2006). Entre autres, les toxines Tse1 et Tse3 sont administrées dans le périplasme d'autres bactéries par le SST6 H1. Ces enzymes hydrolysent le peptidoglycane, ce qui donne un avantage à *P. aeruginosa* par rapport aux autres micro-organismes (Russell et al., 2011). Les autres SST6 ciblent les cellules procaryotes mais également eucaryotes (Sana et al., 2016), et permettent notamment la sécrétion des phospholipases PldA et PldB (Wettstadt et al., 2019). PldA est sécrétée par SST6 H2 et PldB est sécrétée par SST6 H3. PldA et PldB sont impliquées dans la compétition bactérienne mais ciblent également les cellules eucaryotes et favorisent l'invasion cellulaire (Jiang et al., 2014). De plus, les SST6 H1 et H3 sont impliqués dans la formation de biofilm (Chen et al., 2020).

c) Polysaccharides

P. aeruginosa est capable de synthétiser trois types d'exopolysaccharides, l'alginate, Pel et Psl. L'alginate est composé d'acides uroniques, et confère un phénotype mucoïde aux

souches produisant de l'alginate (Hentzer et al., 2001). La production d'alginate et le passage à un phénotype mucoïde est observé au début des infections chroniques chez les patients atteints de la mucoviscidose (Rehm et al., 1994). Psl est un polysaccharide riche en mannose et en glucose. Il est produit lors de la croissance sous forme planctonique et joue un rôle dans les premières étapes de la formation de biofilm (Ma et al., 2009) qui seront décrites dans la partie II. Pel est riche en glucose et est important pour les interactions cellules-cellules dans la formation de biofilm chez la souche PA14, et cette activité est dépendante de la souche (Colvin et al., 2011). Les trois exopolysaccharides contribuent interactivement à la formation de biofilm, avec l'ADN extracellulaire et ont des rôles différents. En effet, il a été montré que Pel jouait plutôt un rôle dans la densité de bactéries dans le biofilm alors que l'alginate et Psl avaient un impact sur la forme des biofilms. (Ghafoor et al., 2011).

II. Mode de vie de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa peut vivre selon différents modes de vie : planctonique, en biofilm ou sous forme d'agrégats flottants. Les bactéries peuvent passer d'un mode de vie à l'autre en fonction de l'environnement. Le changement de mode de vie est une adaptation des bactéries et leur permet de coloniser leur hôte (Ryu et al., 2017), mais également de survivre aux stress environnementaux. En effet, les micro-organismes s'agrègent lors d'infections, mais également dans la nature où les micro-organismes sont retrouvés sous forme de biofilms polymicrobiens la plupart du temps (Flores-Vargas et al., 2021).

II.1 Vie planctonique

L'état planctonique correspond aux bactéries isolées les unes des autres. Elles peuvent alors se déplacer indépendamment les unes des autres, grâce à leur flagelle et aux pili de type IV qui leur permettent de se mouvoir dans un milieu liquide, semi-liquide ou solide. Généralement, les bactéries adoptent un mode de vie planctonique lors d'infection aiguës. Les bactéries utilisent leur flagelle pour se déplacer puis se lient aux cellules de l'hôte principalement par le flagelle qui a des propriétés adhésives et par les pili de type IV. Grâce à la proximité de la bactérie aux cellules par le biais de ces adhésines, différents types de systèmes de sécrétion permettent de délivrer des toxines et d'infliger des dommages sévères aux tissus. Le système de sécrétion de type III (SST3) permet de délivrer les toxines directement dans le cytoplasme de la cellule hôte. Les effecteurs du SST3 permettent également d'inhiber la phagocytose, ce qui facilite la propagation des bactéries. Les infections aiguës provoquent une forte réponse du système immunitaire (Valentini et al., 2018).

II.2 Biofilm

Lors d'infection chronique, au contraire, les bactéries sont souvent retrouvées sous la forme de biofilm qui leur permettent de subsister chez l'hôte. Une étude transcriptomique a montré que certains gènes exprimés par les bactéries planctoniques diffèrent de ceux exprimés par les bactéries présentes dans les biofilms. Le SST3 est sous-exprimé dans les bactéries sous forme de biofilm par rapport aux bactéries planctoniques mais que la production d'exopolysaccharides est augmentée (Dötsch et al., 2012).

a) Définition et mécanisme de formation d'un biofilm

Le biofilm produit est une structure composée de plusieurs microorganismes attachés à une surface et agrégés entre eux, entourés d'une matrice qu'ils sécrètent eux-mêmes (Vetrivel et al., 2021). La matrice est composée de protéines, d'ADN, de polysaccharides, d'ARN et majoritairement d'eau (97%) (Tuon et al., 2022). Elle sert à donner une structure au biofilm et permet de protéger les microorganismes du stress environnemental, comme les changements de pH, la privation de nutriments, le manque d'oxygène et la déshydratation (Rumbaugh and Sauer, 2020). Il a également été montré que Pel et Psl permettaient aux bactéries sous forme de biofilm de persister *in vivo*, en augmentant la résistance aux traitements antibiotiques (Fleming et al., 2022).

La formation du biofilm se fait en plusieurs étapes (Yin et al., 2019) :

1) Attachement à une surface

Les bactéries planctoniques s'adsorbent à une surface, biotique ou abiotique, de manière réversible par des interactions faibles.

2) Colonisation

Les bactéries s'attachent de manière irréversible par des interactions plus fortes, grâce au flagelle, aux pili et à des adhésines présentes à leur surface.

3) Formation de micro-colonies

Les bactéries attachées se divisent et prolifèrent, et recrutent également d'autres bactéries pour former des micro-colonies. Les pili sont essentiels pour la formation de micro-colonies (O'Toole and Kolter, 1998). Ils sont sur-exprimés au début de la formation du biofilm par rapport aux bactéries sous forme de biofilm mature (Waite et al., 2005). Une étude a mis en

évidence que la forme des micro-colonies dépend de la distribution des facteurs d'adhésion à la surface des bactéries (Duvernoy et al., 2018).

4) Maturation

Les micro-colonies formées prolifèrent et s'organisent. Le QS permet la communication au sein de la communauté microbienne. La matrice entourant les micro-organismes se forme. Le polysaccharide Pel a été identifié comme nécessaire pour la formation de la matrice chez PA14 (Friedman and Kolter, 2003). Psl est également impliqué dans la formation de la matrice, et l'utilisation majoritaire de Psl ou Pel dépend des souches (Colvin et al., 2012). La surproduction d'alginate est également importante et permet de former un biofilm plus structuré (Hentzer et al., 2001).

5) Dispersion du biofilm

Les bactéries se détachent les unes des autres et se dispersent, ce qui permet la colonisation d'un autre site. La dispersion peut être due à des facteurs internes (dispersion native) ou externes (dispersion induite par l'environnement) au biofilm. La dispersion native peut être due à la production de molécules sécrétées par les bactéries présentes dans le biofilm, ou à une réponse au stress présent au sein du biofilm. En effet, au sein du biofilm, on trouve un gradient de nutriments et d'oxygène, ce qui entraîne plusieurs réponses. Une des réponses est l'augmentation de la quantité de monoxyde d'azote, qui baisse la concentration du messenger c-di-GMP, ce qui augmente la motilité des bactéries et provoque leur dispersion. Les facteurs de dispersion induits par l'environnement sont le monoxyde de carbone, le fer, l'augmentation de certains nutriments comme des sucres et des acides aminés par exemple, mais provenant de l'environnement extérieur et non de l'intérieur du biofilm. Les facteurs internes et externes sont assez similaires, ce qui suggère des mécanismes de détection et de dispersion similaires (Rumbaugh and Sauer, 2020). Une étude récente a permis d'identifier un nouveau facteur impliqué dans la colonisation ou la dispersion du biofilm en fonction de sa concentration : HecE. Lorsqu'il est fortement exprimé, HecE inhibe la phosphodiesterase BifA, qui impacte négativement la formation de biofilm (Kuchma et al., 2007). HecE stimule également la production de la diguanylate cyclase WspR, ce qui augmente les niveaux de second messenger c-di-GMP et favorise la colonisation de la surface. Au contraire, les bactéries qui expriment peu HecE se dispersent (Manner et al., 2023).

Ce modèle reconnu classiquement, a été réévalué récemment à la suite de plusieurs travaux réalisés sur les agrégats. La formation de biofilm sur une surface solide peut se faire selon

deux modèles : le premier suggère que les bactéries planctoniques s'attachent à une surface puis forment des micro-colonies puis un biofilm mature (**Figure 8, A**). Le deuxième modèle suggère que des agrégats flottants peuvent se former puis sédimer et s'accrocher à une surface, ce qui initie la formation d'un biofilm mature (Kragh et al., 2016). Lors de la dispersion du biofilm, des agrégats flottants de bactéries peuvent se disperser et, étant mobiles, se disséminer pour former un nouveau biofilm dans un autre site (**Figure 8, B**). Une hypothèse avancée par les auteurs est que ces deux mécanismes pourraient se produire simultanément.

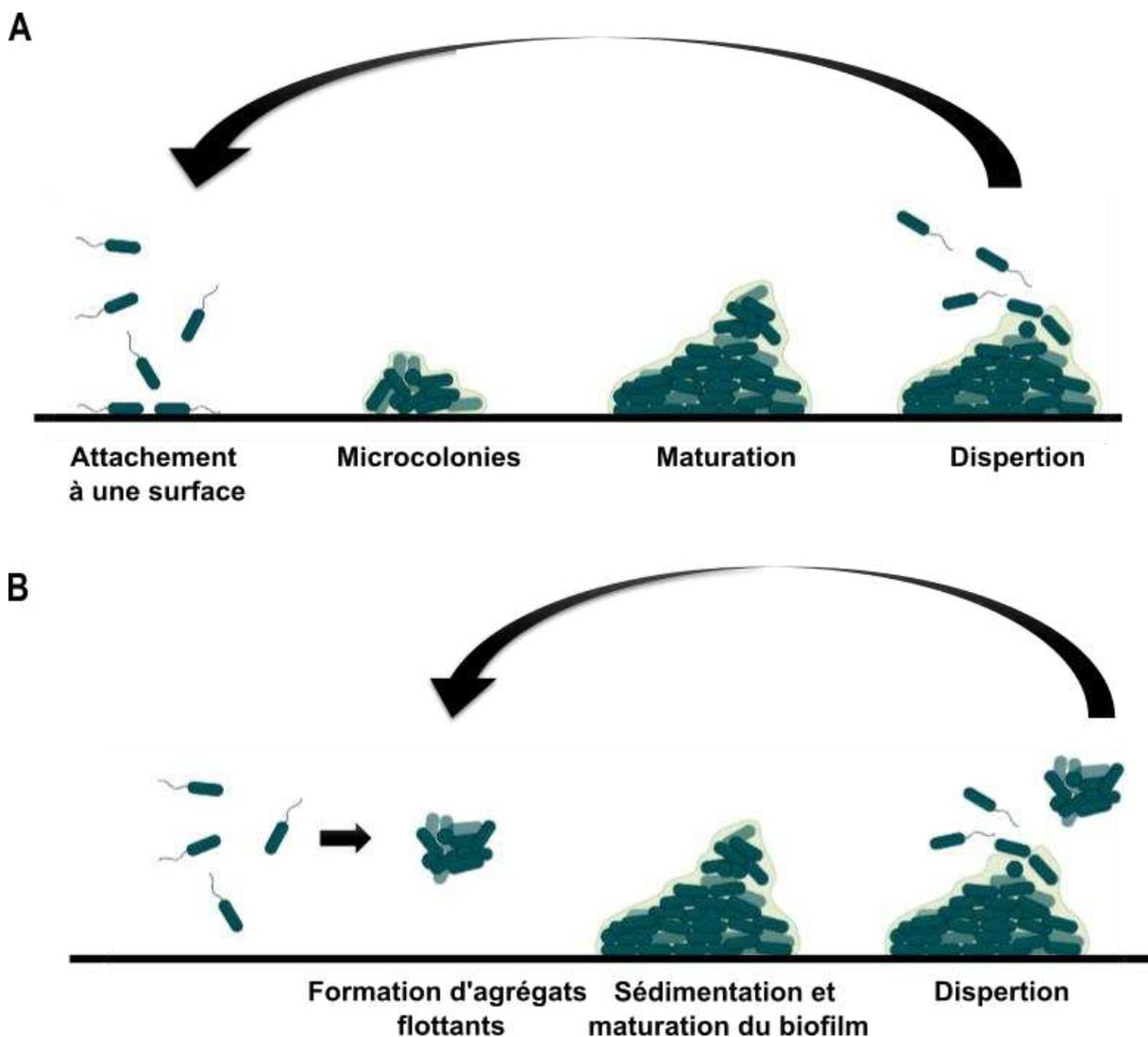


Figure 8. Schéma des deux modèles de la formation de biofilm. **A.** Formation de biofilm à partir de bactéries planctoniques. **B.** Formation de biofilm à partir d'agrégats flottants.

P. aeruginosa est capable de former différents types de biofilms selon son environnement. Dans les cultures liquides statiques, elle est capable de former une pellicule à la surface, à l'interface air-liquide (Friedman and Kolter, 2003). Elle est également capable de former un

biofilm en s'attachant à une surface solide abiotique, comme sur les surfaces de matériaux retrouvés à l'hôpital comme les cathéters, ce qui provoque des infections chez les patients (Cole et al., 2014). Elle peut également former des biofilms sur des surfaces biotiques chez l'hôte lorsque l'environnement est hostile au mode de vie planctonique. En effet, les bactéries sont confrontées à des conditions difficiles chez leur hôte, comme le stress oxydatif, la présence d'enzymes, de cellules phagocytaires ainsi que la présence d'antibiotiques qui sont prescrits lorsqu'une infection à *P. aeruginosa* est détectée. Les bactéries subsistent alors en état de dormance, protégées du système immunitaire et des stress. La formation d'un biofilm peut provoquer l'activation de la réponse immunitaire innée et adaptative de l'hôte, mais aucune des deux réponses ne permet l'élimination des bactéries présentes dans le biofilm. Cependant, la réponse immunitaire, inefficace pour éliminer les pathogènes, provoque des dommages aux tissus au niveau du site d'infection (Moser et al., 2017).

Au sein du biofilm, les bactéries sont confrontées à un manque d'oxygène et de nutriments, surtout à la base du biofilm. Les bactéries s'adaptent en réduisant leur métabolisme et leur production de protéines ainsi que la division cellulaire. Ces modifications adaptatives ont pour conséquence d'augmenter la résistance aux antibiotiques : en effet, les cibles des antibiotiques, exprimées lorsque les bactéries sont sous forme planctonique, sont réprimées sous forme de biofilm, ce qui rend l'antibiotique inefficace (Vestby et al., 2020).

b) Quorum Sensing (QS)

Le QS est un mécanisme de régulation utilisé par les bactéries pour communiquer entre elles. Le QS joue un rôle dans la formation du biofilm et intervient lors de plusieurs étapes. En fonction de la densité de la population bactérienne, qui change lorsque les bactéries sont sous forme planctonique ou sous forme de biofilm, les bactéries vont se synchroniser pour agir comme un organe multicellulaire. En effet, les bactéries diffusent des molécules qui, lorsque la densité bactérienne augmente, voient leur concentration augmenter. Lorsque la concentration dépasse un certain seuil, les bactéries vont agir en communauté et l'ensemble des bactéries vont modifier l'expression de certains gènes. Il existe 3 systèmes de QS décrits dans la littérature pour *P. aeruginosa*. Le système Las est constitué du régulateur transcriptionnel LasR et de LasI, qui produit la molécule signal. Le système Las a un rôle dans la formation des biofilms attachés à des surfaces solides et également dans la formation des biofilms à l'interface air-liquide (Sakuragi and Kolter, 2007). De même, le système Rhl est composé de RhlR et de RhlI, et ce système est impliqué dans la formation de biofilm (Mukherjee et al., 2017). Le troisième système, appelé PQS est composé du régulateur transcriptionnel PqsR, de l'effecteur de réponse PqsE, et des protéines PqsABCD qui

produisent la molécule signal. Tous ces systèmes sont interconnectés et sont impliqués dans la formation de biofilm (Miranda et al., 2022). La production d'éléments importants pour la formation de la matrice extracellulaire, comme le polysaccharide Pel, est également contrôlée par le QS, de même que le relargage d'ADN extracellulaire (de Kievit, 2009). Cette organisation communautaire permet de former un biofilm mature et persistant, où toutes les bactéries sont approvisionnées par le biais d'une organisation multicellulaire.

c) Régulation de la formation du biofilm

Le second messager c-di-GMP est une molécule importante pour les biofilms, et elle permettrait de passer du mode de vie planctonique au mode de vie biofilm et inversement en fonction de sa concentration (Simm et al., 2004). En effet, une forte concentration en c-di-GMP est associée à la vie sous forme de biofilm et une faible concentration à un mode de vie planctonique (Ha and O'Toole, 2015). Il a été montré notamment que c-di-GMP impacte positivement la production d'exopolysaccharides (Hou et al., 2019) et de la protéine CdrA (Borlee et al., 2010), qui est impliquée dans l'auto-agrégation et est nécessaire à la formation de biofilm. Cette protéine sera décrite plus en détail dans la partie III.3 de l'introduction.

Le système à deux composants GacAS est également impliqué dans la formation de biofilm chez *P. aeruginosa*. Ce système est régulé par LadS, qui active le système (Ventre et al., 2006) et RetS qui l'inhibe (Ryan Kaler et al., 2021). En effet, LadS active la production d'exopolysaccharides et réprime l'expression du SST3 (Ventre et al., 2006) par le biais du système GacAS. RetS lui est nécessaire pour l'activation du SST3 et d'autres facteurs de virulence, ainsi qu'à la répression des gènes responsables des composants exopolysaccharides de la matrice du biofilm de *P. aeruginosa* (Goodman et al., 2004). Lorsque LadS est exprimé, il interagit avec GacS qui phosphoryle et active GacA. GacA active alors les ARN régulateurs RsmY et RsmZ. Au contraire quand RetS est exprimé, il inhibe GacA et donc RsmY et RsmZ ne sont pas produits. Ces deux ARN régulateurs sont antagonistes de RsmA, une protéine régulatrice. Lorsque RsmY et RsmZ ne sont pas induits, RsmA est libre : elle active le SST3 et la motilité, et le SST6 et la production d'exopolysaccharides sont inhibés, promouvant un mode de vie planctonique. Au contraire, si RsmY et RsmZ sont induits, ils séquestrent RsmA ce qui promeut alors un mode de vie sessile (**Figure 9**) (Allsopp et al., 2017; Kay et al., 2006; Mikkelsen et al., 2011). La cascade de régulation dépendante de RetS et LadS et du système GacAS permet donc de passer d'un mode de vie planctonique, avec une virulence accrue à un mode de vie sous forme de biofilm avec une virulence diminuée et une protection par la matrice extracellulaire formée entre autres d'exopolysaccharides. Il a été montré que les systèmes d'inhibition de croissance (CDI) de *P. aeruginosa*, sécrétés par le

système TPS et décrits ultérieurement dans l'introduction sont également régulés par RsmA (Mercy et al, 2016). Ces systèmes sont donc exprimés par les bactéries sous forme de biofilm, leur donnant un avantage compétitif par rapport aux autres micro-organismes présents.

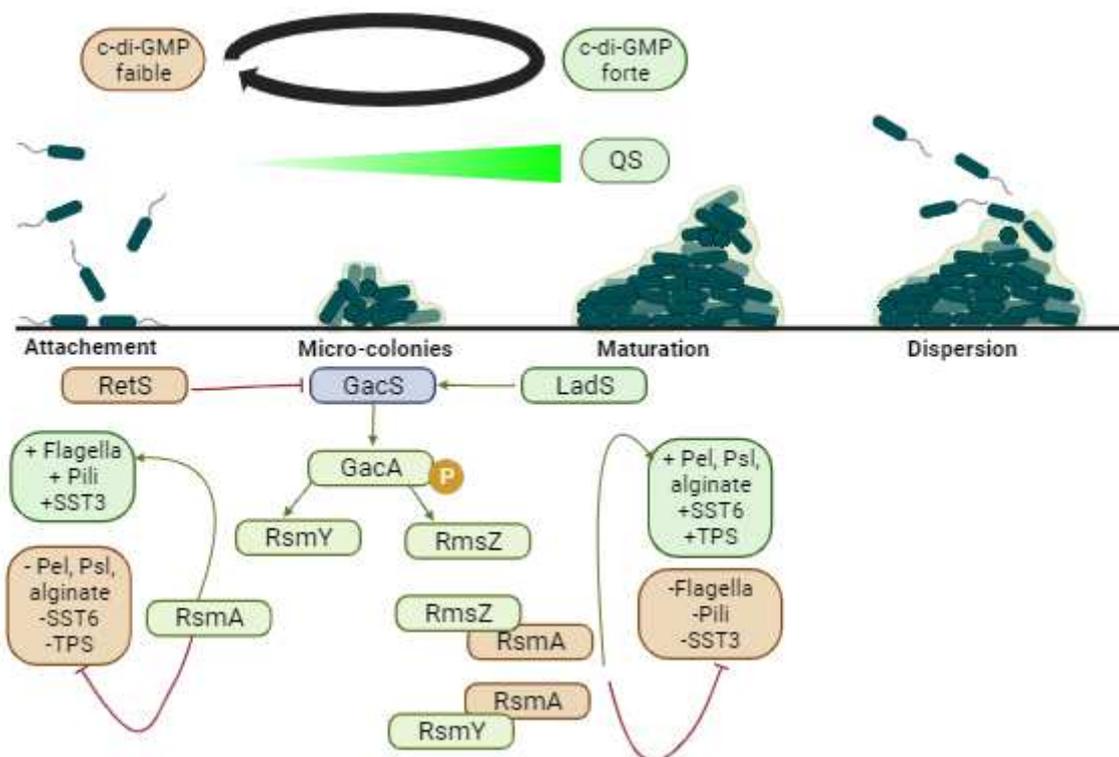


Figure 9. Formation de biofilm.

Les différentes étapes de la formation d'un biofilm sont indiquées. Les différences entre les bactéries sous forme de biofilm et les bactéries planctoniques sont également indiquées, ainsi que la voie de régulation RetS/LadS/GacS. Réalisé sur biorender.com.

d) Stratégies anti-biofilm

Lorsque les bactéries s'organisent en biofilm, cela provoque des infections de longue durée, qui sont difficilement éliminées par le système immunitaire ou par les antibiotiques disponibles. Des stratégies anti-biofilm sont de plus en plus étudiées, comme en témoignent ces deux revues récentes (Asma et al., 2022)(Abdelhamid and Yousef, 2023).

Une des stratégies développées est de cibler l'adhésion initiale des bactéries afin d'empêcher la formation de biofilm. Une première possibilité est l'utilisation d'agents biocides sur les surfaces où se développent les biofilms. Des matériaux spécifiques ont été développés, recouverts de monomères antimicrobiens ce qui permet de tuer les pathogènes qui se développent sur les matériaux dans les hôpitaux, comme les cathéters par exemple (Donelli et al., 2002). Des agents antiadhésifs mais non-biocides ont également été proposés, comme

par exemple les polysaccharides capsulaires du groupe II produits par des souches d'*E. coli* uropathogéniques qui sont capables d'empêcher l'adhésion et la formation de biofilm de plusieurs pathogènes Gram-négatifs et Gram-positifs (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Enterococcus faecalis*) (Valle et al., 2006). Une étude récente a permis d'identifier de nouveaux polysaccharides aux propriétés anti-biofilms en criblant plusieurs polysaccharides. De plus, ces auteurs ont pu mettre en évidence des propriétés biophysiques et électrocinétiques communes à ces molécules. En effet, elles ont toutes une structure macromoléculaire lâche, une densité de charge et une viscosité élevées. Ces propriétés étant corrélées à une activité anti-biofilm, il serait possible de créer de nouvelles molécules anti-biofilm, en mimant ces propriétés (Bernal-Bayard et al., 2023).

Le QS étant essentiel pour la vie sessile des bactéries, il représente également une cible anti-biofilm. Des agents inhibiteurs du QS ont été identifiés et permettent de perturber la structure du biofilm. Par exemples, des extraits bactériens d'isolats marins interfèrent avec le QS de *P. aeruginosa* PAO1 et inhibent la formation de biofilm (Nithya et al., 2010). En utilisant *Vibrio cholerae*, une étude a montré qu'une métallo- β -lactamase produite par *Bacillus* inhibe la formation de biofilm. Cette enzyme bloque le QS des bactéries Gram-négatives en hydrolysant les lactones N-acyl-homosérine, molécules signal du QS (Augustine et al., 2010). Des extraits des feuilles de *Lagerstroemia speciosa* ont également un potentiel d'inhibiteur du QS et de biofilm (Zafar et al., 2022).

Le second messenger c-di-GMP est associé au mode de vie sessile comme cela a été décrit précédemment. Une autre stratégie anti-biofilm est donc d'inhiber la synthèse de c-di-GMP. Un criblage a permis d'identifier des molécules capables de réduire la concentration en c-di-GMP chez *P. aeruginosa*, ce qui permet d'inhiber la formation de biofilm et induit la dispersion des biofilms déjà formés (Andersen et al, 2021).

Une autre stratégie est l'utilisation d'anticorps dirigés contre les facteurs d'adhésion responsables de la formation de biofilm, comme les *fimbriae* ou l'adhésine CdrA de *P. aeruginosa* (décrite dans le III de cette introduction). Chez *Haemophilus influenza*, des anticorps dirigés contre la protéine PiiA composant les pili de type IV permettent la dispersion progressive des biofilms matures. (Novotny et al., 2015). Une protéine *fimbriae* de *Acinetobacter baumannii* appelée CAM87009.1 a été utilisée pour produire des anticorps dirigés contre elle. Ces anticorps sont capables d'inhiber la formation de biofilm dans la plupart des souches testées (de Freitas et al., 2021). Des anticorps dirigés contre l'adhésine FimH

d'*E. coli* permettent d'inhiber l'adhésion des bactéries, la formation de biofilm et un des anticorps testés permet également de dissoudre les biofilms déjà formés (Kisiela et al., 2015).

II.3 Agrégats

Les bactéries peuvent également former des agrégats flottants, où les bactéries sont liées les unes aux autres mais non attachées à une surface (**Figure 10**). Lorsque les bactéries agrégées sont de la même espèce, on parle d'auto-agrégation, alors que lorsque les bactéries agrégées appartiennent à des espèces différentes, on parle de co-agrégation. Les agrégats flottants sont ubiquitaires, ils sont retrouvés dans l'environnement comme dans les océans, les eaux usées, le sol (Wilpiseski et al., 2019) mais également dans les infections chroniques comme dans les voies respiratoires des patients atteints de la mucoviscidose, les plaies chroniques et les infections urinaires (Cai, 2020). En effet, des agrégats de 10 à 10 000 bactéries ont été identifiés dans les expectorations des patients atteints de la mucoviscidose (Azimi et al., 2021). Des agrégats de bactéries ont également été identifiés dans le mucus de patients (Speare et al., 2020) et dans des plaies (Bay et al., 2018), témoignant de l'importance clinique des agrégats. L'auto-agrégation peut avoir plusieurs intérêts pour les bactéries. Alhede et al ont mis en évidence la ressemblance entre les bactéries agrégées et les bactéries sous forme de biofilms, notamment la tolérance aux antibiotiques et la résistance à la phagocytose par les neutrophiles (Alhede et al., 2011). Une revue récente met en avant l'importance des agrégats flottants dans la nature et lors des infections et montre l'ensemble des ressemblances entre les agrégats flottants et les biofilms, comme la présence d'une matrice extracellulaire, la forte concentration en c-di-GMP par rapport aux bactéries planctoniques, la tolérance aux antibiotiques et la protection contre le système immunitaire de l'hôte (Kragh et al., 2023). Cependant, bien qu'ils aient beaucoup de propriétés similaires avec les biofilms, ces agrégats flottants sont désormais décrits comme un troisième mode de vie bactérienne.

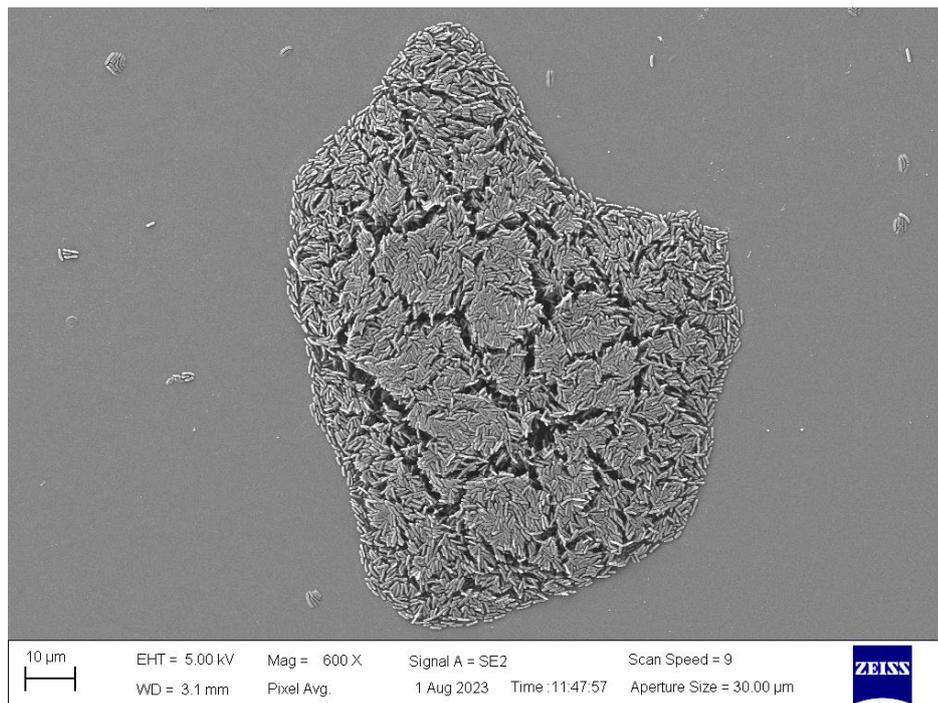


Figure 10. Agrégats de *P. aeruginosa* visualisés par microscopie électronique à balayage (MEB). Les bactéries ont été préparées par Ina Attrée (PBRC, IBS) et les images réalisées par Caroline Cluzel-Grangeasse sur la plateforme CTμ (centre technologique des microstructures) avec le microscope MEB ZEISS Merlin (Université Claude Bernard, Lyon).

Il peut exister plusieurs types d'agrégats selon l'organisation des bactéries entre elles. Il a été montré chez *P. aeruginosa* que la forme des agrégats dépendait des caractéristiques de la surface des bactéries. En effet, en fonction de l'hydrophobicité de la surface cellulaire, les bactéries forment soit des agrégats empilés, soit des agrégats en forme de motte (Azimi et al., 2021). De plus, une étude récente chez *P. aeruginosa* a montré que la taille des agrégats dépendait de la phase de croissance (Melaugh et al., 2023).

Les bactéries peuvent également s'agréger par épuisement ou par déplétion lorsqu'elles entrent spontanément en contact étroit. Ce mécanisme est mis en place lorsque la concentration en polymères non-adsorbants est forte (Poon, 2002) et lorsque les bactéries ont la même forme. En effet, les bactéries en forme de coques et les bactéries en forme de bâtonnets ne s'agrègent pas entre elles. Cependant, des bactéries d'espèces différentes mais de forme similaire co-agrègent selon ce mécanisme. De plus, il a été montré que le mécanisme d'agrégation par déplétion active l'adhésion des bactéries entre elles par le biais d'exopolysaccharides (Secor et al., 2022).

a) Facteurs d'auto-agrégation

Plusieurs facteurs ont été démontrés comme promouvant l'agrégation des bactéries : ils peuvent être classés en plusieurs catégories, citées ci-dessous.

➤ *Fimbriae* ou pili

Les *fimbriae* ou pili sont des organelles qui ont, entre autres, des propriétés adhésives. Il a été montré que dans plusieurs espèces, les pili pouvaient provoquer l'auto-agrégation des bactéries par des interactions latérales entre les différentes unités de pili, comme chez *Vibrio cholerae* (Adams et al., 2019) et *Vibro vulnificus* (Pu and Rowe-Magnus, 2018).

➤ Adhésines non-*fimbriae*

D'autres adhésines non *fimbriae* sont impliquées dans l'auto-agrégation. Ce sont des protéines exprimées à la surface des bactéries, souvent sécrétées par le système de sécrétion de type V. Elles sont retrouvées dans de nombreuses espèces dont quelques-unes sont citées dans le **tableau 4**.

Espèce	Nom de l'adhésine	Référence
<i>Veillonella parvula</i>	VtaA	(Béchon et al., 2020)
<i>E. coli</i>	Antigen Ag43, TibA, AIDA	(Ageorges et al., 2019), (Klemm et al., 2006)
<i>A. baumannii</i>	AtaA	(Ishikawa et al., 2012)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Hag	(Pearson et al., 2002)
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Apa	(Xiao et al., 2012)
<i>Bartonella quintana</i>	VompA	(Zhang et al., 2004)
<i>Yersinia</i>	YadA	(Eltahir, 2001)
<i>H. influenzae</i>	Hap	(Hendrixson and St. Geme, 1998; Meng et al., 2011)
<i>Listeria monocytogenes</i>	ActA	(Travier et al., 2013)
<i>P. aeruginosa</i>	CdrA	(Reichhardt et al., 2018)

Tableau 4. Exemple d'adhésines impliquées dans l'auto-agrégation décrites dans la littérature.

La plupart du temps, l'auto-agrégation est due à une interaction homotypique, comme cela a été montré pour les protéines Hap d'*Haemophilus influenzae* et Ag43 d'*E. coli* (Heras et al., 2014; Meng et al., 2011). Ces protéines sont alors appelées des auto-agglutinines. Cependant, les interactions mises en jeu afin de permettre la liaison de deux protéines diffèrent (**Figure 11**).

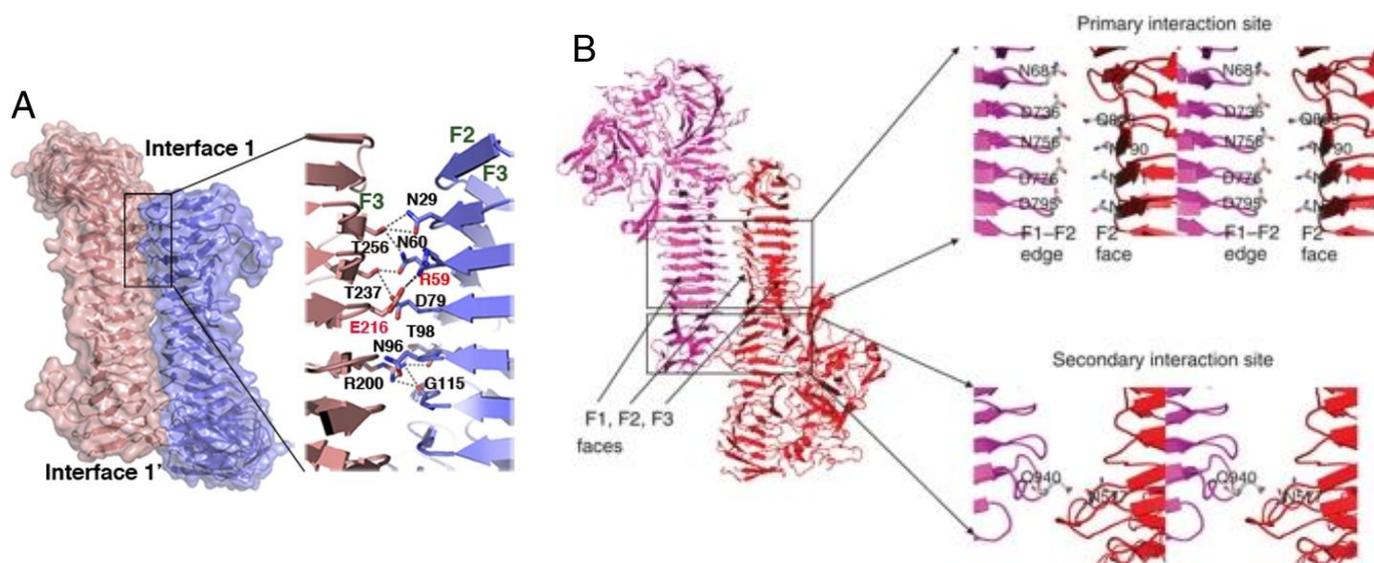


Figure 11. Mécanisme d'interactions homotypiques d'auto-agglutinines.

A. Association de deux protéines Ag43 (Heras et al., 2014, p. 43). Des liaisons hydrogènes permettent de stabiliser l'interaction homotypique de deux protéines Ag43 en *trans*. **B.** Association de deux protéines Hap (Meng et al., 2011).

Pour l'antigène Ag43, 18 liaisons hydrogènes permettent de stabiliser l'interaction homotypique. En revanche, l'association de deux protéines Hap se fait uniquement par des interactions faibles. Une liaison hydrogène existe entre les deux monomères associés mais elle n'est pas essentielle pour l'interaction des deux protéines.

➤ Autres facteurs

L'auto-agrégation peut être due à la sécrétion d'autres macromolécules qui induisent indirectement l'auto-agrégation, par exemple le relargage d'ADN extracellulaire (Dogsa et al., 2023) ou la production d'exopolysaccharides, comme cela a été montré chez *S. aureus* (Formosa-Dague et al., 2016). D'autres facteurs peuvent induire l'auto-agrégation, comme l'interaction d'une bactérie dont la surface est chargée avec un agent de charge opposé (Arenas et al., 2013).

b) Régulation de l'auto-agrégation

L'auto-agrégation est régulée, ce n'est pas un phénomène passif mais c'est une adaptation en fonction de l'environnement. De nombreux mécanismes peuvent être impliqués dans la régulation de l'auto-agrégation, dont certains sont décrits dans cette partie.

Tout d'abord, la présence d'ions peut moduler l'auto-agrégation. Par exemple, il a été montré que dans les cultures de *Aeromonas hydrophila*, l'auto-agrégation était régulée par la concentration en calcium (Dong et al., 2020). Le chlorure de sodium est également un régulateur de l'auto-agrégation chez la souche *Pseudomonas sp.*DN-23 (Li et al., 2020).

La synthèse de la protéine Ag43 est régulée par variation de phase. C'est un phénomène épigénétique, qui contrôle la production de plusieurs protéines de surface. Il entraîne une expression d'un gène différente au sein des bactéries d'une même population. En effet, l'expression du gène dépend de deux phases, ON et OFF, et les bactéries d'une même population peuvent se trouver dans l'une ou l'autre des phases. Le principe de ce phénomène repose sur le fait qu'une méthylation de l'ADN au niveau d'un site de fixation d'une protéine régulatrice affecte l'affinité de cette protéine régulatrice. Dans le cas de Ag43, la protéine est codée par le gène *agn43* dont la transcription est réprimée par OxyR. La région régulatrice de *agn43* comporte trois séquences GATC comprises dans une séquence homologue au motif de liaison de OxyR. La méthylase Dam (DNA adenine methymase) méthyle l'adénine dans les séquences GATC chez *E. coli*. Ainsi, en phase OFF, les trois séquences GATC ne sont pas méthylées et OxyR peut se fixer et réprimer la transcription de *agn43*. En revanche, en phase ON, les trois séquences sont méthylées, ce qui empêche la fixation du répresseur et permet la transcription du gène (van der Woude et al, 2008). Ainsi les acteurs Dam et OxyR, exclusifs, permettent de contrôler l'expression de *agn43*.

Chez *Azospirillum brasiliense*, il a été montré que la chimiotaxie était impliquée dans la formation d'agrégats. En effet, une étude a mis en avant l'implication de la voie Che1 dans la formation d'agrégats (Bible et al, 2008). C'est une voie de transduction du signal qui permet à *E. coli* de répondre à un stimulus chimique dans son environnement. Il semblerait que Che1 soit impliquée dans la formation réversible d'agrégats, et la stabilisation de ces agrégats se ferait par l'intermédiaire d'exopolysaccharides (Bible et al, 2012).

Lorsque l'auto-agrégation est due à des interactions homotypiques de protéines exposées à la surface, le phénotype d'agrégation est régulé en masquant ou en mettant en évidence les appendices impliqués dans l'auto-agrégation, selon ce qui est bénéfique pour la bactérie. Par exemple il a été montré chez *E. coli* qu'une capsule créée par les polysaccharides empêchait

stériquement l'interaction entre deux protéines Ag43 et également entre deux protéines AIDA-1, deux auto-agglutinines de *E. coli*, et bloque ainsi l'agrégation des bactéries (Schembri et al., 2004).

Parmi les ressemblances entre les bactéries agrégées et les bactéries sous forme de biofilm, il y a des ressemblances dans certains mécanismes de régulation. Chez *Erwinia amylovora* une étude a montré que chez un mutant $\Delta pdeABC$, gènes codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation de c-di-GMP, la concentration en c-di-GMP était plus élevée et que les bactéries s'auto-agrégeaient. Cependant, ce mutant formait moins de biofilm. Il a été suggéré que des concentrations élevées en c-di-GMP provoquaient des interactions cellules-cellules accrues, modifiant les interactions de surface et empêchant la formation de biofilm (Kharadi et al, 2019). Une autre étude a mesuré une concentration en c-di-GMP plus élevée dans les agrégats par rapport aux bactéries planctoniques, comme dans les biofilms (données non publiées, citées dans (Kragh et al, 2023)). Une concentration élevée en c-di-GMP est donc associée à la formation d'agrégats, comme c'est le cas pour la formation des biofilms.

La formation de biofilm est en partie médiée par le quorum sensing (QS), qui est un mécanisme dépendant de la densité bactérienne et qui a été décrit dans la partie précédente. Dans la nature, des bactéries formant des agrégats contiennent des quantités élevées de plusieurs molécules liées à la détection du QS (Zan et al, 2014). De plus, chez *E. coli*, il a été montré que le QS médié par la molécule AI-2, un auto-inducteur, favorisait également l'auto-agrégation des bactéries (Laganenka et al, 2016).

c) Rôle de l'auto-agrégation

i) Agrégats et biofilm

Une étude a montré que, dans certains cas, l'auto-agrégation était directement corrélée à la formation de biofilm, comme cela a été montré chez *Sinorhizobium meliloti* (Sorroche et al., 2012). Chez *E. coli*, l'adhésine Ag43, responsable d'un phénotype d'auto-agrégation est également impliquée dans la formation de biofilm mature, et il a été montré que la formation de biofilm se faisait à partir des bactéries en phase ON (produisant Ag43) préalablement agrégées par le biais de Ag43 (Chauhan et al, 2013).

De plus, des études sur la formation de biofilm ont permis de montrer que la formation de biofilm peut se faire à partir d'agrégats flottants, qui sédimentent et forment ensuite un biofilm mature comme cela a été décrit dans la partie précédente (**Figure 8**).

Mais d'autres études ont montré que l'auto-agrégation et le biofilm sont deux phénomènes différents et, dans certains cas, l'auto-agrégation n'influe pas sur la formation de biofilm comme cela a été montré chez *Burkholderia pseudomallei* et chez *Bordetella holmesii* (Boddey et al., 2006; Hiramatsu et al., 2016). De plus, la formation d'agrégats ne nécessite pas la motilité des bactéries, contrairement à la formation de biofilm (Demirdjian et al., 2019). Le QS n'est pas non plus nécessaire pour la formation d'agrégats de *P. aeruginosa*, ni la production des trois expolysaccharides Pel, Psl et alginate, alors qu'ils sont essentiels à la formation de biofilm (Staudinger et al., 2014).

ii) Protection contre le stress

La formation d'agrégats flottants donne aux bactéries certaines des protections retrouvées dans les biofilms classiques. Cela leur permet notamment de survivre aux stress environnementaux. Par exemple, comme les bactéries sous forme de biofilm, les bactéries agrégées sont plus résistantes aux traitements antibiotiques que les bactéries planctoniques (Demirdjian et al., 2019; Staudinger et al., 2014). De plus, ces agrégats non attachés sont résistants aux défenses de l'hôte comme aux oxydants et aux neutrophiles (Staudinger et al., 2014). Il a été montré que l'auto-agrégation pouvait être une adaptation au stress, notamment chez *P. aeruginosa*. Par exemple, en présence du détergent dodécylsulfate de sodium, la souche de référence PAO1 forme des agrégats macroscopiques qui permettent aux bactéries de survivre en présence du détergent (Klebensberger et al., 2006). Il a également été montré que *E. coli* pouvait former des agrégats mixtes avec *P. aeruginosa* afin de se protéger d'un stress chimique, qui est létal pour les bactéries sous forme planctoniques (Jagmann et al., 2015). La souche *P. putida* CP1 forme des agrégats en présence de composés aromatiques chlorés, ce qui montre le rôle de l'auto-agrégation dans la réponse au stress environnemental (Farrell and Quilty, 2002).

L'agrégation peut également être une protection contre les prédateurs tels que les bactériophages de plusieurs familles ou des protozoaires (Chan et al., 2021). Il a également été montré qu'une souche de *P. aeruginosa* cultivée en présence de l'algue prédatrice *Ochromonas* formait des agrégats alors qu'elle est sous forme planctonique lorsqu'elle est cultivée seule (Hahn et al., 2000).

Une analyse transcriptomique récente comparant les bactéries agrégées et planctoniques a révélé que de nombreux gènes étaient exprimés différemment entre ces deux conditions. Plusieurs mécanismes généraux ont été identifiés. D'abord, plusieurs gènes impliqués dans la respiration anaérobie sont surexprimés dans les agrégats, montrant que les bactéries

agrégées passent d'un mode de respiration aérobique à anaérobique lorsqu'elles s'auto-agrègent. Une réduction de plusieurs facteurs de croissance a également été notée dans les bactéries agrégées ainsi qu'une modification de l'enveloppe cellulaire. Ces modifications, notamment la réduction de la croissance, peuvent s'expliquer par les stress que subissent les agrégats, montrant que les bactéries agrégées subissent de nombreux stress et s'adaptent pour les contrer. Finalement, plusieurs systèmes permettant de résister aux antibiotiques sont surexprimés dans les bactéries agrégées (Chekli et al., 2023), ce qui est cohérent avec ce qui a été montré dans d'autres études comme cela a été décrit précédemment.

iii) Interactions hôte-pathogène

Finalement, l'auto-agrégation peut jouer un rôle dans les interactions hôte-pathogène. Il a été montré que l'auto-agrégation favorisait la colonisation de l'hôte par plusieurs pathogènes. Chez *Listeria monocytogenes*, dans un modèle *in vivo* chez la souris, les bactéries agrégées persistent plus longtemps dans l'estomac et favorisent la colonisation de l'intestin en comparaison avec les bactéries non agrégées (Travier et al., 2013). *Legionella pneumophila* infecte également plus efficacement les amibes lorsque les bactéries sont agrégées (Abdel-Nour et al., 2014). Dans une souche uropathogénique de *E. coli*, il a été montré que la synthèse d'un variant de la protéine Ag43 est responsable du phénotype d'auto-agrégation, ce qui promeut également la formation de biofilm. De plus, en utilisant un modèle de souris il a été montré que cette protéine favorisait la persistance des bactéries dans la vessie des souris infectées (Ulett et al., 2007). L'auto-agrégation permet aussi d'éviter la phagocytose, dépendamment de la taille des agrégats formés (Alhede et al., 2020). *P. aeruginosa* sous forme d'agrégats flottants est également plus résistante aux neutrophiles que les bactéries planctoniques, et cette résistance est similaire à celle observée chez les bactéries sous forme de biofilm (Alhede et al., 2011). La formation d'agrégats peut également augmenter la survie dans les cellules immunitaires lorsque les bactéries sont internalisées (Fexby et al., 2007). Elle peut augmenter l'adhésion aux cellules eucaryotes comme cela a été montré chez *Burkholderia pseudomallei* (Boddey et al., 2006). L'agrégation des bactéries entre elles peut également favoriser la pathogénèse en accélérant l'infection, en concentrant les facteurs de virulence à proximité des cellules hôtes (Guerry, 2007). La présence d'agrégats a été identifiée comme liée avec une virulence accrue dans plusieurs pathogènes (Bieber et al., 1998; Kirn et al., 2000).

En conclusion, les bactéries sous forme d'agrégats ont des propriétés particulières qui leur permettent de persévérer chez l'hôte et qui peut favoriser la pathogénèse en augmentant la

survie de la bactérie en général. Ce phénomène est présent chez de nombreux pathogènes et est un mécanisme très répandu en clinique.

III. Les systèmes de sécrétion à deux partenaires (TPS)

III.1 Mécanisme de sécrétion du système de sécrétion à deux partenaires

Le système de sécrétion à deux partenaires (TPS pour Two Partner Secretion en anglais) est un sous-type du système de sécrétion de type V qui permet la sécrétion de protéines à travers la membrane externe. Les protéines du système de sécrétion de type V sont souvent appelées auto-transporteurs. Ce système de sécrétion est divisé en plusieurs sous-types, différenciés les uns des autres par leur organisation générale et leur biogénèse. Cependant, les fonctions des protéines effectrices ne dépendent pas du sous-type du système de sécrétion et sont très variées. En comparaison avec les autres systèmes de sécrétion, le système de type V beaucoup simple, et il est retrouvé uniquement chez les bactéries Gram-négatives (Fan et al., 2016; Meuskens et al., 2019). En effet, dans la plupart des cas, le système est composé d'une unique protéine qui comprend une seule chaîne polypeptidique avec un domaine β -barrel de translocation qui s'insère dans la membrane, et un domaine passager qui est la partie effectrice de la protéine (**Figure 12**).

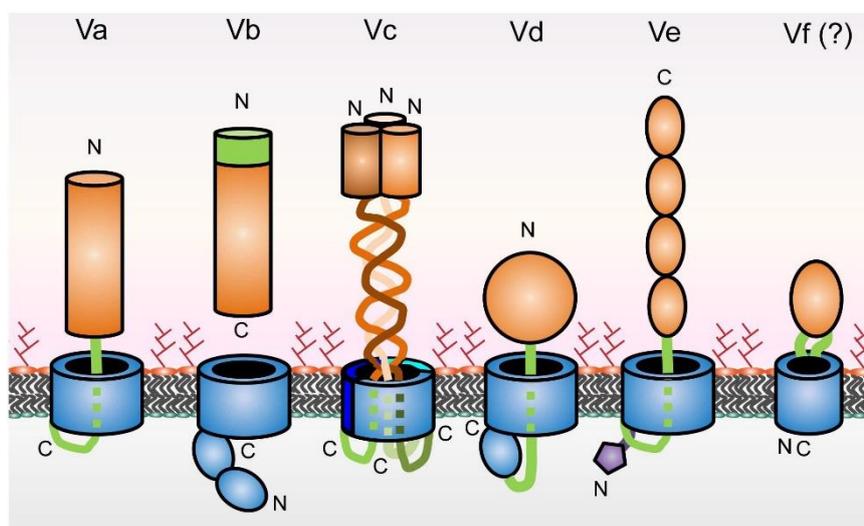


Figure 12. Système de sécrétion de type V.
(Meuskens et al., 2019).

Va)

Le système de sécrétion de type Va est plus communément appelé « autotransporteur classique ». Le premier membre de cette famille à avoir été décrit est la protéase IgA de *Neisseria gonorrhoeae*, qui clive spécifiquement les immunoglobines humaines de type A1.

La protéine est constituée de trois domaines fonctionnels : un peptide signal en partie N-terminale qui permet le passage à travers la membrane interne, le domaine C-terminal appelé le domaine « helper » qui permet la sécrétion dans le milieu extracellulaire en formant un pore dans la membrane externe et le domaine protéase (Pohlner et al, 2017).

Depuis, de nombreuses protéines autotransportrices ont été identifiées, toutes organisées de la même manière. Elles possèdent ces trois domaines, la partie C-terminale de la protéine étant responsable de la formation du pore et la partie N-terminale étant exportée à travers la membrane externe. Dans la plupart des cas, le domaine passager du polypeptide est autoclivé, ce qui relargue le domaine exporté dans le milieu extérieur. Cependant, il est possible que le domaine ne soit pas autoclivé et que la protéine reste ancrée à la membrane externe. Généralement, les systèmes Va relargués ont des activités enzymatiques et ceux ancrés dans la membrane fonctionnent comme des adhésines (Fan E et al, 2016).

Vc)

Le système de sécrétion de type Vc est le plus complexe et est organisé en trimère. La plupart des systèmes Vc étudiés jusqu'à présent sont des adhésines, c'est pourquoi ce système a été renommé « adhésines trimériques autotransporteuses » (Meuksens et al, 2019).

La protéine YadA de *Yersinia* est une protéine très bien étudiée de cette famille. Elle est composée de trois chaînes peptidiques identiques et prennent la forme d'un β -barrel de 12 brins (4 par monomère) en partie C-terminale et un domaine passager. Il a été montré que l'assemblage de ces trimères était dépendant du complexe BAM (β -barrel assembly machinery), qui sera décrit dans la partie suivante (Lehr et al., 2010).

La structure de la partie C-terminale de la protéine HiA d'*H. influenzae* a été résolue (**Figure 13**). Cette partie correspond au domaine translocateur de la protéine et à une partie du domaine passager, exporté à travers la membrane. Cela a permis de montrer que la structure du domaine translocateur était composé de 4 brins de trois sous-unités qui forment un β -barrel de 12 brins. Ce domaine forme un canal de 1,8 nm de diamètre, traversé par les trois hélices α N-terminales de chaque unité. De plus, cette étude a permis de montrer que la trimérisation du domaine translocateur est essentielle pour l'activité translocatrice (Meng et al, 2006).

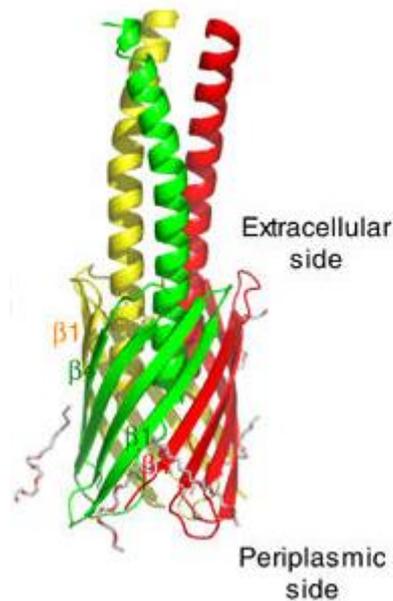


Figure 13. Structure de la partie C-terminale de HiA.
(Meng et al, 2006)

Vd)

Les protéines du sous-type de sécrétion Vd peuvent être décrites comme hybrides entre celles du système Va et celles du système Vb. En effet, elles sont composées d'une partie C-terminale impliquée dans la translocation et une partie N-terminale qui est le domaine passager de la protéine, comme les protéines Va. Cependant, la partie C-terminale des protéines Vd forme un baril β à 16 brins qui est similaire à celui des transporteurs TpsB du système Vb, et les protéines Vd possèdent un domaine périplasmique POTRA homologue aux domaines POTRA des protéines TpsB. Les premières protéines de ce systèmes à avoir été étudiées sont PlpD de *P. aeruginosa* et FplA de *Fusobacterium nucleatum*. Elles ont toutes les deux une activité de lipase, comme la plupart des protéines de cette famille décrites jusqu'à présent. (Fan E et al, 2016 ; Meuskens et al, 2019).

Ve)

Les protéines du système de sécrétion de type Ve sont appelées autotransporteurs inversés, puisqu'elles ressemblent aux Va mais avec un ordre des domaines inversés. En effet, le domaine β -barrel est situé dans la partie N-terminale et le domaine passager dans la partie C-terminale. Certains systèmes Ve possèdent un domaine périplasmique qui n'est pas présent dans les autres sous-systèmes du type V. Ce domaine faciliterait la dimérisation de la protéine et jouerait un rôle dans l'interaction avec le peptidoglycane (Meuskens et al, 2019). Le domaine

passager des protéines V e possède généralement des domaines de types Ig ou de type lectine.

Vf)

Plus récemment, un nouveau sous-type de famille d'autotransporteurs a été suggéré, nommé Vf. La protéine BapA est le membre prototypique et a été décrit chez *Helicobacter pylori*. Les protéines de cette nouvelle classe ont un domaine β -barrel à 8 brins, et ne contiennent aucun passager supplémentaire à l'une ou l'autre extrémité de la protéine. Elles possèdent un domaine exposé à la surface inséré dans la région N-terminale entre le premier et le deuxième brin β du domaine β -barrel, qui correspondrait au domaine passager. Ainsi, le domaine passager proposé serait une boucle étendue du domaine β -barrel. De plus, le domaine β -barrel est plus petit que celui de tous les autres autotransporteurs. L'appartenance de cette nouvelle classe d'autotransporteurs au système de sécrétion de type V est encore discutée (Meuksens et al, 2019).

Vb)

Dans le cas du sous-type b de système de sécrétion V (Vb ou TPS), le système est constitué de deux protéines : un transporteur appelé TpsB et une protéine effectrice appelée TpsA. C'est un système présent chez de nombreuses bactéries à Gram-négatif, pathogènes et environnementales (Fan et al., 2016; Jacob-Dubuisson et al., 2013). La première étape consiste au passage des deux protéines TpsA et TpsB vers le périplasma à travers la membrane interne de la bactérie, ce qui se fait par le système général de sécrétion, Sec (general Secretion route). Les protéines sécrétées par le système Sec sont d'abord produites dans le cytoplasme sous forme de pré-protéines, comportant une séquence appelée « peptide signal » dans la partie N-terminale, en amont de la protéine mature. Lorsque cette séquence est détectée, les pré-protéines sont prises en charge par la chaperonne SecB qui amène les pré-protéines non repliées à l'ATPase SecA, qui propulse la pré-protéine dans le pore formé par le translocon SecYEG. Des protéases présentes dans le périplasma clivent le peptide signal immédiatement après la translocation dans le périplasma (Tsirigotaki et al., 2017). Les deux protéines TpsA et TpsB restent dénaturées dans le périplasma. Les protéines TpsA formant de long solénoïdes β , se replient généralement lentement et forment rarement des agrégats, ce qui est favorable à ce type de sécrétion. Cependant, certaines protéines TpsA ont besoin de chaperonnes pour pouvoir être sécrétées à travers la membrane externe depuis le périplasma (Baud et al., 2009). Pour la deuxième étape, qui est le passage à travers la membrane externe, la protéine TpsB forme un canal dans la membrane externe. La protéine

TpsA interagit avec son transporteur et est exportée à travers la membrane externe par le canal formé par TpsB (**Figure 14**). Deux modèles ont été proposés pour la translocation. Dans le premier modèle, la protéine TpsA est transloquée en commençant par la partie N-terminale, qui est poussée lorsque le reste de la protéine passe à travers la membrane externe progressivement et qui initie le repliement de la protéine à la surface de la bactérie. Dans le modèle alternatif en "épingle à cheveux", l'extrémité N-terminale de TpsA reste attachée à TpsB pendant la sécrétion et la protéine est sécrétée progressivement sous la forme d'une épingle (Guérin et al., 2017). Dans les deux modèles, la protéine TpsA se replie progressivement lors de la sécrétion à la surface de la bactérie. La protéine peut ensuite être relarguée dans le milieu extracellulaire, comme la protéine FHA (Mazar and Cotter, 2006) ou restée accrochée à la surface comme les adhésines HMW1 et HMW2 (Buscher et al., 2006). Plusieurs modèles ont été proposés pour la sécrétion de FHA, la translocation se ferait soit par la partie N-terminale, soit en épingle à cheveux. Dans les deux cas, des protéases permettraient de cliver et de relarguer la protéine mature FHA (Nash and Cotter, 2019). Concernant l'ancrage à la membrane, une étude a montré que l'ancrage de HMW1 à la membrane externe nécessite les 20 acides aminés C-terminaux de la protéine et dépend de la formation d'une liaison disulfure entre deux résidus cystéines conservés dans cette région. C'est l'extrémité C-terminale de HMW1 qui occupe le pore formé par le transporteur HMW1B, ancrant la protéine à la surface bactérienne (Buscher et al., 2006).

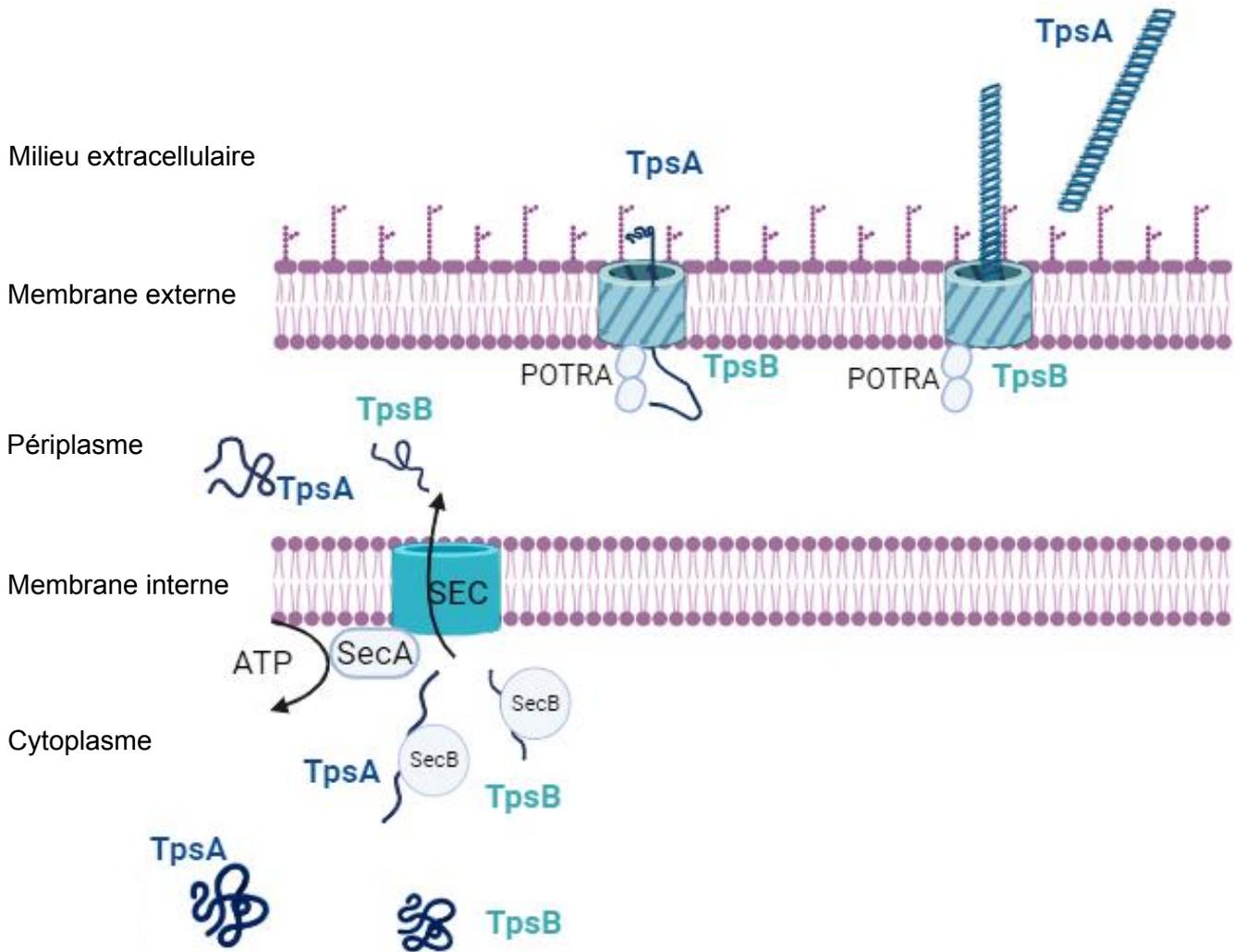


Figure 14. Mécanisme du système de sécrétion à deux partenaires (TPS).

Les pré-protéines TpsA et TpsB sont synthétisées dans le cytoplasme puis secrétées dans le périplasm par la voie Sec. Les pré-protéines sont clivées et les protéines TpsA et TpsB restent non repliées dans le périplasm. La protéine TpsB forme un canal dans la membrane externe et la protéine TpsA est transloquée et se replie au fur et à mesure de sa translocation. La protéine TpsA est soit relarguée dans le milieu extracellulaire, soit reste ancrée dans la membrane externe. Réalisé sur biorender.com.

III.2 Caractéristiques des protéines TpsB

Les protéines TpsB font partie de la famille des Omp85. Cette superfamille regroupe de nombreuses protéines répandues chez les bactéries Gram-négatives. Les protéines de la famille Omp85 possèdent au moins un domaine POTRA (Polypeptide Transport-Associated) situé dans le périplasm (Gentle et al., 2005). De plus, l'ensemble des protéines appartenant à cette famille possèdent un β -barrel à 16 brins au niveau de leur partie C-terminale, qui s'insère dans la membrane externe. Même si la fonction de nombreuses protéines de cette

famille reste inconnue, celles qui ont été caractérisées participent à l'insertion d'autres protéines dans la membrane externe ou à la translocation d'une autre protéine à travers la membrane externe, ou les deux. Chez les bactéries Gram-négatives, BamA est une protéine de la famille Omp85 très conservée qui fait partie de la machinerie BAM. Ce système est composé de plusieurs oligomères et permet l'insertion de protéines β -barrel dans la membrane externe des bactéries Gram-négatives (Doyle et al, 2022). Il a été montré que BamA permettait également le transport de protéines à travers la membrane externe (Doyle et al, 2021). Contrairement à la plupart des protéines de la membrane externe, BamA possède une jonction β instable entre le brin $\beta 1$ et le brin $\beta 16$. Plusieurs structures résolues ont permis de mettre en évidence la dynamique de cette jonction β de BamA, qui peut se trouver dans une conformation latérale fermée ou dans une conformation latérale ouverte. Dans le premier cas, l'intérieur du domaine β barrel est ouvert au périplasm. Dans le deuxième cas, il est ouvert au milieu extérieur (Doyle et al, 2022). Iadanza et al ont résolu la structure du complexe BAM dans des nanodisques lipidiques (**Figure 15**) et ont montré que le nanodisque lipidique était déformé autour de BAM, démontrant l'activité de disruptase lipidique du complexe BAM (Iadanza et al, 2020).

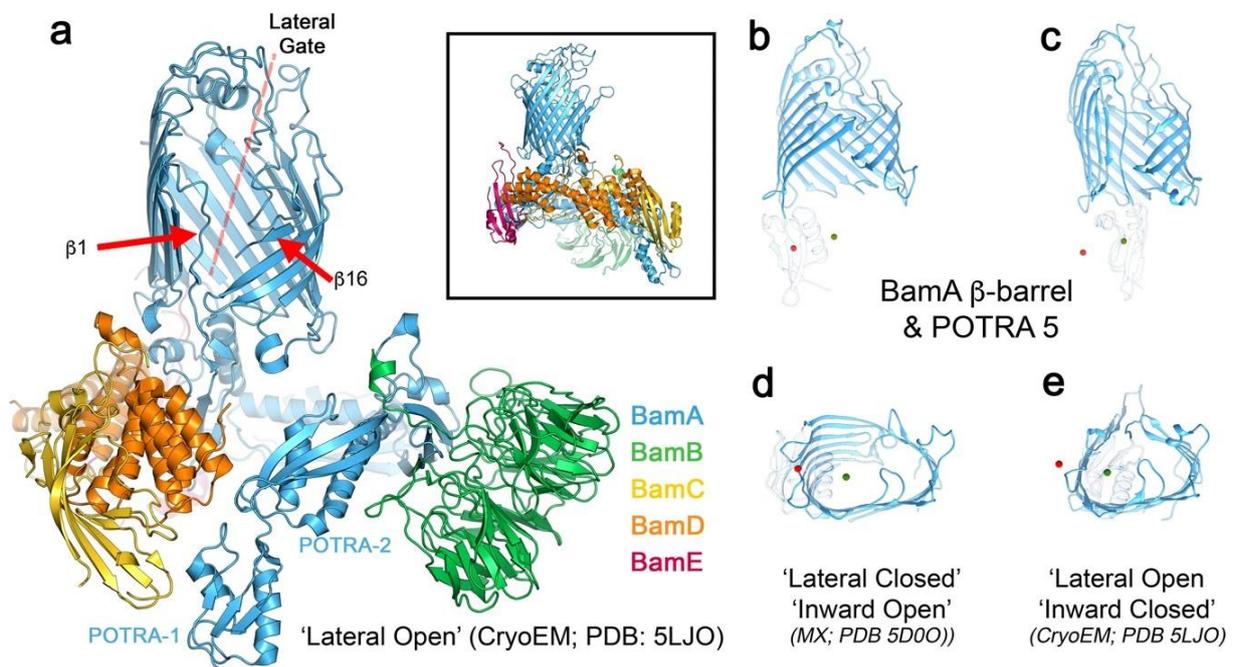


Figure 15. Structure du complexe BAM. (Iadanza et al, 2020).

Structure cryo-EM du complexe BAM dans la conformation latérale ouverte. Les brins $\beta 1$ et $\beta 16$ sont indiqués. L'encadré montre la structure du complexe BAM dans la conformation latérale fermée. Les autres panels montrent la structure de la protéine BamA dans les conformations latérale ouverte ou latérale fermée, selon différents angles.

Le complexe BAM interagit avec de nombreux autotransporteurs, facilitant leur insertion dans la membrane externe. En effet, il a été montré que le domaine β barrel à 12 brins se replie et s'insère dans la membrane externe avec l'aide du complexe BAM. De même, les autotransporteurs de type Vc et Ve interagissent avec le complexe BAM comme cela a été montré pour certains (Meuksens et al, 2019). Concernant le type Vb, une étude *in vitro* a montré que TpsB s'insérait dans la membrane externe par le complexe BAM, comme c'est le cas pour de nombreuses protéines de la membrane externe (Norell et al, 2014). Cependant, la translocation de TpsA à travers la membrane externe est uniquement due à la présence de TpsB (Fan et al, 2012).

Une autre protéine de la superfamille Omp85 est TamA. Elle fait partie du complexe TAM, pour « translocation assembly module » en anglais. Ce complexe est composé de la protéine TamA et de TamB qui est ancrée dans la membrane interne. La structure de TamA est connue, la protéine est composée d'un domaine β barrel à 16 brins transmembranaire et de trois domaines POTRA situés dans le périplasma. Contrairement au complexe BAM, TAM n'est pas essentiel à la viabilité des bactéries et est moins abondant que le complexe BAM. Cependant, il a été montré que des bactéries déficientes en TAM étaient moins virulentes et avaient plus de difficultés pour coloniser leur hôte, chez plusieurs pathogènes Gram-négatifs. (Stubenrauch et al, 2018).

Contrairement à BamA et TamA, les protéines TpsB ont pour unique fonction la translocation de la protéine TpsA à travers la membrane externe. Elles ont une structure qui diffère de BamA et de TamA. Elles ont notamment un joint β stable et une hélice α intégrée (H1) qui est connectée à l'extrémité N-terminale des domaines POTRA périplasmiques. Elles possèdent également des boucles extracellulaires qui ressemblent à celles présentes chez BamA et qui permettraient la diffusion de protéines à travers la membrane externe (Doyle et al, 2022). Plusieurs structures de transporteurs de cette famille ont été résolues et montrent qu'ils partagent des caractéristiques structurales majeures (Guérin et al., 2017). La majorité des protéines TpsB ont une taille comprise entre 500 et 800 acides aminés, mais certaines sont plus larges et peuvent dépasser 1000 résidus (Yen et al., 2002). Elles ont des séquences très conservées, en particulier leur partie C-terminale (Mazar and Cotter, 2007). La structure de la protéine FhaC, qui permet la sécrétion de FHA de *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) a été résolue (**Figure 16**) et sert d'exemple pour décrire les protéines TpsB (Clantin et al., 2007).

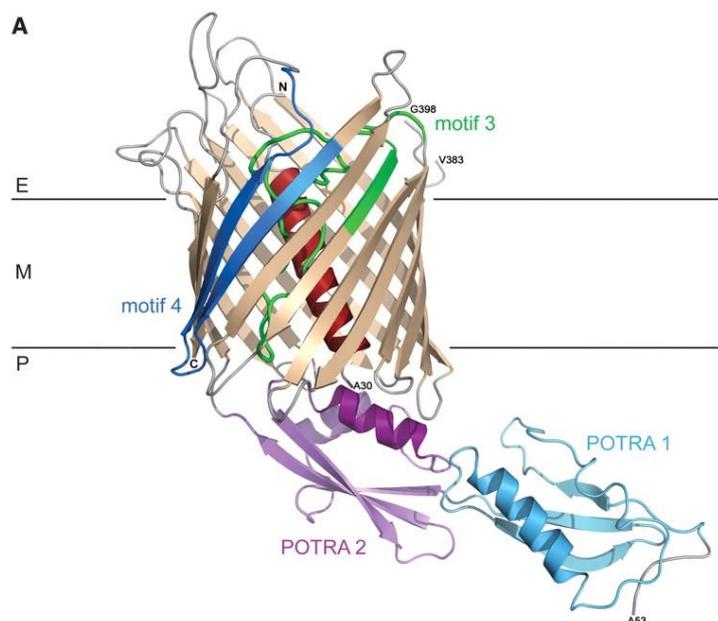


Figure 16. Structure de FhaC.

FhaC se replie en un tonneau β , ancré dans la membrane externe. Les domaines périplasmiques POTRA1 et 2 impliqués dans la sécrétion de FHA sont indiqués (Clantin et al., 2007).

FhaC forme un tonneau β de 35 Å, composé de 16 feuillets β antiparallèles avec un indice de cisaillement de 20. Ce tonneau est formé par les résidus 209 à 554. L'intérieur du tonneau est très hydrophile, du fait des 17 résidus chargés qui pointent vers l'intérieur. La partie N-terminale de la protéine constitue une hélice extracellulaire (H1, indiquée en rouge) qui pointe vers l'intérieur du tonneau β . Une boucle, indiquée en vert se replie également dans le pore. La protéine possède deux domaines situés dans le périplasma, associés au transport des polypeptides, appelés POTRA1 et POTRA2. Ils sont les deux composés de 75 résidus (de 59 à 134 et de 135 à 208, respectivement) et ont la même topologie. Ils possèdent une hélice α et un feuillet β à trois brins. Cependant, ils ne sont similaires qu'à 14% en termes de séquence. Une mutation de ces domaines abolit la sécrétion de FHA, sans empêcher la formation du pore dans la membrane (Clantin et al., 2007). Les domaines POTRA sont donc essentiels pour la sécrétion, et il a été montré dans d'autres systèmes que les domaines POTRA reconnaissent leur partenaire TpsA (Guerin et al., 2017).

Un modèle a été proposé dans lequel le transporteur FhaC alterne entre une position ouverte et fermée en l'absence du substrat. La conformation ouverte se stabilise lorsque le domaine TPS du substrat se lie aux domaines POTRA, ce qui permet à la protéine FHA de passer à travers le canal (Nash and Cotter, 2019).

III.3 Caractéristiques des protéines TpsA

Les protéines TpsA ont des fonctions variées. Elles peuvent être impliquées dans l'adhésion, la cytolysse des cellules hôtes ou l'inhibition de la croissance d'autres bactéries (Contact-dependent growth inhibition (CDI)), comme cela sera décrit dans la partie suivante. Ce sont de larges protéines de plus de 100 kDa. Elles ont toutes une séquence homologue dans leur partie N-terminale, une région d'environ 250 acides aminés appelée le domaine TPS (Guérin et al., 2017). Enfin, la plupart des protéines TpsA contiennent des tronçons de séquences répétées prédites pour former des structures β -hélicoïdales ou β -solénoïdes (Kajava and Steven, 2006).

Le domaine TPS a été identifié comme étant la région minimale pour la sécrétion des protéines TpsA. Cette région est responsable de l'interaction de la protéine effectrice avec son transporteur dans le périplasma avec les domaines POTRA et permet la sécrétion mais aussi le repliement de la protéine à la surface de la bactérie (Guerin et al., 2017). A part le domaine TPS, les protéines ont des séquences très différentes, surtout dans la partie C-terminale. *P. aeruginosa* sécrète 5 protéines TpsA (Figure 17), qui appartiennent à différentes familles de TPS qui sont décrites dans la partie suivante.

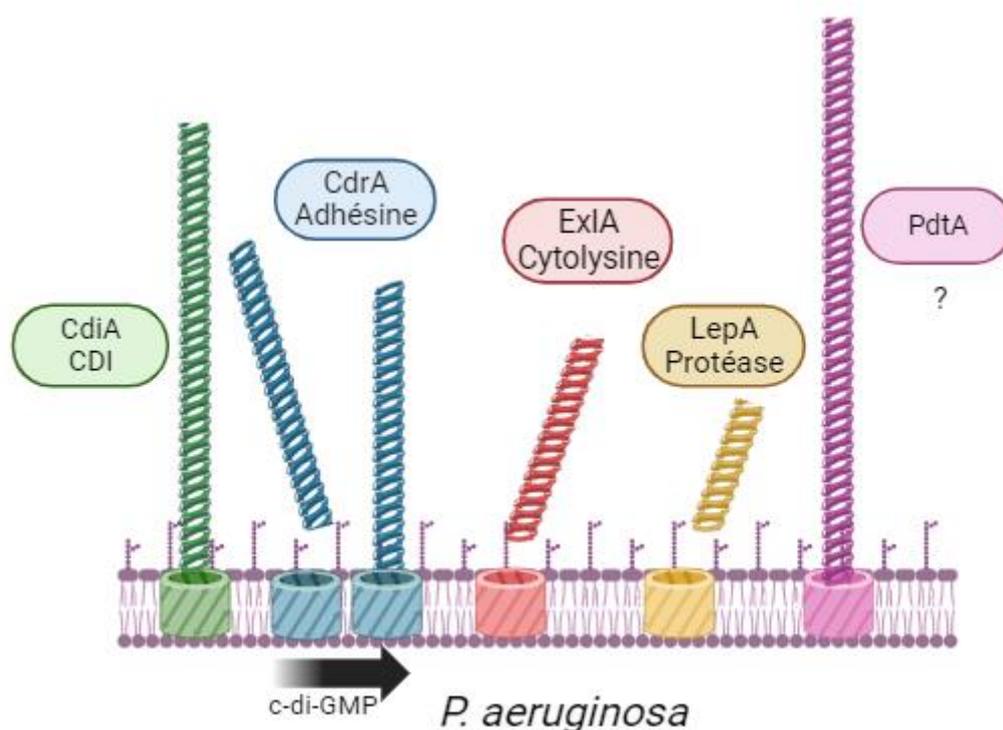


Figure 17. TPS identifiés chez *P. aeruginosa*.

Représentation des 5 systèmes TPS identifiés chez *P. aeruginosa*. Réalisé sur biorender.com.

III.4 Différentes familles de TpsA

a) Cytolysine/hémolysine

Certaines protéines TpsA ont une activité de cytolysine et/ou hémolysine (destruction des cellules du système immunitaire et globules rouges).

➤ ShIA

La première à avoir été caractérisée est ShIA, chez la bactérie *Serratia marcescens*. Cette protéine est capable de former un pore dans la membrane des globules rouges mais également des cellules épithéliales (Hertle et al., 1999). De plus, il a été montré que ShIA était un facteur majeur de la virulence de *S. marcescens* dans trois modèles : souris, *Caenorhabditis elegans*, et *Drosophila melanogaster*. ShIA peut également induire l'autophagie chez les cellules épithéliales (Di Venanzio et al., 2014). En plus de sa fonction de transporteur, ShIB est nécessaire pour l'activation de la protéine ShIA. En effet, l'interaction de ShIA avec son transporteur ShIB impose un changement conformationnel qui permet à ShIA d'exercer son activité de cytolysine (Walker et al., 2004). D'autres toxines de la même famille ont été identifiées dans d'autres espèces bactériennes comme PhIA de *Photobacterium luminescens* (Brillard et al., 2002), HpmA de *Proteus mirabilis* (Swihart and Welch, 1990), EthA de *Edwardsiella tarda*, (Hirono et al., 1997) et HhdA de *Haemophilus ducreyi* (Palmer and Munson, 1995) (Wood et al., 1999).

➤ ExIA (*P. aeruginosa*)

Chez *P. aeruginosa*, une toxine homologue à ShIA (35% d'identité) a été identifiée en 2014 chez une souche ne possédant pas le locus du SST3. Cette protéine montre la même activité que son homologue ShIA. Elle a été nommée ExIA pour Exolysine A (Elsen et al., 2014). Le mécanisme d'action d'ExIA a été décrypté. La protéine forme un pore dans la membrane des cellules hôtes, ce qui provoque un afflux de calcium. Ce signal active la protéase ADAM-10 qui clive la E-cadhérine, protéine responsable de la jonction cellule-cellule. Les cellules se détachent alors les unes des autres, s'arrondissent et perdent l'intégrité de leur barrière tissulaire. Ce mécanisme est également enclenché par ShIA (E. Reboud et al., 2017). De plus il a été montré que la présence des pili, qui permettent aux bactéries de s'approcher et de s'accrocher aux cellules hôtes est nécessaire pour qu'ExIA soit active (Pauline Basso et al., 2017).

La régulation d'ExIA a également été décryptée. Le facteur de transcription Vfr se lie au promoteur de l'opéron *ex/BA* en présence du second messager cAMP (Berry et al., 2018). De

plus, un autre facteur de transcription, ErfA, inhibe fortement l'expression de l'opéron *exlBA*. (Trouillon et al., 2020). Une étude plus récente a montré que la fonctionnalité d'ExlA n'est que partiellement conservée dans plusieurs espèces de *Pseudomonas* (ce travail, résultats partie II)(Job et al., 2022)).

b) Inhibition de croissance due au contact (CDI)

Un des mécanismes importants lors de la compétition inter-bactérienne est appelé « contact-dependent-growth Inhibition » (CDI). En effet, au sein d'une niche, plusieurs micro-organismes coexistent, en compétition les uns avec les autres pour pouvoir survivre et coloniser l'hôte. Plusieurs stratégies sont employées par les micro-organismes afin de se donner un avantage par rapport aux autres, dont le CDI. Le phénotype CDI est médié par trois protéines : CdiA, CdiB et CdiI. La protéine CdiA est exportée à la surface de la bactérie par CdiB. CdiA se fixe à la cellule hôte et clive ensuite sa partie C-terminale de manière auto protéolytique. Ce domaine est ensuite transloqué dans le cytoplasme de l'hôte, ce qui entraîne une perturbation des processus intracellulaires de l'hôte (Ruhe et al., 2018; Webb et al., 2013). La protéine immunitaire CdiI neutralise la toxicité de CdiA, permettant aux souches produisant CdiA de survivre et de tuer sélectivement les autres souches présentes dans l'environnement (Willett et al., 2015). La **figure 18** résume le fonctionnement des systèmes CDI : la bactérie sécrète la protéine CdiA qui se clive et est exportée dans une autre bactérie. Les bactéries ayant elles aussi le système CDI produisent la protéine CdiI qui inactive la protéine CdiA. La protéine CdiA est active dans les autres bactéries et peut avoir différentes activités selon les systèmes ayant un impact négatif sur la croissance des bactéries.

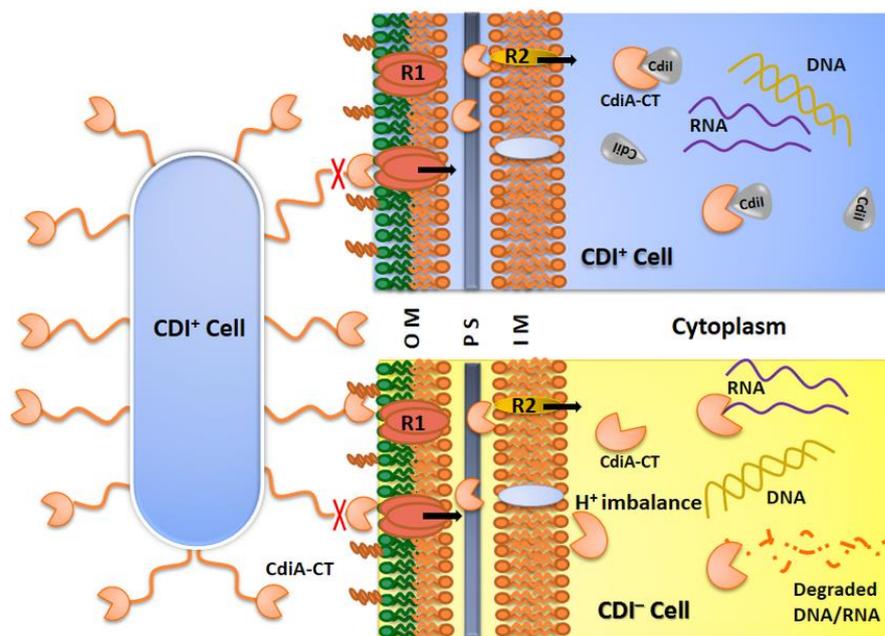


Figure 18. Mécanisme des systèmes CDI.

Une bactérie CDI⁺ produit la protéine CdiA, qui est exportée par CdiB. La protéine auto-clive sa partie C-terminale, qui est transloquée dans le cytoplasme d'une autre bactérie. Si la bactérie possède également le système CDI, elle produit la protéine CdiI qui inactive CdiA. Sinon, la protéine CdiA peut avoir plusieurs effets, néfastes pour la bactérie cible. (Kaundal et al., 2016)

Le premier CDI a été identifié chez *E. coli* (Aoki et al., 2005) dans la souche EC93, qui présentait un avantage à d'autres souches de *E. coli* en induisant la mort d'autres souches lors d'une co-culture. Cependant, l'inhibition de la croissance des autres souches n'était pas liée à la production des peptides antimicrobiens habituellement responsables de ce phénotype. De plus, l'inhibition de la croissance des autres bactéries n'était possible que lorsque les bactéries étaient en contact. Trois gènes, nommés *cdiA*, *cdiB* et *cdiI* ont été identifiés comme nécessaires et suffisants pour rendre d'autres souches de *E. coli* CDI⁺. De plus, dans cette souche, il a été montré que CdiA se lie aux bactéries présentes dans le milieu par son récepteur, la protéine BamA (Aoki et al., 2008; Ruhe et al., 2015). Les récepteurs membranaires des protéines CdiA de la plupart des systèmes restent cependant inconnus (Guérin et al, 2017).

L'activité de CdiA réside dans sa partie C-terminale, dont la séquence diffère d'une bactérie à l'autre, de même que la séquence de *cdiI*. La taille des protéines CdiA varie également selon les espèces et les souches. Elles ont un poids moléculaire compris entre 250 et 630 kDa (Willett et al., 2015). Elles ont également des activités différentes. La première protéine CdiA identifiée chez *E. coli* EC93 est une toxine qui forme un pore dans la membrane de son hôte. D'autres protéines CdiA ont des activités de nucléases (Zhang et al., 2012). Certaines

protéines CdiA ont été décrites comme ayant des propriétés adhésives pouvant être impliquées dans la formation de biofilm, comme cela a été montré chez *Burkholderia thailandensis* (Garcia et al., 2013). Des systèmes CDI permettant la communication entre les bactéries d'une même communauté ont été identifiés (Danka et al., 2017; Garcia et al., 2016).

P. aeruginosa possède également un ou deux CDI, selon la souche (Allen and Hauser, 2019). Les protéines CdiA1 et CdiA2 inhibent la croissance des autres bactéries et ont également des propriétés adhésives. Elles sont impliquées dans l'adhésion des bactéries entre elles et les bactéries mutantes ne produisant pas CdiA1 et 2 forment moins de biofilm (Mercy et al., 2016).

c) Adhésines

Plusieurs protéines TpsA montrent une activité d'adhésion, soit sur les cellules eucaryotes, soit sur d'autres cellules procaryotes, soit sur des composants comme les polysaccharides par exemple.

➤ FHA

L'adhésine la plus étudiée est la protéine FHA de *B. pertussis*, la bactérie responsable de la coqueluche. La protéine mature FHA de 220 kDa est obtenue à partir de son précurseur FhaB de 367 kDa. Le précurseur FhaB est transloqué à travers la membrane externe par le transporteur FhaC, puis la protéine mature FHA est sécrétée par le clivage de la partie C-terminale de FhaB. La protéine FHA permet l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales et aux macrophages (Julio et al., 2009). FHA adhère également sur des surfaces abiotiques et peut promouvoir l'adhésion inter-bactérienne, ce qui est important pour la formation d'un biofilm mature (Locht et al., 1993; Serra et al., 2011). De plus, la protéine module la réponse immunitaire (Scheller and Cotter, 2015) et il a été montré que la protéine FhaB jouait un rôle dans la persistance de *Bordetella bronchiseptica* dans les voies respiratoires inférieures. Des anticorps anti-FHA protègent d'une colonisation par la bactérie, et FHA est l'un des antigènes utilisés dans les vaccins développés contre la coqueluche (Lambert, 2014).

➤ HMW1 et HMW2

HMW1 et HMW2 d'*H. influenzae* sont de larges adhésines, de 125 kDa et 120 kDa respectivement, et présentant 80% de similarité entre elles (Ecevit et al., 2004). Ces deux protéines sont exportées à la surface des bactéries par leur transporteur et sont ancrées dans la membrane externe, exposées à la surface (Buscher et al., 2006). Ce sont les adhésines

prédominantes dans 75 à 80% des souches d'*H. influenzae*. Il a été montré que ces adhésines permettaient l'adhésion aux cellules épithéliales et favorisaient la colonisation des voies respiratoires dans un modèle de macaques (Rempe et al., 2016). Ces adhésines permettent également l'adhésion des bactéries aux macrophages (Noel et al., 1994) ainsi qu'aux cellules épithéliales (St Geme et al., 1993). Des sérums de patients, enfants et adultes, ayant été infectés par *H. influenzae*, présentent des anticorps dirigés contre les protéines HMW1 et 2, montrant que ces adhésines sont très immunogènes. Etant donné leur localisation à la surface des bactéries, la conservation de ces protéines parmi plusieurs souches et leur rôle dans l'adhésion et la colonisation des voies respiratoires en font de bonnes cibles pour le développement d'un vaccin. Des études ont montré que les anticorps obtenus chez des cochons d'Inde immunisés avec les protéines purifiées provoquaient la destruction par opsono-phagocytose de la plupart des souches testées (Kadry et al., 2021; Winter and Barenkamp, 2016, 2014). Une étude *in vivo* d'immunisation de souris avec les protéines HMW1 et HMW2 a montré que même si les anticorps développés étaient spécifiques d'une souche, l'immunisation protège de la colonisation par différentes souches d'*H. influenzae* (Kadry et al., 2021).

➤ CdrA

P. aeruginosa possède une adhésine sécrétée par le système TPS, appelée CdrA (pour cyclic diguanylate-regulated TPS partner A). Cette protéine de 220 kDa a été nommée ainsi car sa production et son adressage à la membrane externe dépendent du second messager c-di-GMP (Borlee et al., 2010). Une fois exportée à la membrane externe par son transporteur CdrB, CdrA est ancrée dans la membrane externe par sa partie C-terminale. Lorsque la concentration en c-di-GMP est faible, la protéase LapG clive la protéine CdrA associée aux bactéries, au niveau de la partie C-terminale, produisant un domaine de 5 kDa. Le reste de la protéine CdrA est relargué dans le milieu (Cooley et al., 2016; Rybtke et al., 2015). CdrA est donc retrouvée associée aux bactéries mais également relarguée dans le milieu extracellulaire. La structure tertiaire de CdrA a été prédite et montre que la protéine formerait une longue structure en forme de solénoïde avec plusieurs boucles exposées contenant des hélices α (**Figure 19, A**)(Borlee et al., 2010). La protéine exposée à la surface des bactéries a été identifiée par microscopie électronique (**Figure 19, B**). CdrA forme une structure qui s'étend à partir de la membrane externe, et permet la jointure de deux bactéries produisant chacune CdrA à leur surface (Melia et al., 2021). La forme de CdrA observée par microscopie électronique correspond au modèle obtenu.

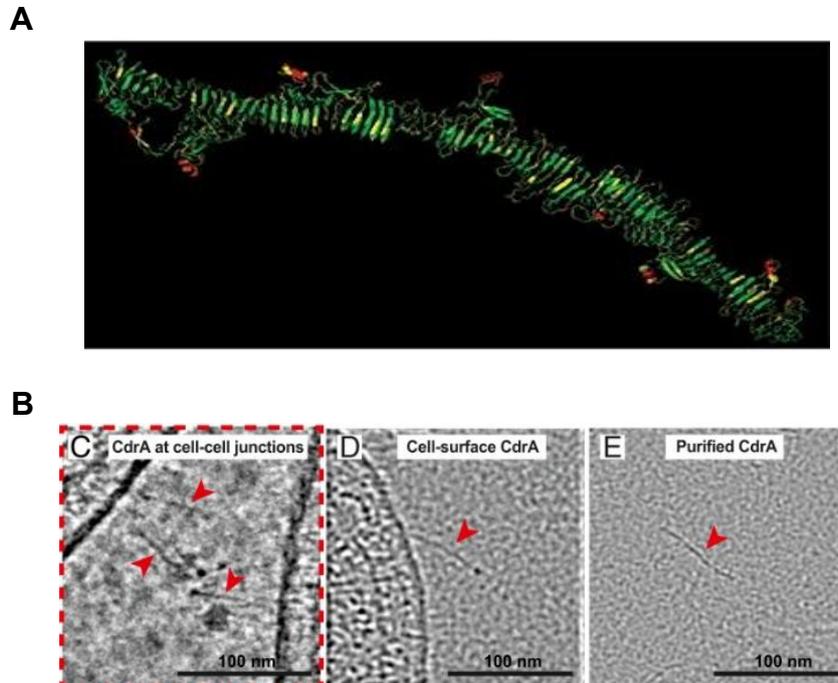


Figure 19. Structure de CdrA.

A. Structure tertiaire prédite de CdrA. (Borlee et al., 2010). **B.** Visualisation de CdrA par microscopie électronique (Melia et al., 2021).

CdrA permet de former un biofilm mature et stable d'une part grâce à des interactions homotypiques (Reichhardt et al., 2018) qui permettent aux bactéries de s'auto-agréger mais également par le biais d'interactions avec le polysaccharide Psl (Borlee et al., 2010) ou avec Pel selon les souches (Reichhardt et al., 2020). De plus, les anticorps ayant une haute affinité avec CdrA permettent d'inhiber l'activité de CdrA. En présence des anticorps, les bactéries ne s'agrègent plus et se retrouvent à l'état planctonique. Ces anticorps sont donc fonctionnels et permettent d'empêcher la formation d'agrégats et de biofilm. De plus, les bactéries traitées avec les anticorps étaient à nouveau susceptibles au traitement antibiotique alors qu'elles y étaient résistantes sous forme de biofilm. Ceci suggère que les adhésines impliquées dans la formation d'agrégats et de biofilm comme CdrA peuvent être de bonnes cibles pour le traitement des infections et éviter la formation de biofilms résistants aux antibiotiques (Melia et al., 2021).

D'autres adhésines sécrétées par le système TPS ont été identifiées comme HrpA de *Neisseria meningitidis* (Neil and Apicella, 2009; Schmitt et al., 2007) et EtpA de *E. coli* (Roy et

al., 2009). Toutes ces adhésines ont donc des cibles différentes et permettent l'interaction des bactéries avec divers partenaires ou surfaces.

d) Autres TPS

La protéine HxuA sécrétée par le système TPS est impliquée dans l'acquisition de fer par la bactérie *H. influenzae*. L'hème est une source importante de fer pour les bactéries, qui sont capables de le dégrader pour récupérer le fer. La protéine HxuA, qui est transloquée à la membrane externe par son transporteur HxuB, reste associée à la surface. Elle se lie aux complexes hème-hémopoxine, ce qui facilite la distribution de l'hème à *H. influenzae*. En effet, l'hémopoxine est une glycoprotéine impliquée dans le recyclage de l'hème. En interagissant avec ce complexe, HxuA permet la libération de l'hème qui peut ensuite être importé dans la bactérie par le biais de HxuC (Fournier et al., 2011).

La protéine LepA, sécrétée par LepB chez *P. aeruginosa* est une large exoprotéase de 100 kDa. Cette protéine TpsA est relarguée dans le milieu extracellulaire et il a été montré qu'elle induisait une réponse inflammatoire par le biais des récepteurs activés par des protéases (PAR en anglais) (Kida et al., 2008). De plus, LepA augmente la virulence et la croissance de *P. aeruginosa* dans un modèle *in vivo* chez la souris (Kida et al., 2011).

V. Objectifs de la thèse

Mon travail de thèse a pour objectif de mieux comprendre le rôle de protéines sécrétées par le système TPS chez *P. aeruginosa*. Le premier projet vise à étudier la protéine PdtA, sécrétée par son transporteur PdtB chez *P. aeruginosa* dans le but de mieux comprendre le rôle de PdtA dans la biologie de *P. aeruginosa*. Ce projet s'inscrit dans une stratégie générale d'anti-virulence, en considérant PdtA comme une cible potentielle pour le développement d'anticorps monoclonaux thérapeutiques bloquants.

Le deuxième projet dans lequel j'ai été impliquée consiste à déterminer le rôle des protéines homologues à ExlA chez plusieurs espèces de *Pseudomonas*, notamment des espèces environnementales. Nous nous sommes intéressés aux relations structure-fonction de ces protéines selon les espèces.

Résultats

Partie 1 : Rôle de PdtA dans la biologie de *Pseudomonas aeruginosa*

- I. Introduction
- II. Définition d'une souche modèle PdtA⁺
- III. PdtA est associée à la membrane
- IV. Analyse phénotypique
- V. Etude préliminaire de la structure de PdtA
- VI. Présence d'anticorps anti-PdtA dans les sérums de patients
- VII. Conclusion

Partie 2 : Etude de protéines ExIA-like chez différentes espèces de *Pseudomonas*

- I. Introduction
- II. Publication
- III. Résultats complémentaires
- IV. Conclusion

Partie 1 : Rôle de PdtA dans la biologie de *Pseudomonas aeruginosa*

I. Introduction

La protéine PdtA a été nommée et décrite pour la première fois par une équipe à Marseille (Faure et al., 2014). Dans ce travail, il a été montré que PdtA faisait partie d'un système TPS avec son transporteur PdtB. Une classification des protéines TpsA réalisée en comparant leur domaine TPS a montré que PdtA appartenait à la famille des protéines TpsA « High Molecular Weight-like » adhésines dont font partie HMW1 et HMW2 de *H. influenzae*. Ces adhésines ont des propriétés immunogènes et plusieurs études ont montré leurs effets protecteurs contre une infection par *H. influenzae* (Kadry et al., 2021; Winter and Barenkamp, 2016, 2014), (voir aussi Introduction, page 51).

Une analyse avec le logiciel InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>) a permis d'identifier un peptide signal de 38 résidus, qui permet le passage de la protéine dans le périplasme par le système Sec, comme cela a été détaillé dans l'introduction générale (III.1). Le domaine TPS, conservé parmi les protéines TpsA a été identifié (résidus 133 à 248). Ce domaine interagit avec le transporteur et est nécessaire à la sécrétion de la protéine, comme cela a été décrit dans l'introduction générale (III). Finalement, un domaine de fonction inconnu nommé DUF3739 (domaine of unknown function 3739) a été identifié dans la partie C-terminale de la protéine (résidus 3971 à 4080) (**Figure 20**).

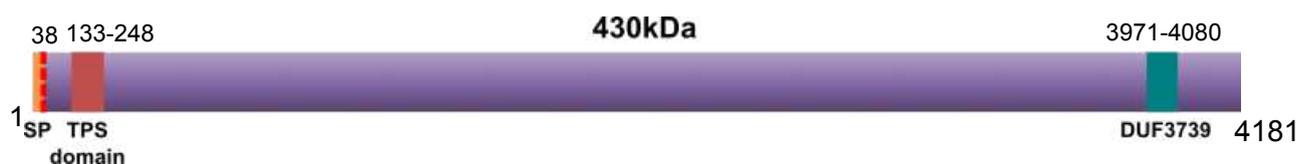


Figure 20. Domaines identifiés dans PdtA.

Les domaines identifiés avec InterProScan ont été indiqués, ainsi que les acides aminés correspondants. Le peptide signal (SP) permet à la protéine de passer la membrane interne par le système Sec. Le domaine TPS permet l'interaction avec PdtB pour le passage à travers la membrane externe. Adapté de (Faure et al., 2014).

PdtA, pour Phosphate Depletion regulated TPS partner A est régulée au niveau transcriptionnel par la limitation en phosphate organique dans le milieu. En effet, dans la souche de référence PAO1, la protéine est produite uniquement dans un milieu pauvre en phosphate. Chez l'homme, on observe une réduction en phosphate chez les patients après une intervention chirurgicale ou une chimiothérapie (Matilla et al., 2022). Chez les personnes saines, la concentration en phosphate est plus élevée et une diminution de la concentration

en phosphate est le signe d'un affaiblissement, ce qui est idéal pour les pathogènes opportunistes.

La régulation de PdtA a été décryptée lors de plusieurs études (Faure et al., 2013; Llamas et al., 2009; Quesada et al., 2016). Contrairement à la plupart des systèmes TPS, les gènes *pdtA* et *pdtB* ne sont pas codés dans le même opéron et sont séparés par le gène *phdA* (prevent-host death A) (**Figure 21**). Ce gène code pour la protéine PhdA, qui promeut la formation de biofilm en empêchant le relargage d'ADN extracellulaire en protégeant la bactérie de la lyse par un bactériophage (Petrova et al., 2011). Il a été montré que *pdtA* a son propre promoteur et *pdtB* appartient à un opéron qui commence à partir du gène *phdA* (Faure et al., 2013; Llamas et al., 2009). L'activation de ces promoteurs est assurée par le régulateur transcriptionnel PhoB et le facteur de transcription sigma σ^{Vrel} (Quesada et al., 2016).

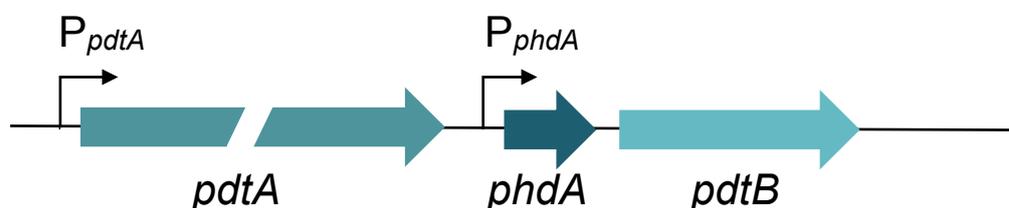


Figure 21. Organisation génétique des gènes *pdtA* et *pdtB*.

Le régulateur transcriptionnel PhoB, appartenant au système de signalisation à deux composants PhoB/PhoR est activé lorsqu'une carence en phosphate dans le milieu est détectée. PhoR phosphoryle PhoB, ce qui l'active. PhoB active ensuite l'opéron *vrelAR* (Faure et al., 2013), mais contrôle aussi directement l'expression de *pdtA* et *pdtB* en se fixant aux promoteurs de *pdtA* et de *phdA* (**Figure 22**). σ^{Vrel} est un facteur sigma de transcription, VreA est un récepteur et VreR est un anti-facteur sigma. Ensemble, ces protéines forment une voie de transduction de signal nommée PUMA3. Il a été montré que PhoB et σ^{Vrel} régulent l'expression de 25 gènes situés directement après l'opéron PUMA3, dont les gènes *pdtA* et *pdtB*. (Llamas et al 2009) (Otero-Asman et al., 2020).

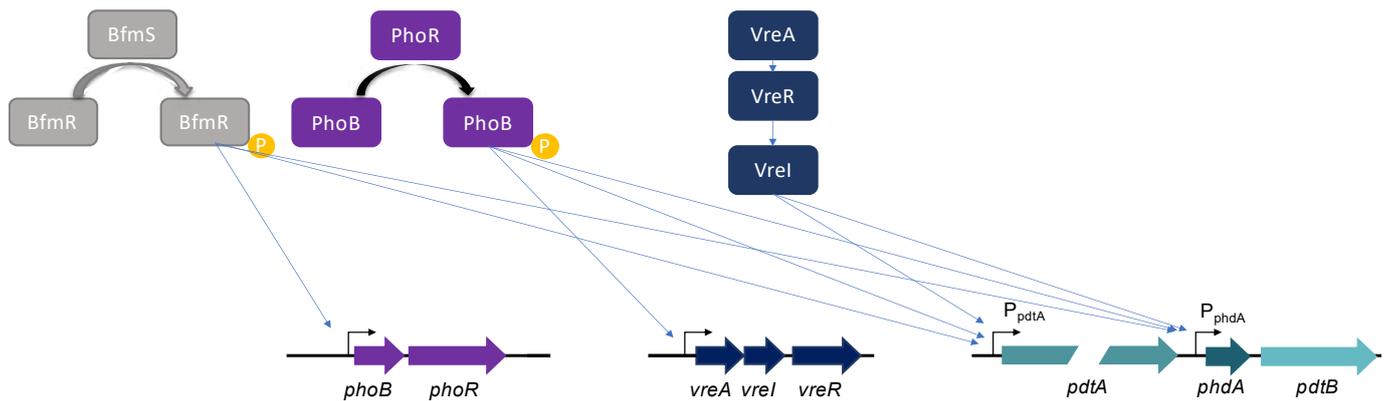


Figure 22. Régulation de PdtA par les systèmes BfmRS, PhoBR et VreAIR.

Adapté de (Trouillon et al., 2023).

Le système à deux composants BfmSR régule également *pdtA* et *pdtB*. En effet, il a été montré que BfmR se lie au promoteur de *phdA* et active son expression (Petrova et al., 2011). BfmR se lie également au promoteur de *pdtA*, ainsi que de *phoB* (K. Fan et al., 2021). Le système BfmSR régule donc directement l'expression de *pdtA* et de *pdtB* mais aussi indirectement, par le biais de PhoBR.

Une étude a montré que les gènes *pdtA* et *pdtB* sont activés pendant une infection dans un modèle de poisson-zèbre (Otero-Asman et al., 2020). De plus, des anticorps dirigés contre PdtA ont été détectés chez des patients ayant une infection aiguë et chronique à *P. aeruginosa*, suggérant que PdtA est importante pour ces deux types d'infection (Llamas et al., 2009). Cependant, l'importance de PdtA dans la virulence est controversée puisqu'elle dépend du modèle utilisé. En effet, en utilisant *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) la souche mutante $\Delta pdtA$ était moins létale que la souche sauvage, montrant l'implication de PdtA dans la virulence de *P. aeruginosa*. En revanche en utilisant le poisson-zèbre comme modèle d'infection, Llamas et al n'ont pas pu mettre en évidence le rôle de PdtA dans la virulence. En effet, la souche $\Delta pdtA$ a le même phénotype que la souche sauvage. Ils ont cependant mis en évidence l'implication de l'ensemble des gènes régulés par *vrel*. Les auteurs ont suggéré que ces gènes étaient peut-être impliqués dans la virulence par une combinaison de ces différents facteurs (Llamas et al., 2009). Les protéines HMW1 et 2 de la même famille que PdtA sont de bonnes cibles thérapeutiques et nous voulions évaluer si PdtA pourrait également être une bonne cible pour un vaccin ou pour le développement d'une thérapie à base d'anticorps monoclonaux. Il est donc nécessaire de comprendre le rôle exact de PdtA dans la biologie de *P. aeruginosa* afin de pouvoir ensuite évaluer son potentiel comme cible thérapeutique.

Ce travail s'inscrit donc dans un projet global visant à identifier et isoler des anticorps monoclonaux dirigés contre PdtA et d'évaluer leur efficacité thérapeutique. J'ai participé à l'initiation de ce projet, en mettant au point un modèle et des outils pour l'étude de la protéine PdtA au laboratoire.

II. Définition d'une souche modèle PdtA+

Dans la souche de référence PAO1, PdtA n'est produite qu'en milieu pauvre en phosphate ou après ajout d'un plasmide permettant la surproduction de PdtA dans la souche PAO1 (Faure et al., 2014). En revanche, dans la souche clinique CLJ1, PdtA a été identifiée par spectrométrie de masse dans le surnageant de la bactérie cultivée en milieu LB (Sentausa et al., 2020). Cependant, cette souche n'est pas manipulable génétiquement. Nous avons décidé de chercher d'autres souches cliniques, génétiquement modulables, qui synthétisent PdtA constitutivement afin d'étudier PdtA dans nos conditions classiques de laboratoire.

II.1 Production et validation des anticorps dirigés contre PdtA

a) Production des anticorps polyclonaux de lapin

Pour détecter la protéine PdtA dans différentes souches, la première étape a été d'obtenir des anticorps spécifiques. Pour cela, les trois peptides présentés dans le **tableau 5** ont été synthétisés et utilisés pour immuniser deux lapins avec un cocktail des trois peptides selon le protocole de l'entreprise (Biotem, France). La sélection des peptides a été faite selon plusieurs critères : un premier peptide (Ala⁸⁹³-Ile⁹⁰⁸) a été choisi car il a été décrit dans la littérature (Faure et al., 2014) comme générant des anticorps capables de détecter la protéine PdtA. Deux autres ont été proposés par l'entreprise en fonction de leur antigénicité prédite et leur hydrophilie. Deux peptides sont issus de la partie N-terminale (Asp⁶⁵⁶-Glu⁶⁷³ et Ala⁸⁹³-Ile⁹⁰⁸) et le troisième est issu de la partie C-terminale (Thr⁴¹²⁴-Ser⁴¹³⁸). Une cystéine a été ajoutée aux peptides afin de les coupler à une protéine porteuse KLH. Cette protéine est souvent utilisée pour l'immunisation pour produire des anticorps. 56 jours après l'immunisation, les sérums de chaque lapin ont été testés par dosage d'immunoabsorption enzymatique (ELISA) contre chaque peptide utilisé pour l'immunisation. L'ELISA a confirmé la présence d'anticorps dirigés contre chaque peptide. Le sérum issu du lapin N° 27 a montré le plus haut titre sérique pour les trois peptides. 20mL de ce sérum (N°27, J56) ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur Protéine A par l'entreprise afin d'isoler les immunoglobulines G (IgG) du sérum. Ces IgG ont été utilisées pour la suite des expériences.

Peptide	Asp ⁶⁵⁶ -Glu ⁶⁷³	Thr ⁴¹²⁴ -Ser ⁴¹³⁸	Ala ⁸⁹³ -Ile ⁹⁰⁸
Séquence	C+DQTRYFYNPLIAPTQRYE	TVQVLGFGNERLEPS+C	APEDNDTLAYRDGGRI+C
Pureté	96%	98%	95%

Tableau 5. Liste des peptides utilisés pour la production d'anticorps anti-PdtA.

La séquence synthétisée est indiquée. Une cystéine a été ajoutée afin de réaliser un couplage avec la protéine porteuse KLH pour réaliser l'immunisation. La pureté des peptides synthétisés a été contrôlée par l'entreprise.

b) Production de fragments de PdtA dans *E. coli*

Dans le but de valider la reconnaissance des protéines par les anticorps, deux fragments de PdtA ont été produits : un domaine issu de la partie N-terminale de PdtA (Leu⁴⁵¹-Ala¹⁰⁴⁶), appelé PdtA^{NTD} et un domaine provenant de la partie C-terminale (Met³⁰⁶⁴-Leu⁴¹⁸⁰) appelé PdtA^{CTD} (**Figure 23**).



Figure 23. Représentation de PdtA.

Les domaines PdtA^{NTD} et PdtA^{CTD} sont indiqués sur le schéma. Les peptides utilisés pour l'immunisation des lapins sont également indiqués.

Pour cela, les séquences de nucléotides correspondant aux domaines protéiques PdtA^{NTD} et PdtA^{CTD} ont été amplifiées par PCR et clonées dans les plasmides pET30b et pET15b. Les plasmides ont été transformés dans les cellules compétentes BL21 DE3 (Invitrogen) adaptées à la surproduction des protéines.

Les fragments de PdtA ont été produits dans les cellules BL21 DE3. Deux temps d'incubation, deux températures et deux concentrations d'IPTG ont été testés (**Figure 24, A**). PdtA^{CTD} est exprimée dans toutes les conditions sauf à 37°C avec 0,3mM d'IPTG, avec une meilleure expression lorsque l'induction est faite pendant 4h à 37°C en présence de 0,5mM d'IPTG. Pour la suite des expériences, l'induction a été réalisée dans ces conditions. L'optimisation n'a été faite que sur PdtA^{CTD}, PdtA^{NTD} a été exprimée uniquement dans ces conditions et est produite en quantité similaire à PdtA^{CTD} (**Figure 24, B**).

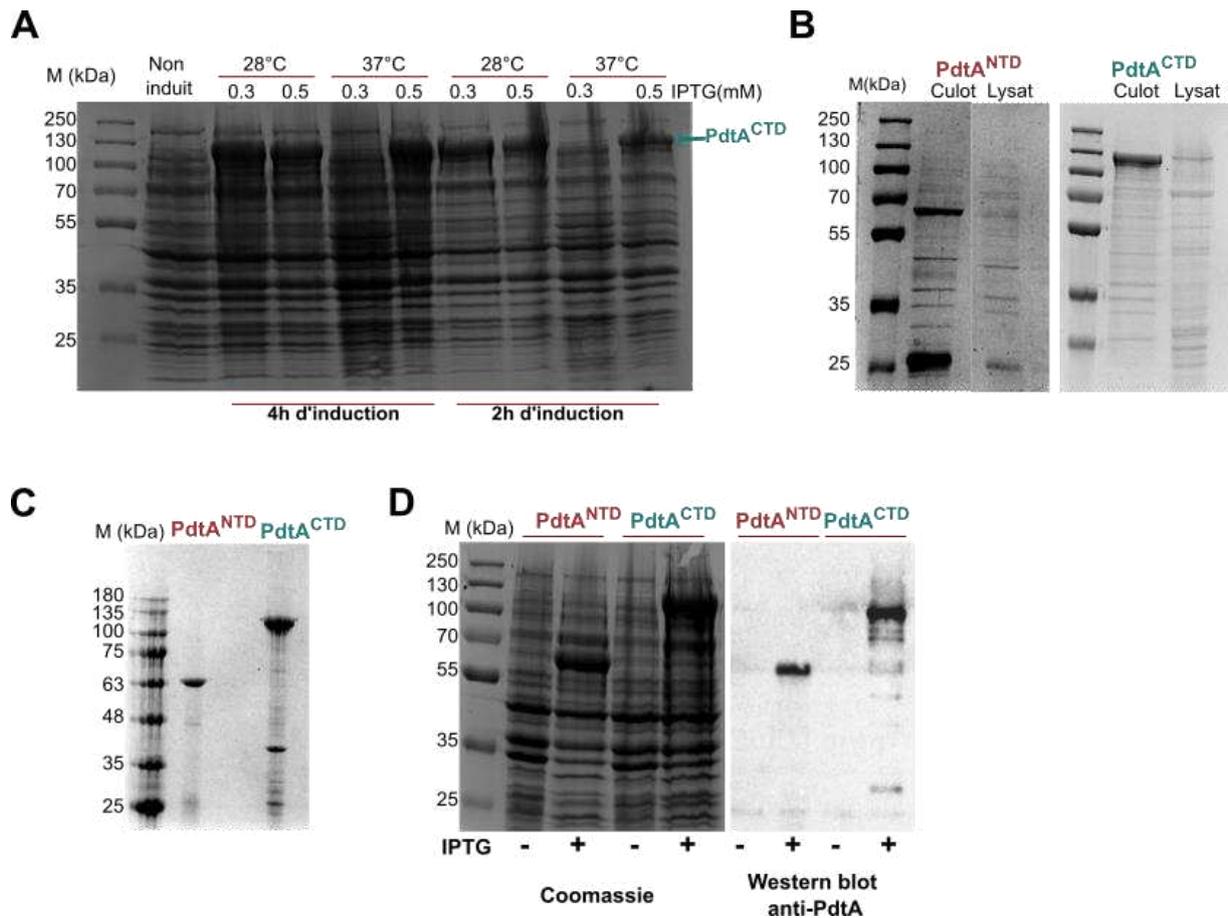


Figure 24. Validation des anticorps polyclonaux contre PdtA.

A. Mise au point de la production de la protéine PdtA^{CTD}. Plusieurs conditions d'induction ont été testées et les extraits bruts de *E. coli* ont été analysés par SDS-PAGE. Différentes températures, durées d'induction et concentrations en IPTG ont été testées pour trouver les meilleures conditions. **B.** Test de la solubilité des protéines PdtA^{NTD} et PdtA^{CTD}. Le culot non soluble et le lysat bactérien soluble ont été séparés par centrifugation et les fractions ont été analysées par SDS-PAGE. **C.** Solubilisation des protéines contenues dans les corps d'inclusion. Après isolation des corps d'inclusion, les protéines ont été solubilisées dans l'urée et séparées par SDS-PAGE. **D.** Validation de la reconnaissance des deux fragments par les anticorps anti-PdtA (IgG lapin27, J56). Les extraits de *E. coli* obtenus après induction ont été séparés par SDS-PAGE. Une coloration du gel d'acrylamide au bleu de Coomassie a été réalisée pour valider la production des protéines et un western blot avec les anticorps anti-PdtA a été fait pour tester la reconnaissance des anticorps, avec les extraits bruts utilisés pour le gel coloré au bleu de Coomassie mais dilué 500 fois.

La stratégie initiale était de purifier ces protéines ayant un His-tag par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC) en utilisant une colonne de nickel. Cette technique permet d'isoler les protéines taguées du reste des protéines du lysat bactérien. Pour cela, les protéines doivent être solubles. Pour évaluer la solubilité de ces protéines, les bactéries ont été lysées et le culot non soluble a été séparé du lysat soluble par centrifugation (Matériel et Méthodes). Les fractions ont été chargées sur un gel de polyacrylamide 12% et

séparées par SDS-PAGE. La coloration au bleu de Coomassie du gel révèle que les protéines sont uniquement présentes dans la fraction non soluble (**Figure 24, B**). De nombreuses protéines recombinantes surproduites dans *E. coli* forment des agrégats de protéines non solubles, dénaturées et inactives, appelés corps d'inclusion (Palmer and Wingfield, 2004; Bhatwa et al., 2021). L'objectif n'étant pas d'utiliser ces domaines protéiques pour tester leur activité ni pour étudier leur structure, nous avons opté pour l'isolement des corps d'inclusions plutôt que de tenter de limiter la production des corps d'inclusion et favoriser la production de protéines solubles, notamment en diminuant le rendement de la production de protéines. Les corps d'inclusion ont donc été isolés par centrifugation basse vitesse (Matériel et Méthodes) puis les protéines ont été solubilisées dans un tampon contenant 8 mM d'urée. Les protéines solubilisées dans l'urée ont été séparées par SDS-PAGE. Une coloration au bleu de Coomassie montre que les protéines PdtA^{NTD} (65kDa) et PdtA^{CTD} (115kDa) sont très majoritaires (**Figure 24, C**).

c) Validation des anticorps polyclonaux anti-PdtA

Les extraits bruts des souches de *E. coli* exprimant PdtA^{NTD} et PdtA^{CTD}, induites comme indiqué précédemment ont été séparés par SDS-PAGE. Une coloration au bleu de Coomassie montre que les polypeptides ont bien été produits. Un western blot réalisé avec les anticorps polyclonaux (N°27, J56) montre que les deux domaines protéiques sont reconnus par les anticorps anti-PdtA (**Figure 24, D**). Cette expérience nous a permis de confirmer que les anticorps reconnaissent bien les deux parties de la protéine. Les extraits solubilisés dans l'urée ont été utilisés comme contrôle positif pour la suite des expériences.

II.2 Identification de souches cliniques produisant PdtA de façon constitutive

Afin de choisir une souche modèle pour l'étude de PdtA, nous avons d'abord examiné la production de PdtA dans une cohorte de 46 souches (**Tableau 9**, Matériel et Méthodes) issues de patients ayant contracté une septicémie à *P. aeruginosa* et hospitalisés au CHU de Grenoble. Dans cette expérience, j'ai également inclus les trois souches, dites de référence, appartenant aux trois clades principaux de *P. aeruginosa* : PAO1, PA14 et PA7. Les expériences préliminaires et la littérature ont montré que la détection de PdtA par western blot était difficile et peu reproductible, probablement à cause de son haut poids moléculaire (430 kDa). Le criblage de la synthèse de PdtA dans plusieurs souches a donc été réalisé par dot blot. Les souches ont été cultivées en milieu LB jusqu'en milieu de phase exponentielle (DO₆₀₀ de 0,8), et les bactéries ont été lysées et déposées sur une membrane de nitrocellulose. Un dot blot a été réalisé pour révéler la présence de PdtA et des protéines totales grâce à un marqueur. Cette expérience a montré qu'aucune des souches de référence ne produit PdtA

dans ces conditions. En revanche, 9 souches cliniques sur les 46 produisent la protéine (**Figure 25**). Le criblage a été réalisé trois fois et deux souches -*PaG6* et *PaG33*- n'ont pas montré la présence de PdtA lors d'une expérience sur les trois. Il est possible que ces deux souches aient perdu leur capacité de produire PdtA *in vitro*.

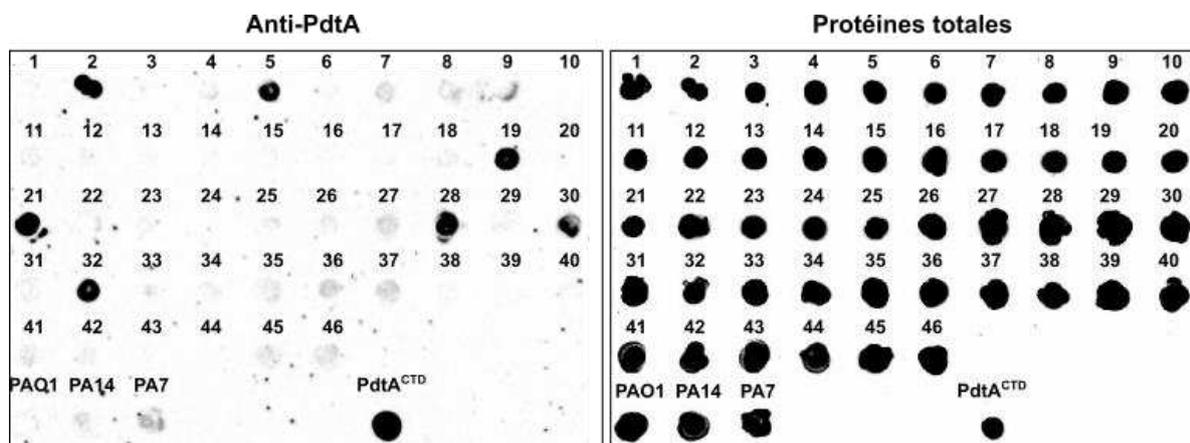


Figure 25. Production de PdtA dans 46 souches cliniques et trois souches de référence PAO1, PA14 et PA7.

Les souches ont été cultivées en milieu LB jusqu'à atteindre une DO_{600} de 0,8. Les bactéries ont été lysées et les extraits bactériens ont été analysés par dot blot. Les souches cliniques, nommés *PaG* pour *P. aeruginosa* Grenoble, ont été numérotées de 1 à 46. La protéine PdtA^{CTD} a été utilisée comme contrôle positif. Le panneau de droite montre un contrôle de charge réalisé avec un marqueur de protéines totales (No Stain Protein Labeling, Invitrogen). Le criblage a été réalisé avec trois répliquats biologiques.

II.3 Caractérisation génomique et phénotypique des souches cliniques PdtA⁺

J'ai dans un premier temps étudié les caractéristiques des souches qui produisent PdtA afin de pouvoir choisir une souche modèle pour la suite de l'étude du rôle de PdtA.

a) Les souches PdtA⁺ appartiennent aux différents clades phylogénétiques de *P. aeruginosa*

Pour établir l'appartenance aux différents clades des souches cliniques produisant PdtA et examiner leurs génomes, nous avons procédé au séquençage de leur ADN génomique. Le séquençage des génomes de 8 souches PdtA⁺ (*PaG2*, *PaG5*, *PaG6*, *PaG19*, *PaG28*, *PaG30*, *PaG32* et *PaG33*) et 2 souches PdtA⁻ (*PaG1* et *PaG7*) a été effectué par Genewiz, à partir des ADN génomiques extraits. Les séquences obtenues ont ensuite été assemblées en contigs sur Galaxy (<https://usegalaxy.eu/>). Les génomes ont été annotés avec l'outil Prokka sur Galaxy en comparant le génome avec les souches de référence. Le **tableau 6** récapitule les caractéristiques des génomes séquencés.

Nom	Taille (pb)	CDS	Nombre de contigs	Accession number NCBI
PaG1 (-)	6 462 792	6 261	393	JAVRME000000000
PaG2 (+)	6 430 878	6 104	285	JAVRMF000000000
PaG5 (+)	6 577 759	6 410	486	JAVRMG000000000
PaG6 (+)	6 794 383	6 729	914	JAVRMH000000000
PaG7 (-)	6 435 165	6 180	356	JAVRMI000000000
PaG19 (+)	7 040 763	6 882	309	JAVRMJ000000000
PaG28 (+)	6 886 475	6 805	900	JAVRMK000000000
PaG30 (+)	8 167 291	6 866	6673	
PaG32 (+)	6 670 758	6 461	309	JAVRML000000000
PaG33 (+)	7 100 731	6 986	347	JAVRMM000000000

Tableau 6. Caractéristique des génomes séquencés.

La taille des génomes, le nombre de séquence codante (CDS) ainsi que le nombre de contigs obtenus sont indiqués. Les données ont été déposées sur DDBJ/ENA/GenBank.

Le site web PATRIC (Wattam et al., 2017) est un site de bio-informatique bactérienne du Bioinformatic Resource Center qui met à disposition une base de données comportant de nombreux génomes bactériens ainsi que de nombreux outils pour l'analyse bio-informatique. Un arbre phylogénétique comportant 200 souches de *P. aeruginosa* dont les dix souches cliniques séquencées dans ce travail et les trois souches de référence PAO1, PA14 et PA7 a été réalisé avec le service « Bacterial genome tree » disponible sur PATRIC. Les autres souches proviennent de la base de données de PATRIC et ont été choisies aléatoirement. L'arbre obtenu montre bien les 5 clades de *P. aeruginosa* identifiés dans la littérature (Freschi et al., 2019). Les trois clades principaux sont représentés chacun par une souche dite de référence : PAO1 pour le premier clade, PA14 pour le deuxième et PA7 pour le troisième, qui est désormais reconnu comme faisant partie d'une espèce à part récemment nommée *paraeruginosa* (Rudra et al., 2022). Une des différences majeures entre les clades 1, 2 et 3 est le facteur de virulence majeur employé par les bactéries de chaque clade. Les deux premiers clades possèdent les gènes codant pour les protéines impliquées dans l'assemblage de la machinerie du SST3 et les gènes codant pour les exotoxines ExoT et ExoY sécrétées par ce système. Cependant, chaque clade possède un gène codant pour une exotoxine additionnelle, spécifique à chaque clade. Les souches du clade de PAO1 possèdent le gène

exoS alors que les souches du clade de PA14 possèdent le gène *exoU* (Ozer et al., 2019). Les souches du groupe PA7, en revanche, n'ont pas les gènes correspondant au SST3. Elles possèdent un autre facteur de virulence, absent chez les deux autres groupes, qui est la toxine ExIA (Elsen et al., 2014). Les clades 4 et 5 ont une position intermédiaire entre les clades 1 et 2 et le clade 3 (Freschi et al., 2019). La plupart des souches de *P. aeruginosa* appartiennent aux clades 1 et 2 qui représentent à eux deux 98% des isolats. L'arbre obtenu est donc représentatif de la diversité des souches de *P. aeruginosa*.

Un premier arbre qui ne tient pas compte de la distance phylogénétique a été réalisé afin de mieux visualiser la répartition des souches cliniques dans les différents clades (**Figure 26, A**). Le deuxième arbre prend en compte les distances entre les différentes souches et montre que le clade 3 est très différent des autres. Les souches PdtA⁺ sont réparties aléatoirement dans l'arbre phylogénétique de *P. aeruginosa*, avec une souche appartenant au groupe de PA7 et les autres aux groupes de PAO1 et PA14 (**Figure 26, A**). La production constitutive de PdtA ne dépend donc pas du clade phylogénétique, elle est conservée dans les divers clades de *P. aeruginosa*. Nous avons ensuite vérifié la concordance entre les clades et la production des toxines attendues spécifiques de chaque clade. Pour cela, un western blot a été réalisé avec des anticorps anti-ExoU et anti-ExIA. La souche PaG5 appartenant au clade 3 est bien la seule à sécréter la toxine ExIA, spécifique des *P. paraaeruginosa*. Les souches appartenant au clade 2 (PA14) sécrètent toutes la toxine ExoU, en ayant préalablement induit le SST3. Une PCR a

permis de confirmer que le gène *exoS* est bien présent dans les trois souches appartenant au clade 1 (PAO1) (Figure 26, B).

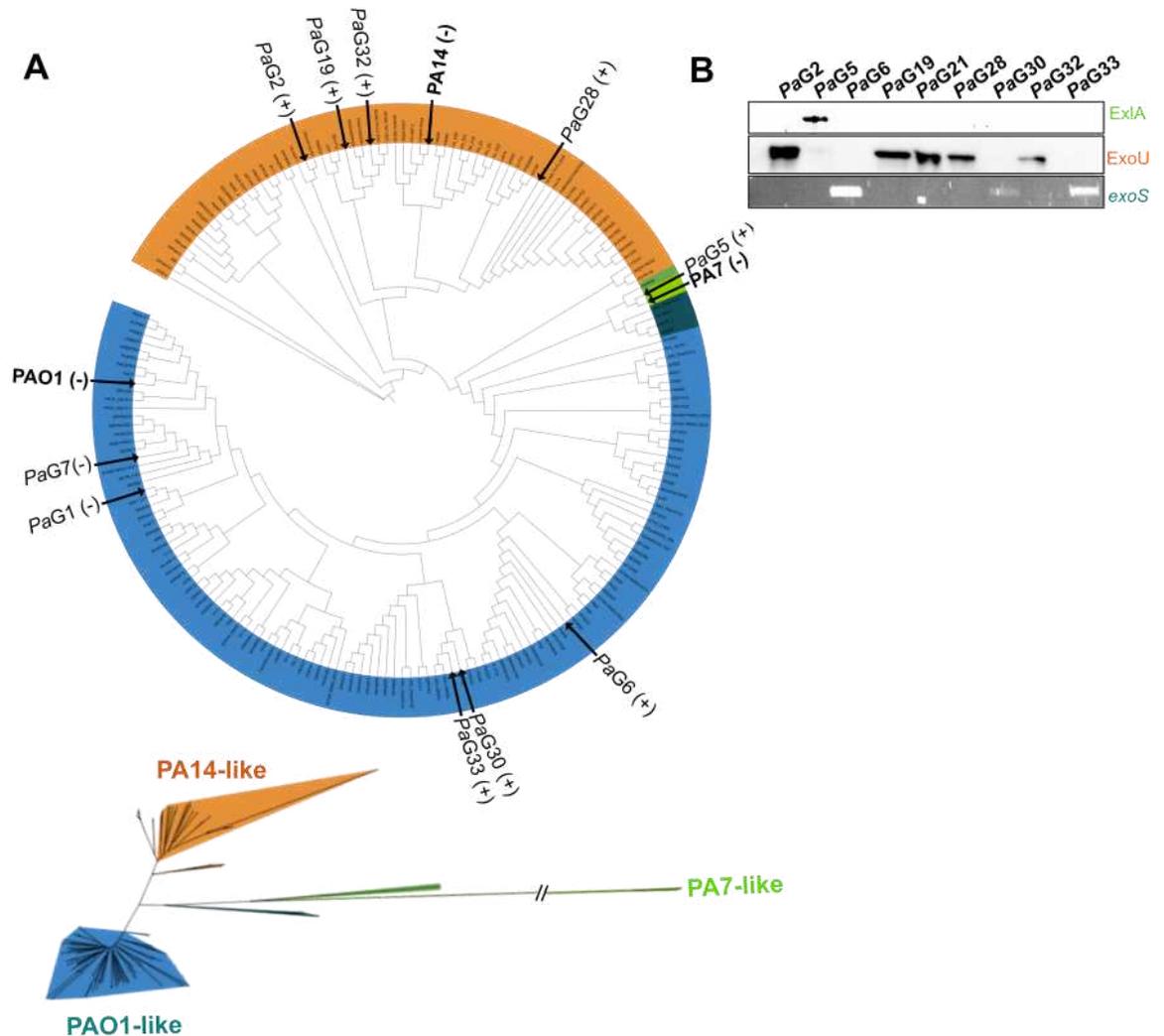


Figure 26. Détermination du clade des souches *PdtA*⁺.

A. Arbre phylogénétique de 200 souches de *P. aeruginosa* dont 10 souches cliniques. L'arbre a été réalisé avec les outils disponibles sur PATRIC et annoté sur iTOL (<https://itol.embl.de/>). **B.** Détection des toxines principales associées aux trois groupes indiqués avec le code couleur bleu pour le clade 1, orange pour le clade 2 et vert pour le clade 3. L'expression du SST3 a été induite et un western blot avec des anticorps anti-ExoU a été réalisé. Un western blot avec des anticorps anti-ExlA a été réalisé sur les 9 souches cliniques *PdtA*⁺. La détection du gène *exoS* a été réalisée par PCR. Les western blots et la PCR ont été réalisés en triplicats biologiques.

Grâce aux génomes séquencés, nous avons pu comparer certaines régions. En effet, l'expression constitutive de *pdtA* dans certaines souches cliniques pourrait être due à différents facteurs. Des mutations sur le site de fixation de PhoB ou Vrel pourraient expliquer cette expression constitutive. Une mutation dans le gène codant pour *vrel* ou *phoB*, impliqués

dans la régulation de *pdtA* pourrait les rendre actifs constitutivement, et donc *pdtA* serait activé constitutivement également.

Tout d'abord, la région contenant le promoteur de *pdtA* décrit par Faure et al (Faure et al., 2013) a été identifiée dans les souches de référence et dans les souches cliniques séquencées. La séquence prise en compte correspond au début de la séquence identifiée par Faure et al jusqu'au début du gène *pdtA*, et représente entre 399 et 419 paires de bases selon les souches. Un alignement de ces séquences a été réalisé et une matrice représentant le nombre de SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) identifiés a été réalisés. Un arbre phylogénétique a également été construit à partir de l'alignement des séquences (**Figure 27**).

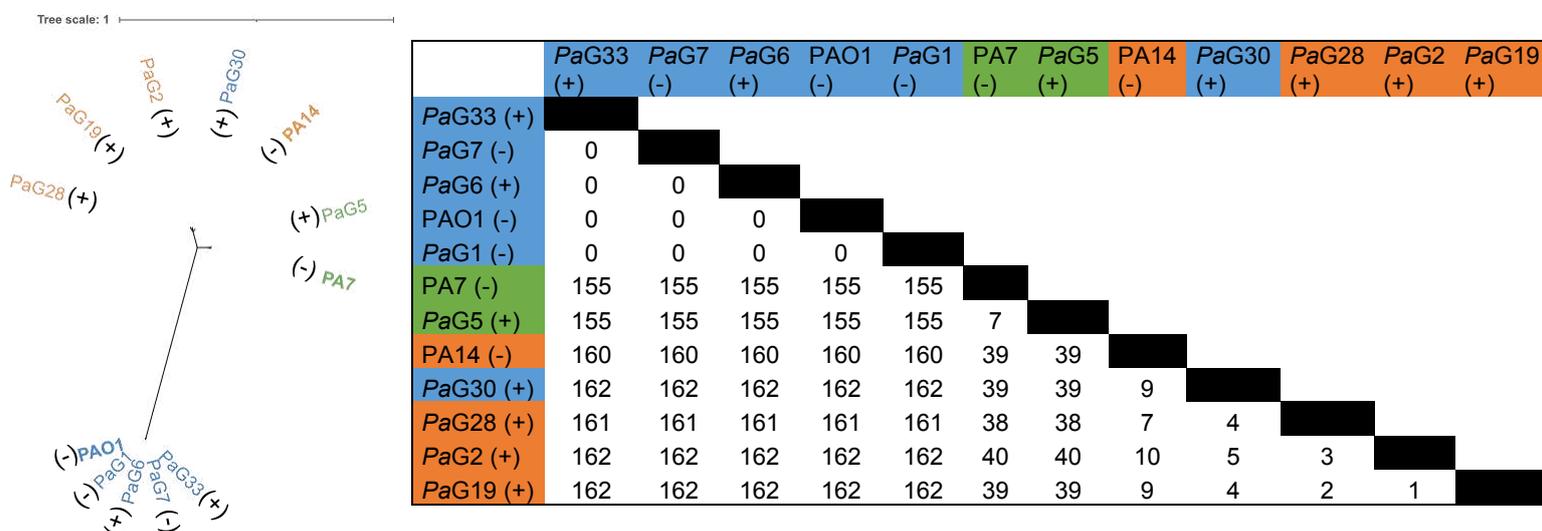


Figure 27. Comparaison du promoteur de *pdtA* dans les souches cliniques et les souches de références.

Arbre phylogénétique fondé sur l'alignement des séquences de la région promotrice de *pdtA* et matrice des SNP correspondante.

D'après l'arbre obtenu, il y a trois groupes distincts, contenant chacun une souche de référence. Mise à part la souche *PaG30*, les souches sont toutes classées dans le même groupe qu'en comparant l'ensemble des gènes du « core genome » (**Figure 26, A**). Les différences observées dans cette région sont corrélées au clade des souches et non à la synthèse de PdtA. En effet, les souches de référence et *PaG1* et *PaG7* ne synthétisent pas PdtA mais ont la même région promotrice que des souches qui synthétisent PdtA.

	PA7 (-)	PaG5 (+)	PA14 (-)	PAO1 (-)	PaG33 (+)	PaG19 (+)	PaG28 (+)	PaG7 (-)	PaG30 (+)	PaG6 (+)	PaG1 (-)	PaG2 (+)
PA7 (-)												
PaG5 (+)	3											
PA14 (-)	52	49										
PAO1 (-)	47	44	8									
PaG33 (-)	48	45	7	1								
PaG19 (+)	47	44	6	4	3							
PaG28 (+)	48	45	5	3	2	3						
PaG7 (-)	47	44	6	2	1	2	1					
PaG30 (+)	47	44	6	2	1	2	1	0				
PaG6 (+)	47	44	6	2	1	2	1	0	0			
PaG1 (-)	47	44	6	2	1	2	1	0	0	0		
PaG2 (+)	47	44	6	2	1	2	1	0	0	0	0	

Figure 28. Matrice des SNP identifiés dans les séquences de *vrel*.

De la même manière, les séquences de *vrel* ont été comparées. Mis à part les gènes des souches du clade 3 PA7 et PaG5, le gène *vrel* est très conservé parmi les souches des clades 1 et 2 (Figure 28). De même que pour la région comportant le promoteur de *pdtA*, les différences de séquences observées parmi les gènes *vrel* sont corrélées au clade des souches et non à la synthèse de PdtA.

	PAO1 (-)	PaG1 (-)	PaG6 (+)	PaG33 (+)	PaG7 (-)	PaG30 (+)	PaG2 (+)	PaG19 (+)	PaG28 (+)	PA14 (-)	PA7 (-)	PaG5 (+)
PAO1 (-)												
PaG1 (-)	0											
PaG6 (+)	0	0										
PaG33 (+)	0	0	0									
PaG7 (-)	1	1	1	1								
PaG30 (+)	0	0	0	0	1							
PaG2 (+)	2	2	2	2	3	2						
PaG19 (+)	2	2	2	2	1	2	4					
PaG28 (+)	2	2	2	2	1	2	4	0				
PA14 (-)	2	2	2	2	1	2	4	0	0			
PA7 (-)	19	19	19	19	20	19	21	19	19	19		
PaG5 (+)	17	17	17	17	18	17	19	17	17	17	2	

Figure 29. Matrice des SNP identifiés dans les séquences de *phoB*.

Les séquences de *phoB* sont également conservées au sein des clades, et les différences observées sont corrélées au clade des souches (**Figure 29**). Il n'y a pas de différence particulière entre une souche PdtA⁺ et une souche PdtA⁻ appartenant au même clade.

Un alignement des séquences des différents gènes *pdtA* des souches cliniques séquencées ainsi que des souches de référence PAO1, PA14 et PA7 a également été réalisé. Les séquences ont été alignées sur Galaxy (<https://usegalaxy.eu/>) grâce à l'outil MAFFT puis la mise en forme a été faite dans ESPript (<https://esript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>). Les résidus conservés parmi toutes les souches sont surlignés en rouge. La numérotation indiquée correspond aux acides aminés de la protéine PdtA de PA7 qui comporte 4184 aa contre 4181 pour PAO1 et 4177 pour PA14. La **figure 30** montre l'alignement correspondant au domaine TPS des protéines PdtA dans les différentes souches (**Figure 30, A**) et le domaine PdtA^{CTD} (**Figure 30, B**). L'alignement complet est disponible en annexe (annexe 7). La **figure 30, B** permet uniquement de visualiser la conservation (en rouge) du domaine PdtA^{CTD} entre les différentes souches, l'annexe 7 permet de distinguer chaque acide aminé.

Nous pouvons constater que le domaine TPS, comme attendu, est conservé parmi les différentes souches. Il y a 80% d'identité entre le domaine TPS des souches de type PAO1 et des souches de type PA14 et 76% entre le domaine TPS des souches de type PAO1 et des souches de type PA7. Le reste de la protéine a des zones conservées et d'autres moins, il y a également des délétions de plusieurs acides aminés tout au long de la séquence (voir alignement complet en annexe). Les 500 derniers résidus de la protéine sont très conservés parmi les différentes souches des trois clades (**Figure 30, B**). Pour la partie C-terminale entière, il y a 65% d'identité entre les séquences des souches de type PAO1 et des souches de type PA14 et 63% d'identité entre les souches de type PAO1 et les souches de type PA7. Un arbre phylogénétique a été réalisé (Galaxy) à partir de cet alignement (**Figure 30, C**). Cet arbre montre que PdtA peut être classée dans trois groupes différents, contenant chacun la protéine de la souche de référence des trois principaux clades. Contrairement à ce qui est observé en comparant le « core » génome (**Figure 26, A**), les clades 2 et 3 sont très proches et le clade 1 est plus éloigné. En effet, entre les protéines PdtA des clades 2 et 3 (en orange et vert), il y a plus de 99% d'identité en acides aminés. Les protéines du clade 1 ont en revanche environ 60% d'identité avec les protéines des clades 2 et 3. Les protéines PdtA des clades 2 et 3 sont très similaires. La souche *PaG30*, qui est du clade 1 (PAO1), a une protéine PdtA qui est classée dans le clade 2 (PA14). A part cette souche, toutes les souches sont classées dans le même clade qu'en comparant le « core » génome (**Figure 26, A**). De plus,

cette classification est la même que celle obtenue en comparant la région promotrice de *pdta* (Figure 27).

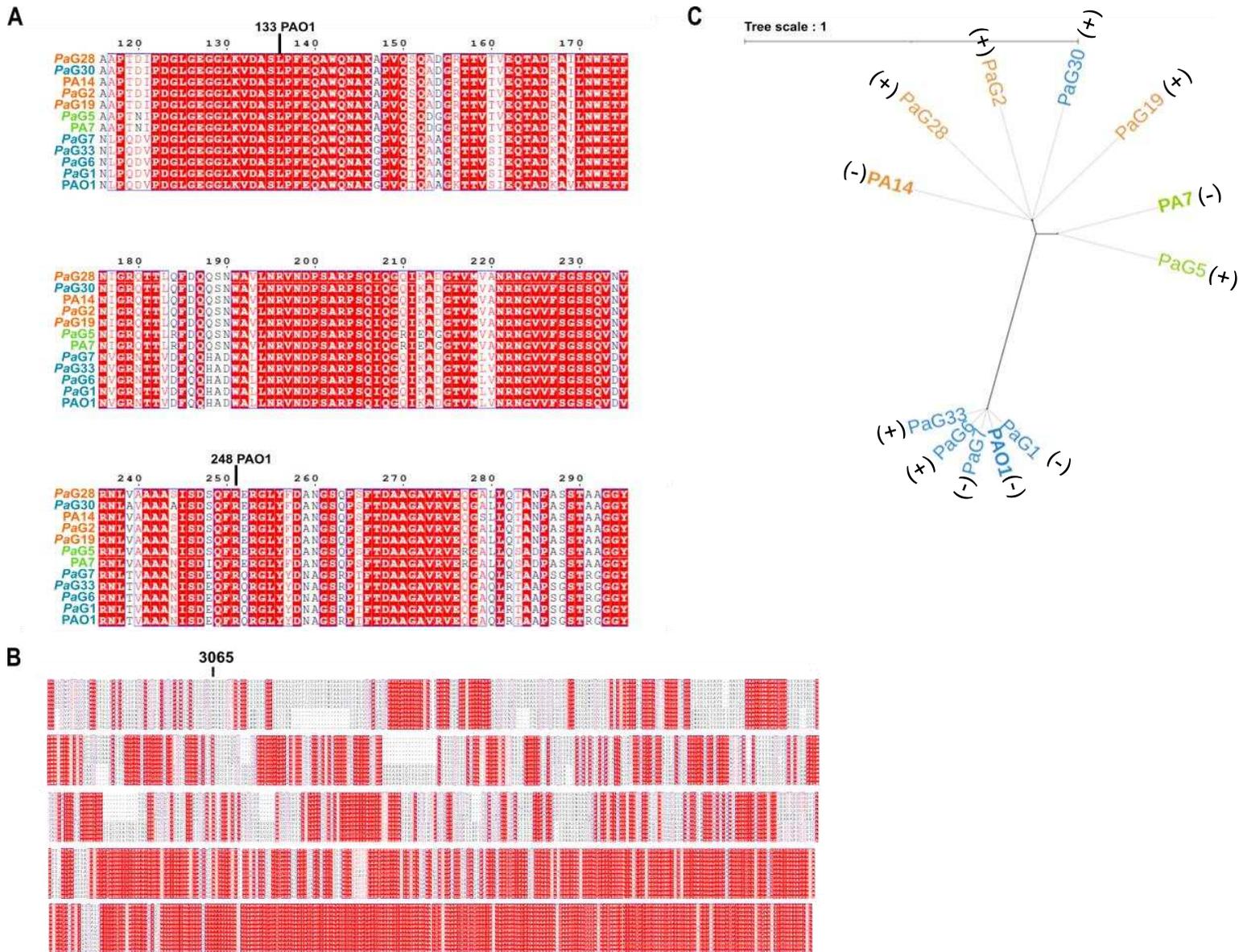


Figure 30. Comparaison des protéines PdtA des différentes souches cliniques.

A. Alignement du domaine TPS, délimité par les deux traits noirs. **B.** Alignement du domaine PdtA^{CTD}. Les souches sont dans le même ordre que lors de l'alignement du domaine TPS. **C.** Arbre phylogénétique PdtA. Les souches du clade 1 d'après l'analyse du « core » génome (Figure 21) sont indiquées en bleu, celles du clade 2 en orange et celle du clade 3 en vert.

b) Mesure de la cytotoxicité des souches PdtA⁺

Le rôle de PdtA dans la virulence de *P. aeruginosa* étant controversé, nous voulions d'abord tester l'implication de PdtA dans la cytotoxicité. Une technique pour suivre la cytotoxicité au cours du temps consiste à suivre l'incorporation d'iodure de propidium (IP) dans les cellules mortes en mesurant la fluorescence à 590 nm émise lorsque l'IP est lié à de l'ADN. La mesure de la fluorescence à 590 nm permet donc de suivre le niveau de cytotoxicité au cours du temps mais uniquement lorsque l'infection entraîne la perméabilisation de la membrane plasmique de l'hôte et donc l'incorporation de l'IP. La cytotoxicité des 9 souches cliniques produisant PdtA a donc été évaluée sur les cellules épithéliales de poumon humain A549 ainsi que sur les macrophages J774. Comme nous l'avons vu précédemment, PdtA est toujours associée à une autre toxine, ExoU, ExoS ou ExlA qui procurent à la souche un phénotype cytotoxique. ExoU est une phospholipase adressée à la membrane plasmique de la cellule hôte qui clive les phospholipides de la membrane, ce qui conduit à la mort rapide des cellules (Sato and Frank, 2014). La perturbation de l'intégrité de la membrane des cellules permet l'incorporation d'IP. ExlA est une toxine qui forme un pore dans la membrane des cellules eucaryotes, ce qui entraîne la lyse des cellules et donc l'incorporation d'IP (Basso et al., 2017). ExoU et ExlA provoquent la lyse des cellules épithéliales A549 mais aussi des macrophages J774, entraînant une incorporation d'IP dans ces deux lignées cellulaires. La toxine ExoS est une toxine bifonctionnelle qui a une activité de GTPase Activating Protein (GAP) et d'ADP ribosyltransferase (ADPRT). Elle n'a pas le même effet sur les cellules épithéliales que sur les macrophages (Coburn and Frank, 1999). En effet, ExoS provoque une rétraction des cellules épithéliales A549 par son activité GAP qui perturbe le cytosquelette d'actine (Sun and Barbieri, 2004) et induit sa rétraction, mais elle n'induit pas la lyse des cellules. Le translocon du type III entraîne la perméabilisation des membranes de macrophages en formant le pore (Faudry et al., 2006) et la formation du pore suffit, à elle seule, à tuer les macrophages (Dacheux et al., 2001). La cytotoxicité des souches ExoS⁺ peut donc être suivie en mesurant l'incorporation d'IP seulement sur les macrophages.

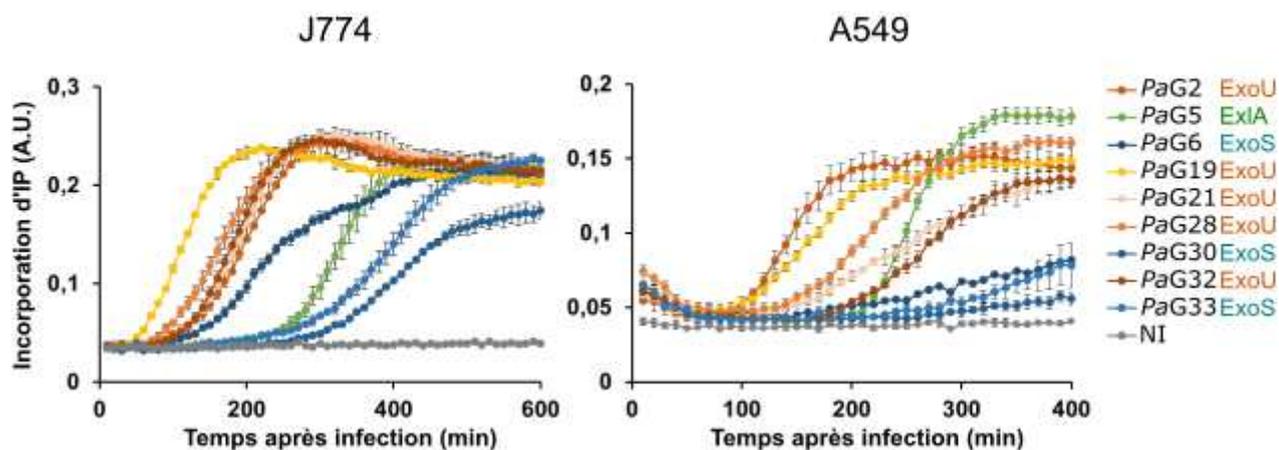


Figure 31. Cytotoxicité des souches cliniques PdtA⁺.

Les cellules ont été cultivées dans du DMEM complété de SVF 10% et d'IP. La cytotoxicité a été évaluée sur les macrophages de souris J774 (panel de gauche) ainsi que sur les cellules épithéliales de poumon humain A549 (panel de droite). Les bactéries ont été cultivées dans du milieu LB jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ d'environ 1 et ajoutées sur les cellules à une MOI de 10. Cette expérience est représentative des résultats obtenus lors de 3 expériences. L'écartype standard indiqué est celui des triplicats techniques de cette expérience. NI = non infecté.

Nous avons réalisé des expériences de cytotoxicité avec les 9 souches cliniques PdtA⁺ sur les cellules J774 et A549. Les cellules ont été infectées à une multiplicité d'infection (Multiplicity Of Infection, MOI) de 10, ce qui correspond à 10 bactéries pour une cellule eucaryote. Les souches ExoU⁺ et ExlA⁺ sont cytotoxiques envers les cellules épithéliales A549 ainsi qu'envers les macrophages J774, comme attendu. Les souches ExoS⁺ sont cytotoxiques envers les macrophages (**Figure 31**). Les souches cliniques ont toutes le profil attendu envers les deux lignées cellulaires. Nous pouvons donc évaluer l'implication de PdtA dans la cytotoxicité, en utilisant n'importe quelle souche clinique puisqu'elles ont toutes un phénotype cytotoxique (IV.4).

c) Etude de la motilité de *P. aeruginosa* exprimant PdtA

Une hypothèse sur la fonctionnalité de PdtA est qu'elle serait impliquée dans l'adhésion des bactéries aux cellules eucaryotes, du fait de sa classification dans la famille des High-Molecular Weight (HMW)-like adhésines (Faure et al., 2014). Dans un premier temps, nous avons évalué la présence et la fonctionnalité du flagelle et du pili de type IV, appendices connus pour être impliqués dans la motilité mais également dans l'adhésion (Beaussart et al., 2014; Haiko and Westerlund-Wikström, 2013), dans les souches cliniques PdtA⁺. Comme vu en introduction, *P. aeruginosa* possède un unique flagelle qui permet à la bactérie de se déplacer dans un environnement liquide. Le flagelle agit comme un rotor et peut ainsi générer

ce mouvement de la bactérie appelé « swimming ». La protéine FliC (flagelline) polymérise et forme le filament du flagelle, qui est indispensable pour le swimming (Berg, 2003; Conrad et al., 2011; Tian et al., 2022).

Le pilus de type IV est l'appendice responsable du « twitching », une forme de motilité indépendante du flagelle qui permet aux bactéries de se déplacer sur une surface solide (Skerker and Berg, 2001; Talà et al., 2019). La fibre du pili est majoritairement constituée de la protéine PilA, mais une quarantaine de gènes sont impliqués dans l'assemblage et la régulation du pili chez *P. aeruginosa* (Leighton et al., 2015).

Afin d'évaluer la présence et la fonctionnalité du flagelle et du pilus des souches cliniques, j'ai réalisé un western blot afin de détecter la protéine FliC et la protéine PilA ainsi qu'un test fonctionnel de swimming et de twitching. Le test de swimming a été réalisé en utilisant la souche CHA comme contrôle positif. C'est un isolat d'un patient atteint de la mucoviscidose. Cette souche est connue pour nager (Sall et al., 2014). Le halot bactérien de chaque souche clinique est donc comparé à celui de CHA pour déterminer si elles nagent ou non. Le test de twitching a été réalisé avec la souche IHMA 87, une souche de clade 3 qui provient d'une infection urinaire et est connue pour « twitcher » Son mutant IHMA Δ pilA qui est négatif pour le twitching (Basso et al., 2017) a été utilisé comme contrôle négatif.

En comparant le diamètre du halot des souches cliniques avec celui de CHA nous avons pu déterminer la capacité des souches à nager. Les halots des souches *PaG2*, *PaG5*, *PaG6* et *PaG19* sont similaires à celui de la souche CHA. Trois souches, *PaG28*, *PaG30* et *PaG32* ne nagent pas du tout. Les souches *PaG21* et *PaG33* ont une position intermédiaire. Seules les souches *PaG30* et *PaG32* ne produisent pas de protéine FliC et ne nagent pas ce qui indique une absence de flagelle. Les souches *PaG28* et *PaG33* produisent FliC mais ne nagent pas ou peu pour *PaG33*, suggérant que leur flagelle n'est pas fonctionnel (**Figure 32, A**). Concernant la présence de PilA (**Figure 32, B**), seulement deux souches produisent la protéine PilA reconnue par les anticorps utilisés (**Tableau 13**, Matériel et Méthodes). Ces anticorps ont été obtenus par immunisation à partir de peptides correspondant à la séquence de la protéine PilA de la souche CHA ([GCF_022870565.1](#)), une souche PAO1-like. Les deux seules souches positives pour PilA sont des souches du même clade que la souche CHA, il est possible que d'autres souches produisent cette protéine impliquée dans le pilus mais qu'elle ne soit pas reconnue par ces anticorps. En effet, la protéine PilA diffère d'une souche à l'autre, il n'y a que 37% d'identité entre la protéine de la souche PAO1 et PA14 et 43% d'identité entre la séquence de la protéine de PAO1 et celle de PA7(**Figure 33**).

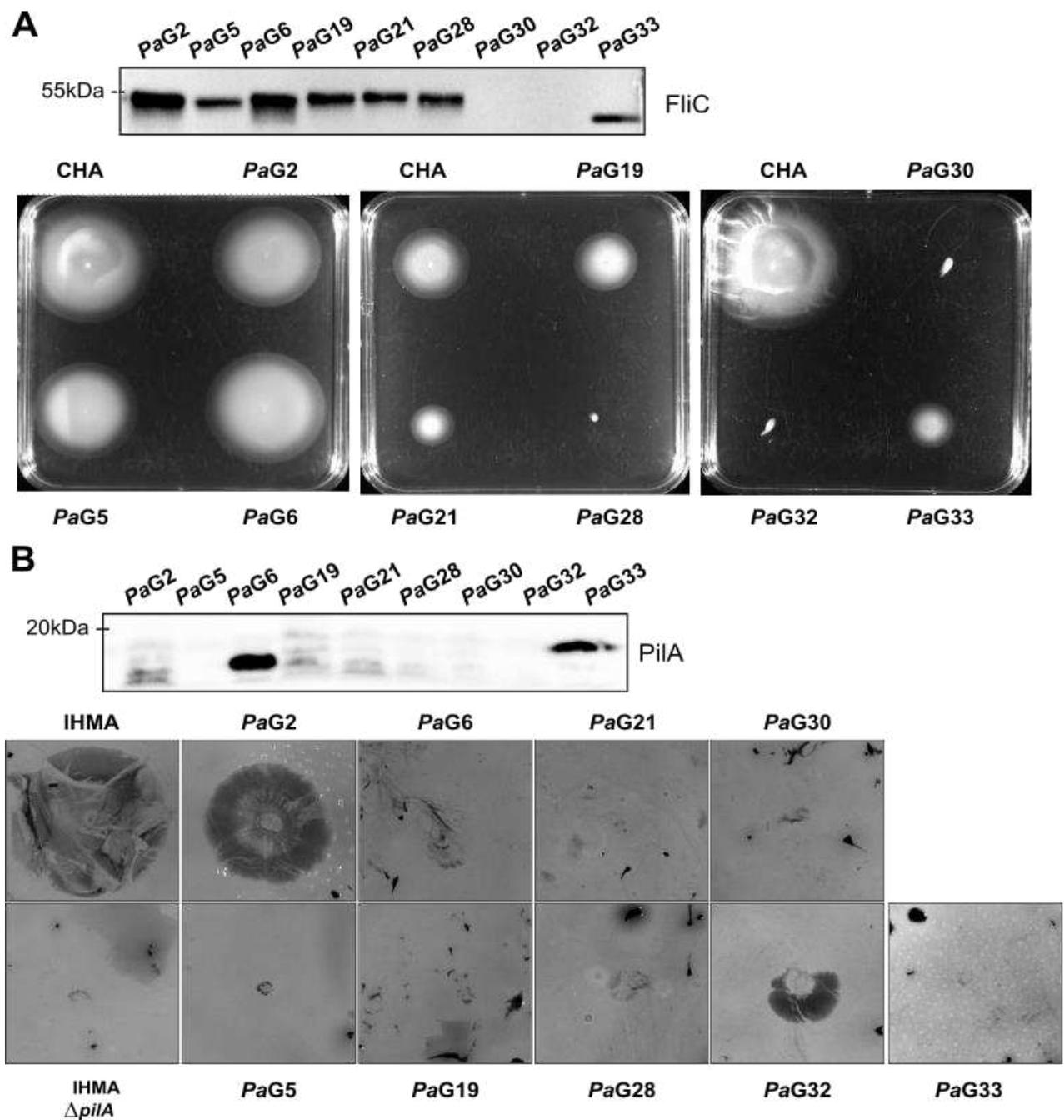


Figure 32. Présence et fonction du flagelle et du pilus des souches cliniques PdtA⁺.

A. Flagelle. Un western blot avec des anticorps spécifiques de la protéine FliC a été réalisé. Les souches ainsi que le contrôle positif CHA ont été inoculées sur une gélose molle et incubées à 37°C pendant 24h afin d'évaluer leur capacité à nager. **B.** Type IV pili. Un western blot a été réalisé, avec des anticorps dirigés contre la protéine PilA de la souche CHA. Les souches cliniques PdtA⁺ ainsi que les souches contrôles ont été inoculées au fond d'une gélose puis incubées à 37°C pendant 48h. La gélose a été découlée et le fond de la boîte coloré avec du bleu de Coomassie afin de mettre en évidence la zone de twitching. Chaque expérience a été réalisée au moins deux fois.

```

PA14      -----MKAQKGFLLIELMIVVAIIIGILAAVALPAYQDYTIIRA      37
PAO1      -----MKAQKGFLLIELMIVVAIIIGILAAIAPQYQNYVARS      37
PA7       MGLAWILLKALSGTTPGKIMENSMKAQKGFLLIELMIVVAIIIGILAAVAIPAYQDYITRG      60
          *****:*:* **:* *
          .

PA14      RVTEGVGLAASAKTLIGDSSATA-----GELAASARVWNAQAGNAG-----ATS      81
PAO1      EGASALATINPLKTTVEESLSRGIAGSKIKIGTTASTAT--ETYVGVVPEPDANKLGVIAVA      95
PA7       QVTEAVSLGGGLKSPLAEY-----GADKNAWPTALVAPTVTTPSANQLNATLIG      108
          . . . . . * : : : . : . .
          .

PA14      KYVT---SVRIAEATGEITVTFNATNVGNI PADSTLVFTPYVQNAAGAPTQLGASYAAGV      138
PAO1      -----IE-DSGAGDITFTFQGTSSPKNATKVI-----TLN-R      126
PA7       KYSTVTPSIGGSYPSGVIIVTMTTGK---AANSVL-----TLTTT      145
          : : * **.*: : . * . . :
          .

PA14      TGSIDWGCASESNAVSSGPDNRNMPALTAGTLPARFAPSECR-      179
PAO1      TADGVWACKSTQ-----DPMFTPKGCDN      149
PA7       NGGSSWACGNAKVDDAQGS-----GTTIDAKYLPNACKP      179
          . . . *.* . . . : * . *

```

	PAO1	PA14	PA7
PAO1	100 %		
PA14	37,12 %	100 %	
PA7	43,26 %	43,61 %	100%

Figure 33. Alignement et conservation des séquences protéiques de PilA dans les trois souches de référence.

Concernant la fonctionnalité des pili, peu de souches ont un pilus fonctionnel. Seules les souches *PaG2*, *PaG32*, *PaG28* et *PaG6* sont capables de « twitcher », plus ou moins selon les souches. *PaG2*, *PaG28* et *PaG32* synthétisent donc sûrement la protéine PilA mais elle n'est pas détectée par les anticorps. Toutes les autres n'ont pas de pilus fonctionnel. La souche *PaG33* produit la protéine PilA mais n'est pas capable de twitcher, son pilus n'est pas fonctionnel (**Figure 32, B**).

En conclusion, la plupart des souches PdtA⁺ nagent mais ne « twitchent » pas, indépendamment du groupe phylogénétique.

Les souches PdtA⁺ ont des caractéristiques très variées (**Tableau 7**), montrant que la production de PdtA est indépendante d'un phénotype particulier mais est conservée à travers la diversité des souches de *P. aeruginosa*.

	<i>PaG2</i>	<i>PaG5</i>	<i>PaG6</i>	<i>PaG19</i>	<i>PaG21</i>	<i>PaG28</i>	<i>PaG30</i>	<i>PaG32</i>	<i>PaG33</i>
Clade	PA14	PA7	PAO1	PA14	PA14	PA14	PAO1	PA14	PAO1
Toxine	ExoU	ExlA	ExoS	ExoU	ExoU	ExoU	ExoS	ExoU	ExoS
Cytotoxicité A549	+	+	-	+	+	+	-	+	-
Cytotoxicité J774	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FliC	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Swimming	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	+
PilA	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Twitching	+++	-	+	-	-	+	-	++	-

Tableau 7. Récapitulatif des caractéristiques testées des 9 souches PdtA⁺.

Les clades et la toxine majeure associée sont indiqués, avec le code couleur bleu pour le clade 1, orange pour le clade 2 et vert pour le clade 3. La cytotoxicité mesurée sur les souches A549 et J774 est indiquée. La présence de la protéine FliC et PilA détectées par western blot ainsi que la fonctionnalité du flagelle (test de swimming) et du pilus de type IV (test de twitching) sont également indiqués.

II.4 Production de PdtA au cours de la croissance de *P. aeruginosa*

La cinétique de production de PdtA au cours de la croissance bactérienne doit être connue pour pouvoir se placer au moment adéquat pour étudier le rôle de la protéine. Pour cela, j'ai suivi la production de PdtA au cours de la croissance de trois souches cliniques. J'ai sélectionné une souche ExoS⁺ (*PaG30*) et deux souches ExoU⁺ (*PaG19*, *PaG28*) qui ont une motilité différente afin d'évaluer si PdtA est produite au même moment de la croissance dans ces trois souches aux profils différents.

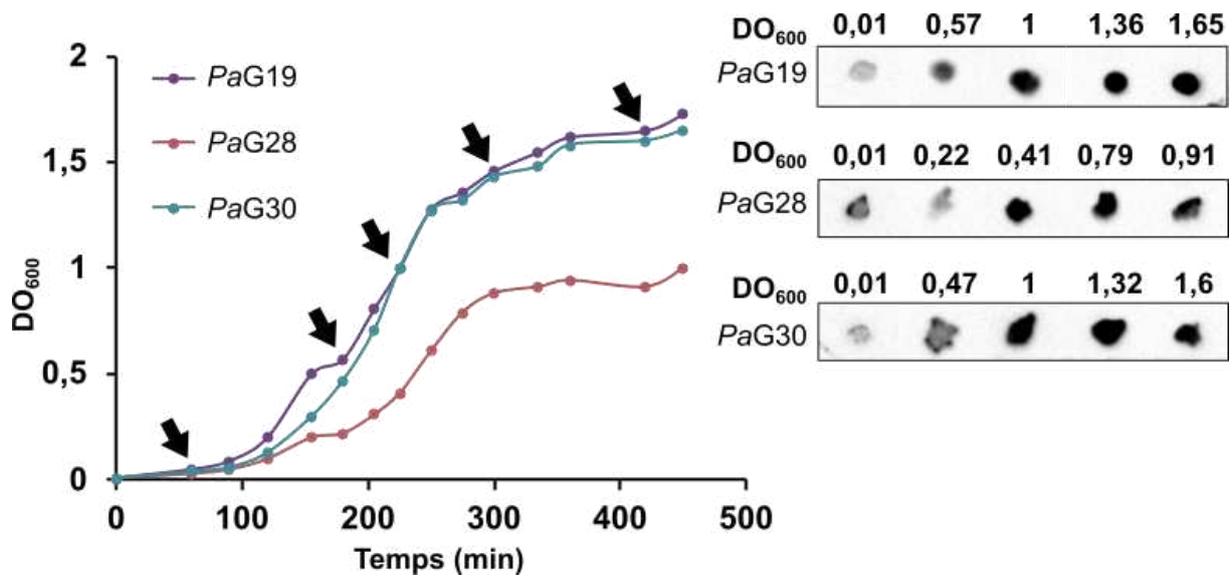


Figure 34. Production de PdtA au cours de la croissance de trois souches cliniques. Les souches ont été diluées à une DO₆₀₀ de 0,01 et cultivées dans 30 mL de milieu LB. La croissance a été suivie pendant 7,5 h et des prélèvements ont été réalisés au cours de la croissance. Les extraits bactériens ont été analysés par dot blot avec les anticorps polyclonaux anti-PdtA.

Même si les trois souches n'ont pas la même courbe de croissance, elles produisent toutes PdtA en phase exponentielle (**Figure 34**). La présence de PdtA peut être détectée jusqu'en phase stationnaire pour les trois souches. Pour la suite des expériences, les bactéries ont été utilisées en phase exponentielle, à des DO₆₀₀ comprises entre 0,8 et 1, ce qui correspond à un maximum d'expression de PdtA et ce qui est en concordance avec ce qui avait été observé dans PAO1 (Faure et al., 2014).

III. PdtA est associée aux membranes

Nous voulions ensuite enquêter sur la localisation de la protéine dans la bactérie. En effet, les protéines TpsA sont soit sécrétées dans le milieu extracellulaire, soit ancrées dans la membrane externe, exposées à la surface de la bactérie, comme cela a été décrit dans l'introduction générale. Certaines peuvent être ancrées à la surface ou relâchées dans le milieu selon les conditions environnementales, comme c'est le cas pour la protéine CdrA de *P. aeruginosa* par exemple (Rybtke et al., 2015). Faure et al ont montré par un fractionnement subcellulaire que la protéine PdtA est retrouvée avec les protéines de la membrane externe. La même équipe a montré dans un modèle de surproduction de PdtA dans la souche de référence PAO1 qu'une partie de la protéine était détectée dans le surnageant et que l'autre partie, la partie C-terminale de 115 kDa, restait ancrée dans la membrane (Faure et al., 2014).

Nous avons réévalué la localisation de PdtA dans les souches cliniques en utilisant la technique d'immunofluorescence. Pour cela, dans un premier temps, un marquage avec les

anticorps anti-PdtA a été réalisé et les bactéries marquées ont été observées au microscope confocal. Les trois souches cliniques choisies précédemment pour l'étude de la croissance (*PaG19*, *PaG28* et *PaG30*) ont été utilisées pour visualiser la distribution de PdtA. Les images montrent que PdtA est bien exposée à la surface des bactéries, de la même manière pour les trois souches cliniques (**Figure 35, A**). En effet, on observe un marquage de PdtA tout autour des bactéries, pour les trois souches.

La production et la distribution de PdtA est identique dans ces trois souches cliniques, aux profils différents. Pour la suite des expériences, une seule souche modèle a été sélectionnée : *PaG30*. En effet, c'est une souche ExoS⁺ ayant une cytotoxicité moyenne et tardive par rapport aux souches ExoU⁺ et ExIA⁺, ce qui permet de pouvoir réaliser plus facilement des expériences sur les cellules eucaryotes et notamment des expériences d'adhésion aux cellules. Elle ne possède pas de flagelle ni de pili fonctionnels, qui sont des appendices impliqués dans l'adhésion et qui pourraient masquer l'effet de PdtA. Le gène *pdtA* a été délété dans la souche modèle *PaG30* pour servir de contrôle négatif pour la suite des expériences. Le gène *pdtB* qui code pour le transporteur de PdtA a également été délété dans la souche *PaG30*. Afin de vérifier que le phénotype observé soit bien dû à la délétion du gène *pdtB* et ne soit pas dû à effet polaire qui affecterait d'autres gènes, le gène *pdtB* a été réintroduit dans la souche *PaG30ΔpdtB* (Matériel et Méthodes).

Une expérience d'immunofluorescence a été réalisée sur la souche modèle *PaG30* et sur les souches *PaG30ΔpdtA*, *PaG30ΔpdtB* et *PaG30ΔpdtB::pSW196-pdtB* (**Figure 35, B**). Il n'y a aucun signal à la surface des bactéries *PaG30ΔpdtA* et *PaG30ΔpdtB*, confirmant que le signal observé est spécifique à PdtA. De plus, ces images permettent de confirmer que, sans PdtB, il n'y a pas de PdtA à la surface des bactéries dans notre souche modèle puisqu'il n'y a pas de signal autour des bactéries *PaG30ΔpdtB*, et que le signal est restauré dans la souche *PaG30ΔpdtB::pSW196-pdtB*.

Sur les images obtenues avec les souches sauvages (*PaG30*, *PaG19* et *PaG28*) et avec la souche complétée *PaG30ΔpdtB::pSW196-pdtB*, certaines bactéries sont collées les unes aux autres et PdtA est parfois détectée entre deux bactéries collées (**Figure 35**, flèches rouges). Cependant, il y a des spots correspondant à PdtA sur les bactéries agrégées de chaque côté des bactéries, pas uniquement à la jointure des bactéries. PdtA est également présente sur les bactéries isolées. Un comptage avec MicrobeJ, un module de Fiji (Schindelin et al., 2012) a été réalisé. 7 images indépendantes et représentant 5000 bactéries ont été utilisées pour le comptage et, en moyenne, il y a 2 signaux correspondant à PdtA par bactérie.

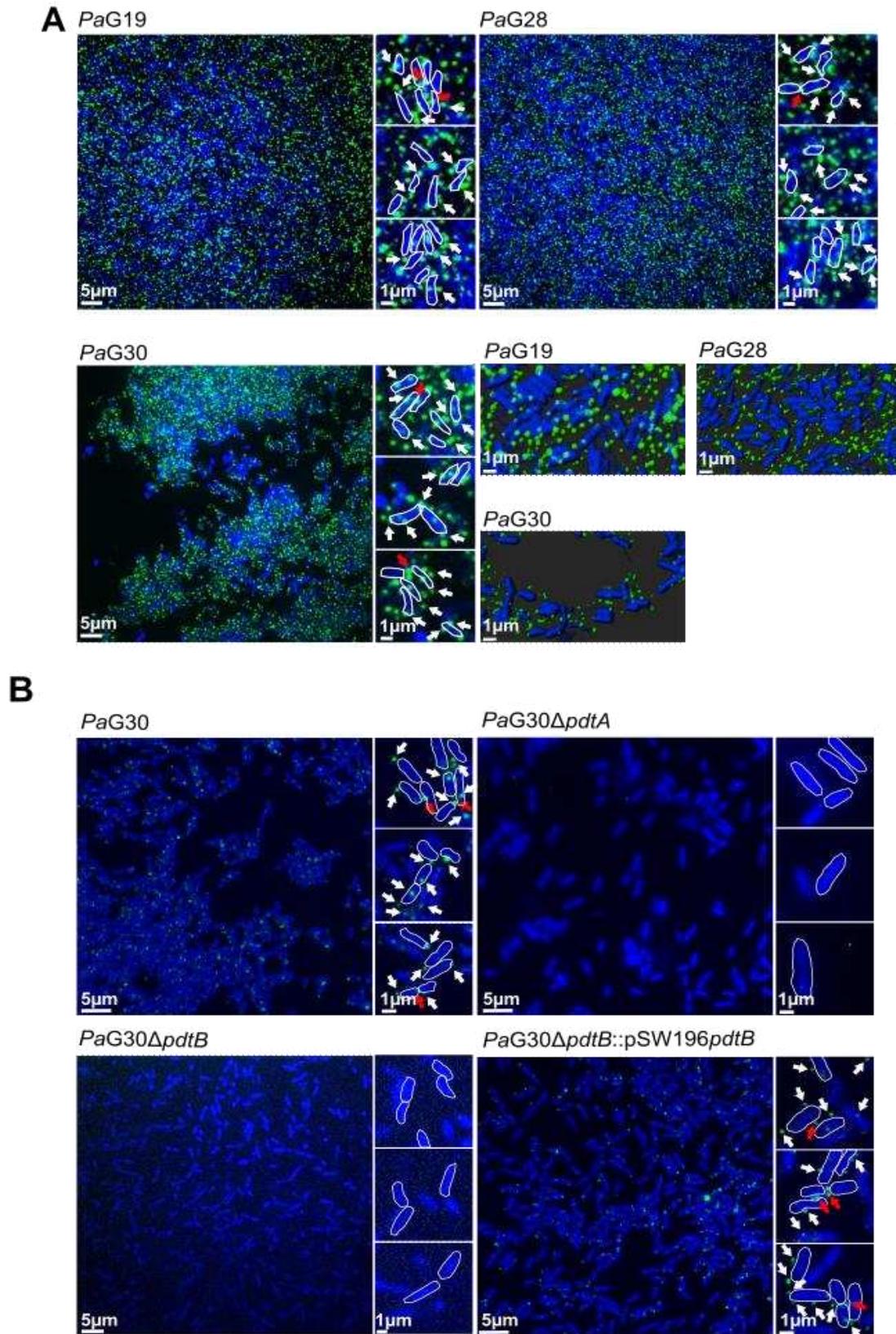


Figure 35. Visualisation de PdtA à la surface des bactéries par immunofluorescence.

Les bactéries ont été cultivées dans du LB jusqu'à une DO_{600} de 0,8 puis fixées avec du paraformaldéhyde 4% en suspension. Les marquages ont été réalisés avec les anticorps anti-PdtA à 1/200^{ème} puis les anticorps anti-IgG de lapin couplés à Alexa488 à 1/1000^{ème}. L'ADN des bactéries a été marqué avec Hoechst Vital. Les images ont été prises avec le microscope confocal de la plateforme M4D de l'IBS (S-M4D ; Olympus GATACA et Andor) et montées avec Imaris. Quelques bactéries ont été entourées afin de mieux visualiser. Les points correspondants à PdtA ont été indiqués avec des flèches blanches ou rouges pour les points situés entre deux bactéries. L'expérience a été réalisée en duplicats biologiques.

IV. Analyse phénotypique

Plusieurs tests phénotypiques ont été réalisés sur la souche modèle *PaG30*. Nous avons d'abord vérifié que l'absence de PdtA n'affecte pas la croissance bactérienne. Nous avons ensuite évalué le rôle de PdtA dans l'adhérence aux cellules eucaryotes, puis dans l'adhésion des bactéries entre elles. La formation de biofilm par la souche sauvage et par la souche $\Delta pdtA$ à la surface air-liquide a été quantifiée. Finalement, l'implication de PdtA dans la cytotoxicité a été évaluée.

Une courbe de croissance de la souche sauvage et de la souche *PaG30 $\Delta pdtA$* a été réalisée (Figure 31, A).

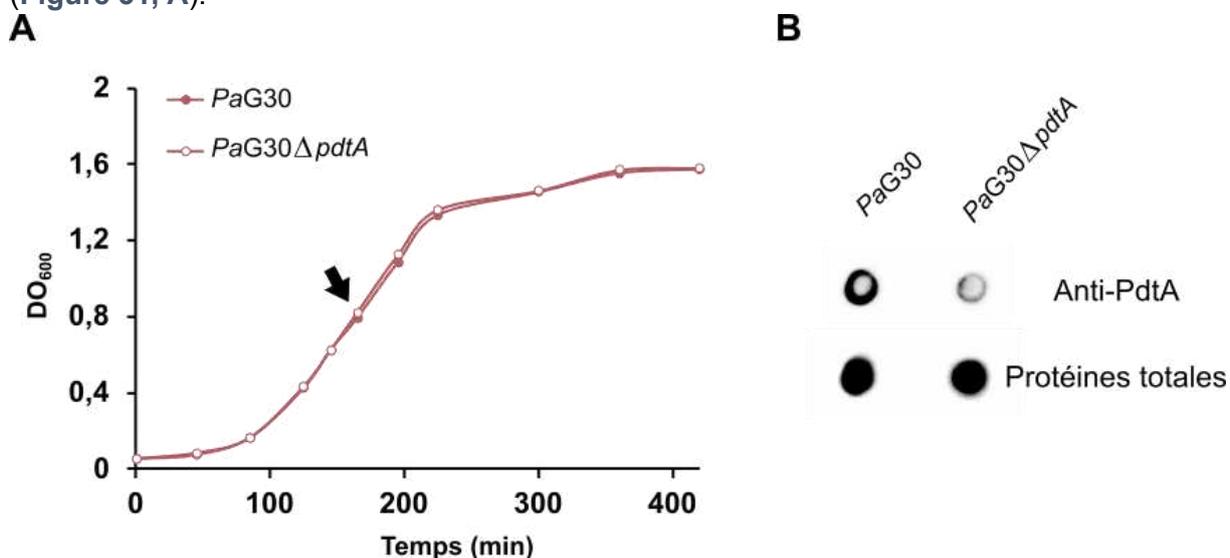


Figure 36. Croissance des souches *PaG30* et *PaG30 $\Delta pdtA$* en milieu LB.

A. Les cultures ont été diluées à une DO_{600} de 0,05 dans 30 mL de LB. La densité optique a été mesurée à intervalles réguliers jusqu'à atteindre le plateau de la phase stationnaire. **B.** Dot blot des souches *PaG30* et *PaG30 $\Delta pdtA$* . Les cultures ont été lysées et les extraits bactériens ont été déposés sur une membrane de nitrocellulose. Le dot blot a été réalisé avec les anticorps anti-PdtA. Les protéines totales ont été marquées avec le No Stain Protein Labeling (Invitrogen). La croissance de la souche sauvage et mutante a été mesurée lors de trois expériences indépendantes. Le dot blot des extraits bactériens a également été réalisé en triplicats biologiques.

Les deux souches ont la même croissance en milieu LB, la production de PdtA n'affecte pas la croissance bactérienne. Un dot blot a été réalisé sur les deux extraits bactériens des cultures au moment de la croissance indiqué sur la **figure 36 A**, qui correspond à une DO_{600} de 1. Le produit No Stain Protein Labeling (Invitrogen) a été utilisé pour marquer les protéines totales comme contrôle de charge (**Figure 36, B**). Le contrôle de charge montre qu'il y a une quantité de protéines équivalente dans les deux extraits, et le signal obtenu avec les anticorps anti-PdtA est beaucoup plus important pour les extraits bactériens de la souche sauvage par rapport à la souche $\Delta pdtA$. Les anticorps sont donc spécifiques de PdtA. Pour les tests phénotypiques, les bactéries ont été cultivées jusqu'à une DO_{600} de 0,8-1.

IV.1 Adhésion aux cellules eucaryotes

Selon la classification des protéines TpsA réalisée en comparant les domaines TPS, PdtA appartient à la famille des adhésines dites « HMW-like » (ref Faure et al). Comme ce type de protéine adhère aux cellules eucaryotes (Rempe et al., 2016; St Geme et al., 1993), nous avons évalué si c'était le cas pour PdtA. Pour cela, un premier test d'adhésion en suspension a été réalisé. Les bactéries *PaG30*, *PaG30 $\Delta pdtB$* et *PaG30 $\Delta pdtB$::pSW196-*pdtB** ont été incubées avec les cellules épithéliales (lignée A549) en suspension pendant 1h puis le milieu contenant les cellules eucaryotes et les bactéries a été filtré à travers un filtre de 3 μ m (transwell, Greiner). La taille des bactéries étant de l'ordre du micromètre (**Figure 35, B**), elles peuvent passer à travers le filtre mais ce n'est pas le cas des cellules eucaryotes qui mesurent une quarantaine de μ m. Le nombre de bactéries de l'inoculum utilisé pour infecter les cellules a été quantifié par unité formatrice de colonie (en Anglais - Colony Forming Unit (CFU)) (Matériel et Méthodes). De même, le nombre de bactéries présentes dans le milieu récupéré après le passage sur le filtre a été déterminé par CFU. Le ratio du nombre de bactéries utilisées pour l'infection sur le nombre de bactéries récupérées dans le surnageant après filtration donne le pourcentage de bactéries restées sur le filtre. Pour la souche *PaG30 $\Delta pdtB$* , toutes les bactéries sont récupérées dans le milieu après filtration. En revanche, pour la souche sauvage, environ 50% des bactéries seulement sont récupérées après filtration. Lorsque PdtB est à nouveau produit dans la souche *PaG30 $\Delta pdtB$* , on obtient les mêmes résultats que pour la souche sauvage puisque 58% des bactéries restent dans le filtre (**Figure 37, A**). Ces résultats suggèrent que les bactéries *PaG30* adhèrent aux cellules eucaryotes par le biais de PdtA.

Pour confirmer ces données, les cellules A549 avec les bactéries ont été visualisées par microscopie. Les souches *PaG30* et *PaG30 $\Delta pdtB$* produisant la GFP constitutivement ont été

construites (Matériel et Méthodes) et utilisées pour cette expérience pour faciliter la visualisation des bactéries. Les cellules ont étéensemencées sur une lamelle dans une chambre de culture (Labteck, 2 puits) et infectées par les bactéries fluorescentes. Le noyau des cellules a été marqué avec le colorant Hoechst. L'infection a été suivie au microscope à fluorescence (S-M4D ; Olympus GATACA et Andor). Après 4h d'infection, on observe de nombreuses bactéries présentes au contact des cellules. Le milieu a été retiré et les puits ont été lavés avec du PBS afin d'éliminer les bactéries non adhérentes. Des images ont été prises avant et après lavage. Après les lavages, on observe les cellules A549 (marquage bleu des noyaux avec Hoechst) seules, il n'y a pas de bactéries GFP-positives attachées aux cellules, suggérant que les bactéries n'adhèrent pas aux cellules eucaryotes (**Figure 37, B**).

Le test en suspension suggère que les bactéries exprimant PdtA à leur surface adhèrent aux cellules eucaryotes, mais la microscopie montre que les bactéries n'adhèrent pas (ou très peu). Cette différence de résultats entre les deux techniques, suggère qu'il y a un biais dans l'expérience en suspension. En effet, la microscopie permet de visualiser le phénotype d'adhésion, alors que le test en suspension ne permet pas de confirmer visuellement l'adhésion des bactéries aux cellules. Les images d'immunofluorescence indiquent que certaines bactéries s'agglutinent les unes aux autres (**Figure 35**), ce qui n'a pas été observé avec le mutant. Nous avons donc émis l'hypothèse que PdtA facilite l'auto-agrégation des bactéries, ce qui pourrait expliquer les résultats obtenus avec les cellules en suspension : les bactéries agrégées ne passeraient pas à travers le filtre. La différence observée entre le nombre de bactéries avant et après passage à travers le filtre serait dû à l'auto-agrégation des bactéries et non à l'adhésion aux cellules eucaryotes.

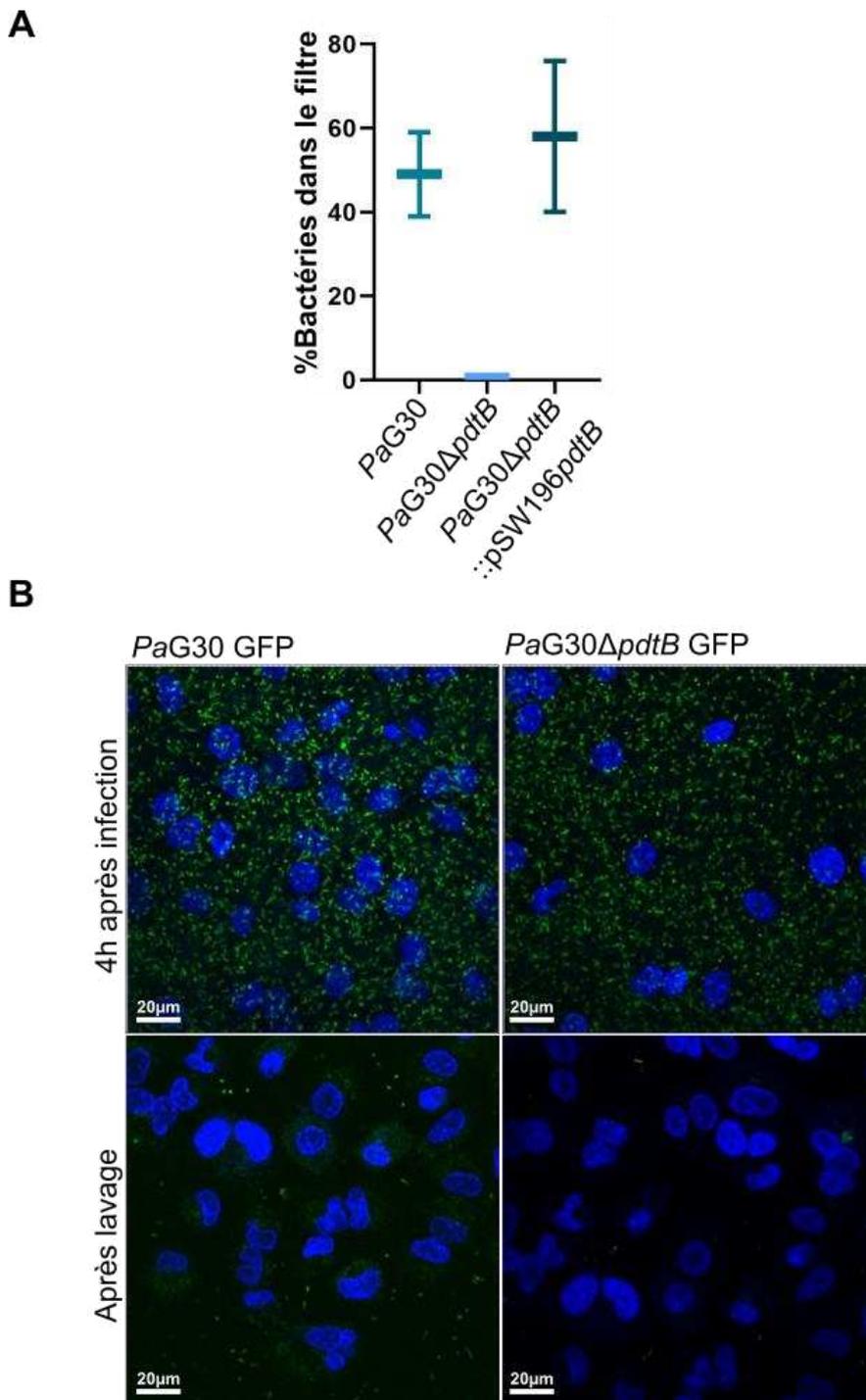


Figure 37. Test d'adhésion aux cellules eucaryotes.

A. Quantification du nombre de bactéries adhérentes en suspension. Les bactéries ont été ajoutées aux cellules à une MOI de 10. Après 30 min d'infection, la suspension cellulaire a été filtrée par passage à travers un filtre de 3 μ m. Les CFUs de l'inoculum et du milieu après passage sur filtre ont été réalisées. Le pourcentage de bactéries restées dans le filtre a été calculé. **B.** Visualisation microscopique des bactéries adhérentes. Les cellules A549 ont étéensemencées dans un Labteck 2 puits et marquées avec Hoechst Vital. Elles ont été infectées à une MOI de 10 avec les souches *PaG30* et *PaG30ΔpdtB* produisant la GFP et après 4h d'infection elles ont été lavées 3 fois avec du PBS. Des images ont été prises avant et après lavage. Les expériences ont été réalisées en duplicat biologique.

Nous avons ensuite cherché à valider ce phénotype en utilisant plusieurs techniques, dont le passage de la culture bactérienne (en absence des cellules eucaryotes) à travers le filtre de 3µm.

IV.2 Auto-agrégation des bactéries produisant PdtA

a) Milieu SCFM2

Premièrement, des expériences d'auto-agrégation ont été réalisées en milieu LB mais nous avons aussi évalué l'auto-agrégation dans le milieu Synthetic Cystic Fibrosis Medium amélioré (SCFM2). Le milieu SCFM a été mis au point pour mimer l'environnement pulmonaire des patients atteints de la mucoviscidose. Dans ce milieu, les bactéries ont la même croissance et le même profil d'expression de gènes que les bactéries isolées des expectorations des patients atteints de la mucoviscidose (Palmer et al., 2007). Ce milieu a été ensuite amélioré en ajoutant des éléments présents dans les poumons des patients ayant la mucoviscidose (Turner et al., 2015). Le milieu SCFM complété avec du 1,2-dioleoyol-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) et de l'ADN de sperme de saumon a été nommé SCFM2. Ce milieu reproduit les conditions d'une infection chronique chez les patients atteints de la mucoviscidose et il permet la formation d'agrégats semblables à ceux observés dans les voies respiratoires des patients atteints la mucoviscidose (Darch et al., 2017). En effet, lors des infections chroniques, les bactéries sont souvent retrouvées sous la forme d'agrégats denses, comportant entre 10 et 10 000 bactéries, et les souches cultivées dans ce milieu forment des agrégats similaires.

Le milieu préparé ne contient pas de mucine afin de pouvoir lire la densité optique des cultures (Matériel et Méthodes). Dans un premier temps, la croissance des bactéries dans ce milieu a été évaluée (**Figure 38, A**). Par rapport à la croissance en milieu LB, la croissance n'est pas significativement affectée et les valeurs de la DO_{600} correspondent aux mêmes phases de croissance dans les deux milieux. Pour la suite des expériences, les souches ont donc été cultivées en milieu LB ou SCFM2 et utilisées aux mêmes DO_{600} , de 0,8 à 1, ce qui correspond à la phase exponentielle dans les deux milieux de culture.

La production de PdtA dans le milieu SCFM2 a été vérifiée par dot blot en utilisant la souche sauvage *PaG30* et la souche mutante *PaG30ΔpdtA*. Les souches ont été cultivées dans le milieu SCFM2 jusqu'à atteindre une DO_{600} de 1 (DO_{600} à laquelle PdtA est produite en milieu LB). Comme le montre la **figure 38, B**, *PaG30* donne un signal beaucoup plus important que la souche contrôle négative $\Delta pdtA$ pour une quantité de protéines déposée équivalente. Cela montre que PdtA est bien synthétisée en milieu SCFM2 en phase exponentielle, comme en milieu LB.

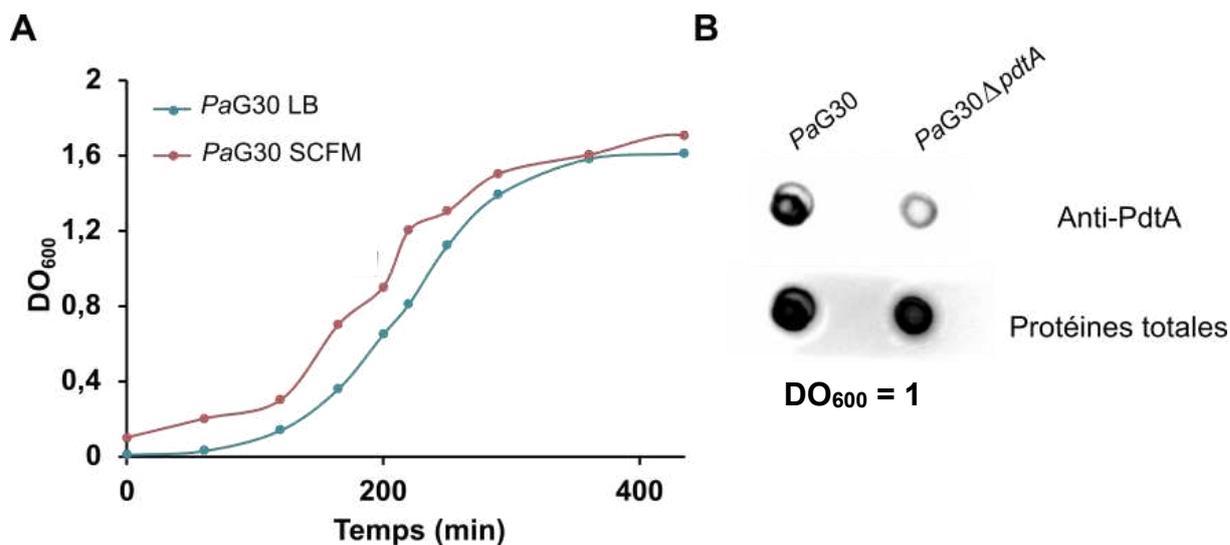


Figure 38. Croissance et production de PdtA dans le milieu SCFM2.

A. Croissance de la souche modèle *PaG30* dans les milieux LB et SCFM2. Les bactéries ont été pré cultivées dans 2mL de milieu LB ou SCFM à 37°C et 300rpm toute la nuit. Les souches ont été diluées à une DO_{600} de 0,1 et la densité optique a été mesurée au cours du temps jusqu'à atteindre le plateau de phase stationnaire. **B.** Dot blot anti-PdtA. Les extraits bactériens des souches *PaG30* et *PaG30ΔpdtA* cultivées en milieu SCFM2 à une DO_{600} de 1 ont été déposés sur une membrane de nitrocellulose, puis incubées avec les anticorps anti-PdtA puis des anticorps secondaires anti-lapin couplés à la HRP. Les protéines totales ont été marquées avec No Stain Protein Labeling (Invitrogen). La croissance de *PaG30* en milieu SCFM2 a été mesurée une seule fois et la présence de PdtA par dot blot a été évaluée en triplicats biologiques.

b) Observation des agrégats par microscopie

Pour caractériser les agrégats, nous avons, dans un premier temps, effectué des observations par microscopie de la souche *PaG30* et *PaG30ΔpdtA* produisant ou non mCherry. Les souches ont été cultivées en milieu LB ou SCFM2 à 37°C jusqu'à atteindre une DO_{600} de 1. Les bactéries ont ensuite été observées au microscope confocal (S-M4D ; Olympus GATACA et

Andor). La **figure 39** montre un choix d'images qui illustrent les résultats observés dans les deux milieux.

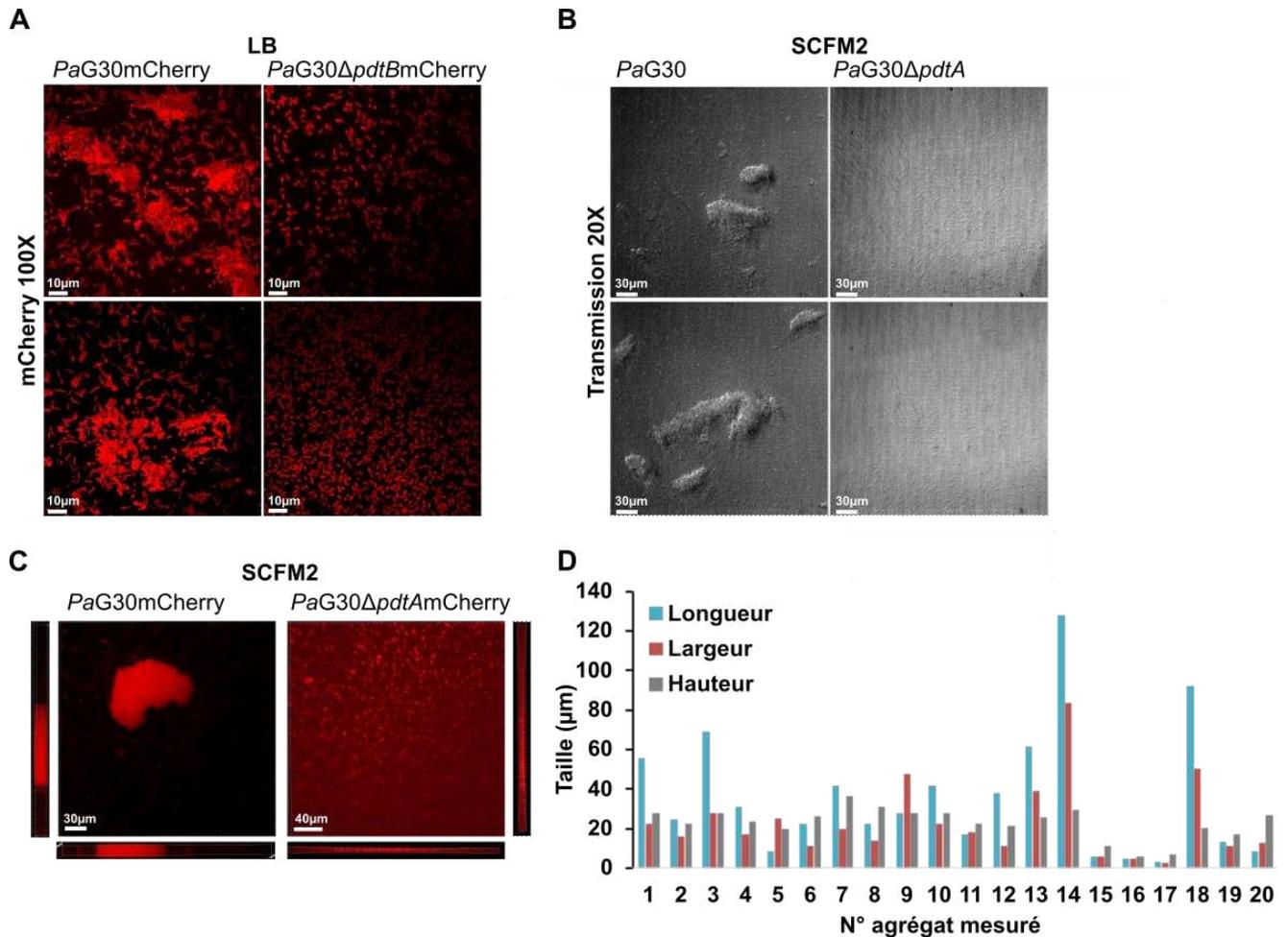


Figure 39. Observation des agrégats médiés par PdtA par microscopie.

A. Visualisation microscopique des souches *PaG30mCherry* et *PaG30ΔpdtBmCherry*. Les bactéries ont été cultivées en milieu LB jusqu'à une DO_{600} de 0,8 et directement mises entre lame et lamelles et observées au microscope confocal. **B.** Visualisation microscopique des souches *PaG30* et *PaG30ΔpdtA* en avec un objectif 20X. **C.** Visualisation 3D des agrégats. Les bactéries fluorescentes ont été observées au microscope et plusieurs images à différents z ont été prises. Une reconstruction 3D des images a été réalisée avec le logiciel Imaris. Les images ont été prises avec le logiciel Metamorph et les images ont été montées sur Imaris. **D.** Quantification de la taille des agrégats des bactéries *PaG30*. 20 agrégats ont été mesurés à partir des reconstructions 3D obtenues avec le microscope confocal, avec le logiciel Imaris. Les expériences ont été réalisées au moins en triplicat biologique.

Dans les deux milieux, les bactéries *PaG30* s'auto-agrègent alors que les bactéries ne produisant pas PdtA sont toutes isolées. En milieu LB, les bactéries *PaG30* se collent les unes aux autres, formant des agrégats mais avec peu de relief (**Figure 39, A**). En milieu SCFM2, les bactéries *PaG30* forment des agrégats plus grands et en relief. Des images en transmission ont été réalisées avec les souches *PaG30* et *PaG30ΔpdtA* cultivées en milieu SCFM2 afin de mieux rendre compte du relief des agrégats des bactéries *PaG30* dans ce

milieu (**Figure 39, B**). Des images en fluorescence ont également été prises avec le microscope confocal sur les souches exprimant mCherry et une reconstruction 3D a été réalisée (**Figure 39, C**). La taille de 20 agrégats a été mesurée à partir des reconstructions 3D obtenues. Les agrégats ont des tailles variées, allant de 4 μ m de longueur et de largeur à 130 μ m de longueur pour 80 μ m de largeur (**Figure 39, D**). Les agrégats mesurent en moyenne 35 μ m de longueur et 23 μ m de largeur, et la plupart mesurent entre 20 μ m et 40 μ m de longueur et de largeur. Les bactéries *PaG30 Δ pdtA* sont isolées les unes des autres, comme en témoignent les images en transmission ainsi que les reconstructions 3D. Il y a quelques bactéries agrégées mais les agrégats sont beaucoup plus petits, faisant entre 5 et 10 μ m.

c) Mise au point d'un protocole pour quantifier les agrégats

Afin de confirmer ces observations qualitatives obtenues par microscopie, nous avons quantifié le nombre d'agrégats présents dans les cultures des différentes souches. Pour cela, j'ai mis au point un protocole permettant de séparer les bactéries agrégées des bactéries planctoniques et de les quantifier. J'ai d'abord utilisé une technique inspirée de la littérature (Guo et al., 2016). Les bactéries ont été cultivées en milieu LB ou SCFM2 dans 2mL jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 1. La culture a ensuite été séparée en deux : 1mL a été soumis à une centrifugation basse vitesse de 800rpm pendant 5min et l'autre partie de la culture a été soumise à un vortex afin de dissocier les agrégats. En effet, à cette vitesse, les bactéries planctoniques restent en suspension mais les agrégats, plus lourds, sédimentent lors de la centrifugation. Le ratio du nombre de bactéries présentes après centrifugation à basse vitesse sur le nombre de bactéries présentes initialement dans la culture donne le nombre de bactéries agrégées. Cependant, cette technique ne permet pas de séparer avec une barrière physique les agrégats des bactéries planctoniques. Au vu des résultats obtenus lors du test d'adhésion en suspension, j'ai choisi d'utiliser le filtre de 3 μ m pour séparer les bactéries agrégées des bactéries planctoniques. J'ai cultivé les bactéries dans 2mL de milieu LB ou SCFM2 jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 1. De la même manière que pour le protocole précédent, la culture a été séparée en deux. Les agrégats ont été dispersés par vortex dans la première partie de la culture afin de pouvoir mesurer les CFUs. L'autre partie de la culture a été filtrée sur le filtre 'transwell' de 3 μ m, ce que doit permettre de retenir les agrégats, qui sont supérieurs à 3 μ m. Ce « cut-off » permet de séparer les bactéries planctoniques qui mesurent entre 1 et 2 μ m comme nous avons pu l'évaluer sur les images obtenues en microscopie (**Figure 39**) des agrégats qui mesurent plus que 3 μ m. Les nombres de CFU de la culture initiale ainsi que les CFU du surnageant de la culture filtrée ont été déterminés. Le ratio du nombre de bactéries présentes après filtration sur le nombre de bactéries présentes dans la culture initiale donne le pourcentage de bactéries non agrégées (**Figure 40**).

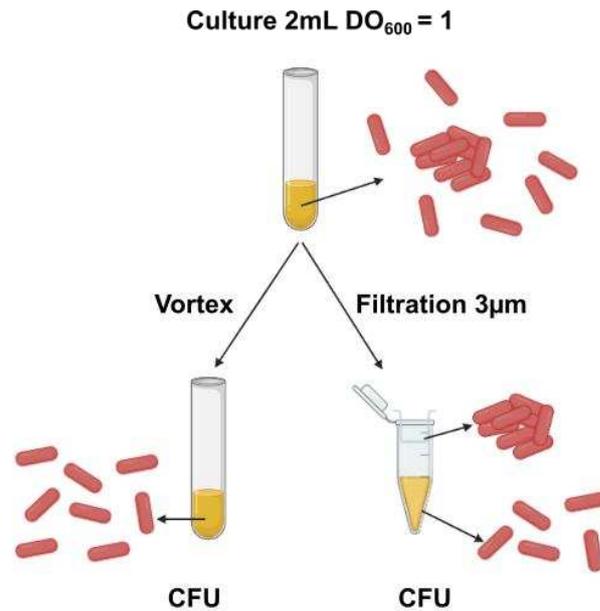


Figure 40. Protocole mis au point pour mesurer le pourcentage de bactéries agrégées.
Réalisé sur BioRender.com

De plus, un contrôle a été effectué par microscopie avant et après filtration afin de confirmer que le filtre sépare bien les bactéries agrégées des bactéries isolées (**Figure 41, A**). Nous avons confirmé l'absence d'agrégats dans la culture après le passage à travers le filtre de 3µm. Les agrégats ne traversent pas le filtre, la différence du nombre de bactéries décomptées avant et après passage à travers le filtre est donc bien dû à la perte des agrégats par filtration.

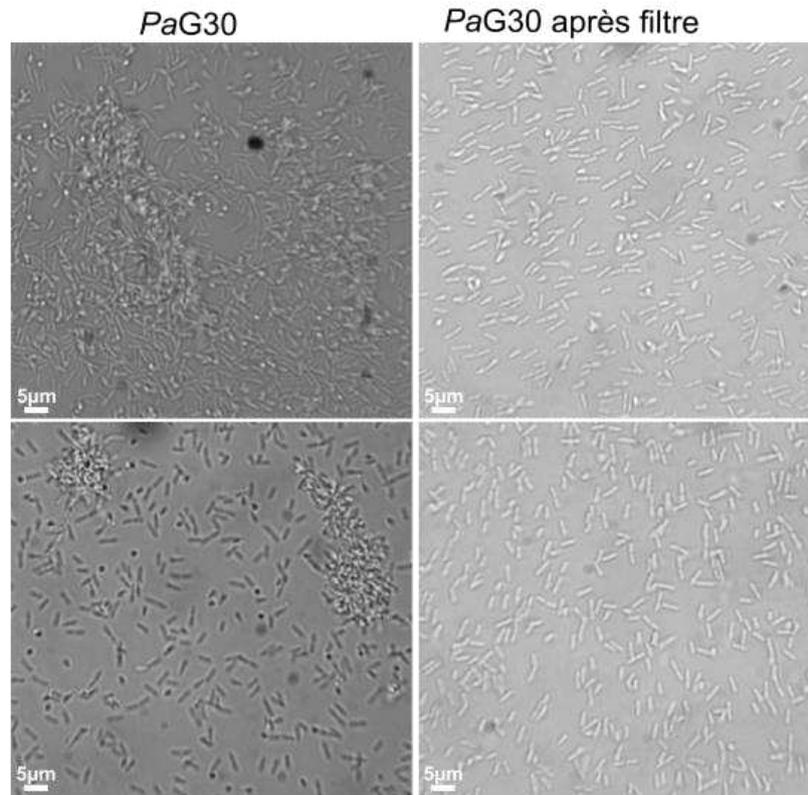
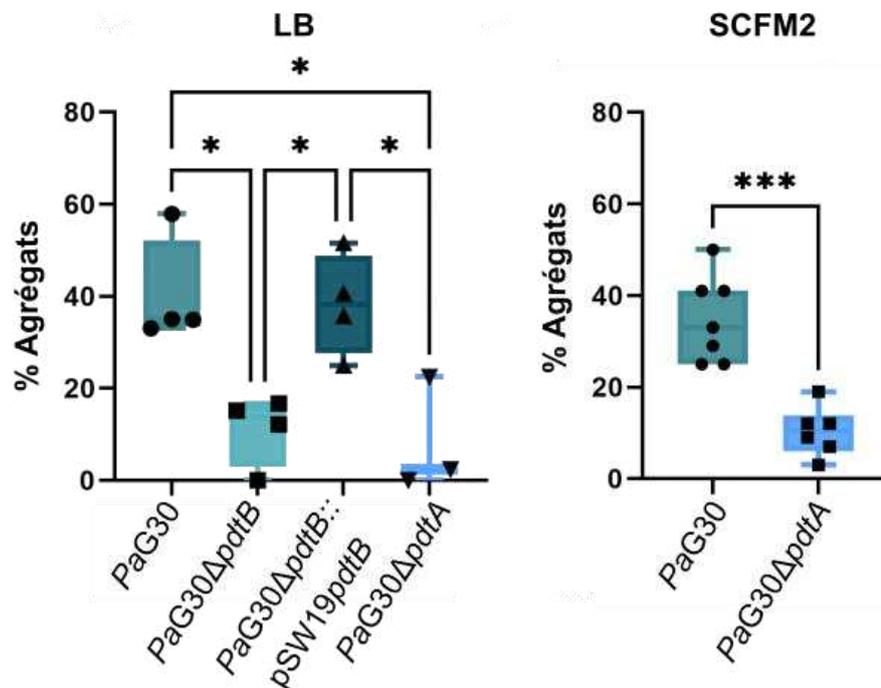
A**B**

Figure 41. Quantification des agrégats en milieu LB et SCFM2.

A. Une visualisation microscopique de la culture de la souche *PaG30* en milieu LB avant et après passage sur le filtre de 3µm a été réalisée. **B.** Quantification du nombre d'agrégats. Une ANOVA a été réalisée et une comparaison deux à deux a été faite afin de comparer chaque souche avec les autres. Par soucis de clarté, seules les différences significatives ont été indiquées sur le graphique. $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***). Chaque réplicat biologique est représenté par un point sur le graphique,

les statistiques ont été réalisées sur l'ensemble des réplicats biologiques obtenus. Chaque expérience a été réalisée en triplicat technique.

Par cette méthode, nous avons estimé que, en milieu LB, il y a en moyenne 40% des bactéries totales qui sont agrégées pour *PaG30*. Pour la souche $\Delta pdtB$ ou $\Delta pdtA$, les bactéries s'auto-agrègent significativement moins, en moyenne seulement 11% et 8% respectivement des bactéries totales sont agrégées. De plus, lorsque l'on produit à nouveau PdtB dans la souche *PaG30 $\Delta pdtB$* , le phénotype est complété puisque 38% en moyenne des bactéries totales sont agrégées. Cette complémentation prouve que le phénotype observé dans les souches $\Delta pdtB$ et $\Delta pdtA$ est bien dû à l'absence de la protéine PdtA à la surface des bactéries. En milieu SCFM2, milieu plus coûteux, les expériences ont été réalisées uniquement sur la souche sauvage *PaG30* et sur la souche *PaG30 $\Delta pdtA$* . Dans ce milieu, 35% des bactéries *PaG30* sont retrouvées dans les agrégats contre seulement 10% pour la souche sans *pdtA*. Un test de Student a montré que la différence de moyenne entre ces deux souches était significative (**Figure 41, B**). Cependant, le nombre d'agrégats mesuré en milieu SCFM2 est un peu plus faible que celui mesuré en milieu LB. Les images obtenues montrent que les agrégats en milieu SCFM2 sont plus grands et semblent plus compacts qu'en milieu LB, l'utilisation du vortex pendant 30s n'est peut-être pas suffisante pour les dissocier complètement. Les CFUs de l'inoculum pourraient donc être sous-estimées si les bactéries sont encore agrégées. La différence avec le mutant est tout de même significative, confirmant le rôle de PdtA dans l'auto-agrégation.

d) Dynamic Light Scattering (DLS)

Afin de confirmer la présence d'agrégats dans les cultures bactériennes et de mesurer la taille des agrégats, j'ai utilisé une technique biophysique : la diffusion dynamique de la lumière ou Dynamic Light Scattering (DLS). C'est une technique d'analyse permettant de mesurer la taille et la distribution de la taille des particules dans une solution et qui a déjà été utilisée pour détecter la présence d'agrégats (Stetefeld et al., 2016; Vargas et al., 2017).

L'échantillon est exposé à une lumière monochromatique. Lorsque le faisceau rencontre une particule, la lumière diffuse dans toutes les directions et un détecteur capte l'intensité lumineuse à un endroit précis. La taille des particules peut être déterminée à partir du signal reçu par le détecteur. Le signal est traité pour donner directement le profil de distribution des particules en fonction de leur taille, grâce à des modèles mathématiques.

Les bactéries ont été cultivées comme indiqué précédemment, en milieu LB ou SCFM2. Lorsque les bactéries ont atteint une DO_{600} de 1, 40 μ L de culture ont été mis dans une

microcuvette qui a été placée dans l'appareil Dynapro Nanostar (Wyatt). Afin d'être représentatif de l'échantillon, 3 mesures représentant chacune 10 acquisitions ont été prises.

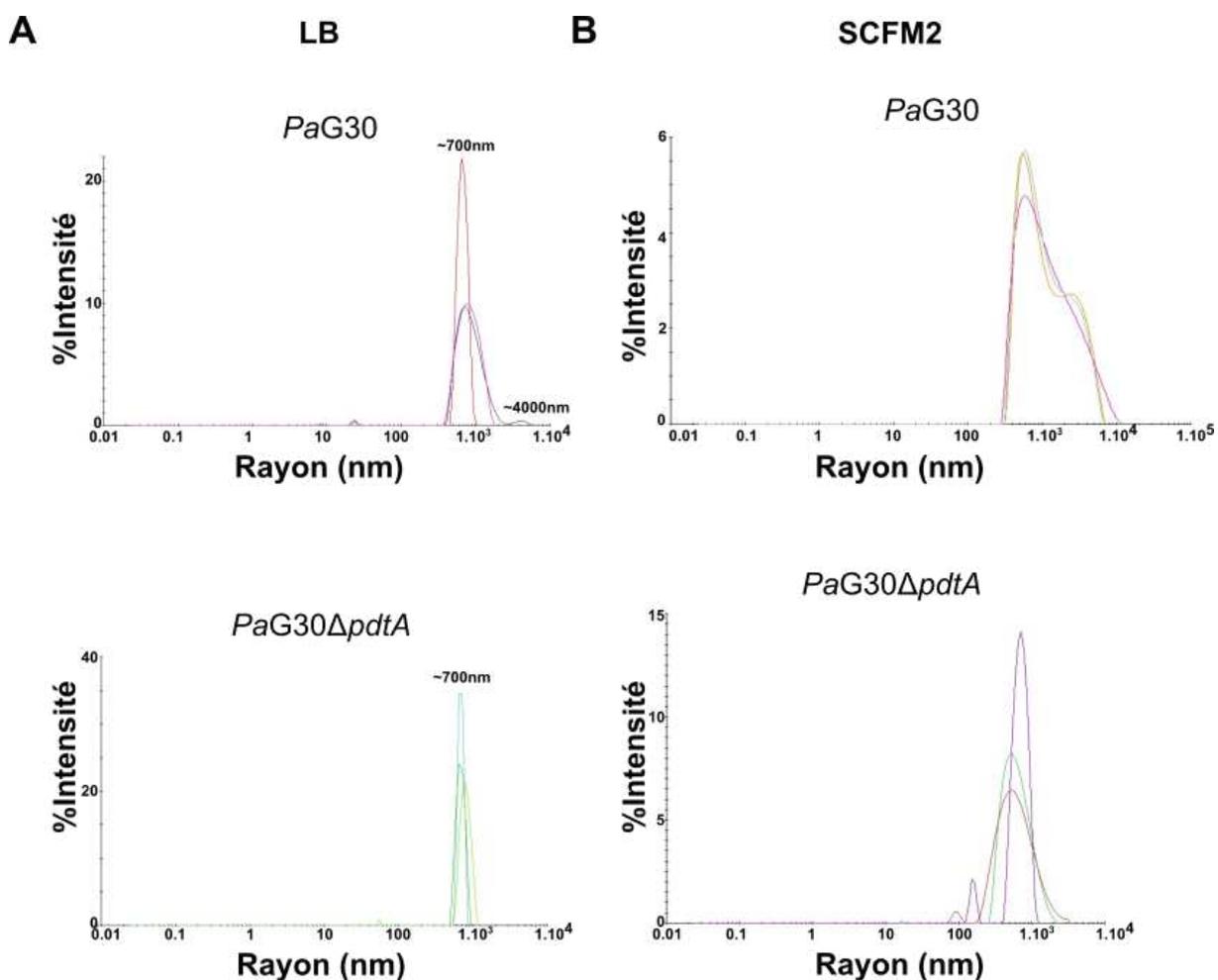


Figure 42. Analyse de la taille des bactéries dans les cultures bactériennes de *PaG30* et *PaG30ΔpdtA* par diffusion dynamique de la lumière.

A. Distribution des particules présentes dans les cultures *PaG30* et *PaG30ΔpdtA* en milieu LB. 40μL de culture ont été mis dans une microcuvette UV et analysé par le Dynapro Nanostar (Wyatt). Les données ont été analysées avec le logiciel DYNAMICS et les courbes ont été obtenues par ce logiciel. **B.** Distribution des particules présentes dans les cultures *PaG30* et *PaG30ΔpdtA* en milieu SCFM2. Les cultures ont été analysées de la même manière qu'en milieu LB. Chaque expérience a été réalisée en triplicats biologiques et une seule est montrée.

L'analyse DLS de la culture *PaG30* montre que la culture est hétérogène dans les deux milieux. En effet, nous pouvons voir qu'il y a plusieurs pics, un premier pic qui correspond à des particules de 700nm de rayon, correspondant probablement à des bactéries planctoniques. En revanche, sur une mesure sur les trois en milieu LB, il y a un autre pic de bactéries agrégées, mesurant 4μm de rayon (**Figure 42, A**). En milieu SCFM2, ce pic d'agrégats est détecté dans deux mesures sur les trois réalisées (**Figure 42, B**). En milieu LB,

la culture *PaG30ΔpdtA* est homogène, avec un seul pic de particules monodisperses de 700 nm. En milieu SCFM2, un seul pic est détecté également mais les particules sont un peu plus polydisperses, le pic est plus large. Cela suggère qu'il y a quelques agrégats dans la culture mais plus petits que ceux présents dans la souche sauvage, la taille des particules détectées est plus petite dans les cultures des souches mutantes que dans celles des souches sauvages.

En milieu LB comme en milieu SCFM2, la souche *PaG30* forme plus d'agrégats que la souche mutante *PaG30ΔpdtA*. Les agrégats détectés en milieu SCFM2 sont plus nombreux qu'en milieu LB, ce qui est en concordance avec les observations microscopiques. Cependant, cette technique ne permet pas de détecter des particules plus grosses que 10µm, et donc certains agrégats en milieu SCFM2 ne sont probablement pas détectés.

Toutes ces expériences démontrent qualitativement et quantitativement que PdtA est impliquée dans la formation d'agrégats dans le milieu riche LB et dans le milieu SCFM2.

IV.3. Etude de la formation de biofilms

P. aeruginosa est capable de former différents types de biofilm en fonction de son environnement. Les biofilms formés lors des infections chroniques sont les biofilms attachés à une surface solide. Par contre, dans les cultures liquides statiques, *P. aeruginosa* est capable de former une pellicule à la surface air-liquide (Friedman and Kolter, 2003). Il est facile de quantifier ces biofilms au laboratoire en les dissolvant et en les colorant avec du cristal violet.

Nous avons montré que PdtA est impliquée dans la formation d'agrégats en suspension, lors de la phase exponentielle de la croissance bactérienne. Nous voulions savoir si PdtA était également impliquée dans la formation des biofilms, phénotype qui apparaît plus tard et en culture statique. En effet, l'auto-agrégation des bactéries peut avoir plusieurs fonctions, dont l'une serait d'aider à la formation des biofilms matures bien que ce soient deux phénotypes différents (Trunk et al., 2018). Les bactéries ont été incubées à une DO_{600} de 0,05 à 30°C pendant 24h pour que les biofilms puissent se développer à l'interface air-liquide (Friedman and Kolter, 2003). Le biofilm formé a été coloré au cristal violet, puis dissout et l'absorbance à 550nm a été mesurée. Le milieu seul incubé dans les mêmes conditions a été utilisé comme contrôle négatif et comme blanc pour réaliser les mesures d'absorbance.

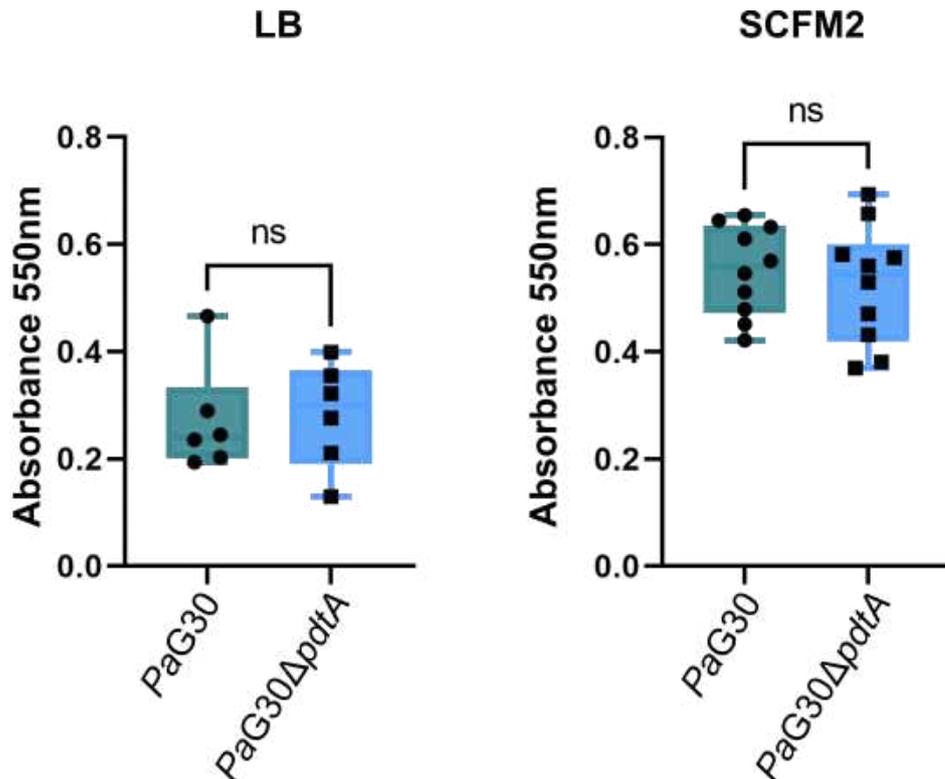


Figure 43. Quantification du biofilm à la surface air-liquide.

Quantification du biofilm à la surface air-liquide. Les bactéries ont été diluées à une DO_{600} de 0,05 dans 1mL de milieu LB ou SCFM2 et incubées pendant 24h à 30°C. Le biofilm formé a été coloré avec le cristal violet et l'absorbance à 550nm a été mesurée pour la quantification après dissolution du cristal violet. Les graphiques et les statistiques ont été faits sur GraphPad. L'expérience a été réalisée en deux réplicats biologiques, en au moins six réplicats techniques pour chaque expérience indépendante.

Dans les deux milieux, il y a formation d'un biofilm à l'interface air-liquide, puisqu'on mesure une absorbance supérieure à celle mesurée avec le milieu seul où il n'y a pas de biofilm. Le biofilm est plus abondant dans le milieu SCFM2 qu'en milieu LB, cependant un test de Student a montré qu'il n'y a pas de différence significative entre la souche sauvage et la souche $\Delta pdtA$ (**Figure 43**). L'auto-agrégation dépendante de PdtA n'a donc pas de rôle dans la formation d'un biofilm air-liquide (Friedman and Kolter, 2003).

IV.4 Cytotoxicité

L'auto-agrégation médiée par PdtA n'ayant pas de rôle dans la formation de biofilm à la surface air-liquide, nous avons voulu évaluer l'implication de PdtA dans la cytotoxicité. En effet, un autre rôle possible de l'auto-agrégation est de favoriser la pathogénicité comme cela a été vu dans l'introduction générale (II.3). L'auto-agrégation permet par exemple de concentrer les facteurs de virulence sécrétés à proximité des cellules hôtes (Guerry, 2007). De plus, il a été montré dans la littérature que PdtA jouait un rôle dans la virulence en utilisant comme modèle

C. elegans (Faure et al., 2014). Cependant, la fonction exacte de la protéine n'a pas été déterminée.

Nous avons donc utilisé la même technique que celle employée pour évaluer la cytotoxicité des souches cliniques (II.3 ; b). La souche modèle *PaG30* étant *ExoS⁺*, nous avons évalué la cytotoxicité de cette souche et du mutant $\Delta pdtA$ sur les macrophages J774. Les MOI plus faibles permettent de mettre en avant des effets plus légers, qui peuvent être masqués à des MOI plus élevées car la quantité de bactéries est trop importante pour détecter une différence entre deux souches. Une gamme de plusieurs MOI a donc été testée : 0,1 ; 0,5 ; 5 et 50.

En comparant les courbes obtenues, nous pouvons constater un décalage du début de l'incorporation d'IP dans les macrophages en présence de la souche *PaG30 $\Delta pdtA$* par rapport à la souche sauvage, qui se réduit lorsque la MOI augmente (**Figure 44, A**). La différence n'est plus visible à la MOI de 50, l'effet est masqué par la quantité de bactéries trop importante. Afin de confirmer ce phénotype, l'expérience a été réalisée avec les souches *PaG30 $\Delta pdtB$* et *PaG30 $\Delta pdtB$::pSW196*pdtB**, mais uniquement à des MOI faibles (0,5 et 1). De même qu'avec la souche $\Delta pdtA$, la mort des cellules est plus tardive avec la souche *PaG30 $\Delta pdtB$* . Avec la souche *PaG30 $\Delta pdtB$::pSW196*pdtB**, les cellules commencent à mourir au même moment qu'avec la souche sauvage, démontrant que le retard est bien dû à l'absence de PdtB et donc, de PdtA à la surface des bactéries. Aux MOI les plus faibles, les souches *PaG30 $\Delta pdtA$* et *PaG30 $\Delta pdtB$* tuent moins de cellules que la souche sauvage puisque le plateau correspondant au maximum de cellules tuées est plus bas. La souche *PaG30 $\Delta pdtB$::pSW196*pdtB** induit la mort cellulaire du même nombre de cellules que la souche sauvage puisque le plateau est le même.

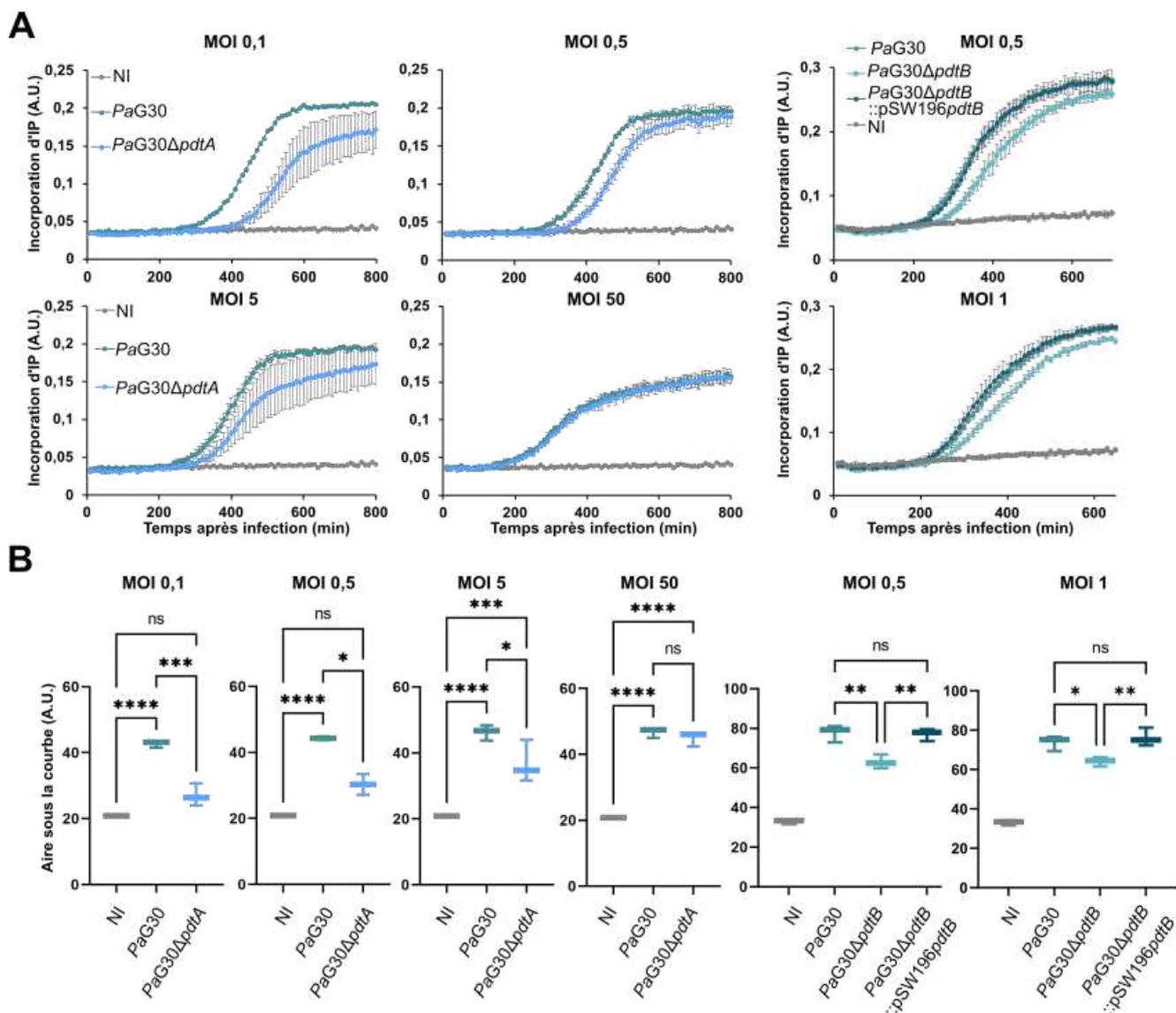


Figure 44. Implication de PdtA dans la cytotoxicité.

La cytotoxicité des souches *PaG30*, *PaG30ΔpdtA*, *PaG30ΔpdtB* et *PaG30ΔpdtB* ::pSW196pdtB à plusieurs MOI a été évaluée sur les macrophages J774. **A**. Courbes représentant l'incorporation d'IP dans les cellules mortes au cours du temps. Les cellules ont été cultivées dans du DMEM complété de SVF 10% et d'IP. Les bactéries ont été cultivées dans du milieu LB jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 1 et ajoutées sur les cellules à la MOI indiquée. **B**. L'aire sous la courbe de 0 à 570 min a été calculée pour chaque souche à chaque MOI. Une ANOVA suivi d'une comparaison deux à deux a été réalisée sur GraphPad. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****). L'expérience a été réalisée en triplicats techniques et en au moins deux réplicats biologiques.

L'aire sous la courbe à 570 min, ce qui correspond au plateau atteint par la souche *PaG30* à la MOI la plus faible, a été calculée pour toutes les conditions. (**Figure 44, B**). Une analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée pour comparer les souches *PaG30* et *PaG30ΔpdtA* à chaque MOI ainsi que le contrôle négatif des cellules non infectées. Aux MOI de 0,1 ; 0,5 et 5,

il y a une différence significative entre la souche sauvage et la souche *PaG30ΔpdtA*. A la MOI 50, le nombre de cellules mortes est similaire, l'effet de PdtA est masqué lorsqu'il y a autant de bactéries, la cinétique est trop rapide. Pour les souches *PaG30ΔpdtB* et *PaG30ΔpdtB ::pSW196pdtB*, aux deux MOI testées, il y a une différence significative entre le nombre de cellules tuées par la souche sauvage et par la souche *ΔpdtB*. De même, il y a une différence significative du niveau de cytotoxicité des souches *PaG30ΔpdtB* et *PaG30ΔpdtB ::pSW196pdtB*. Il n'y a pas de différence significative entre la souche sauvage et la souche *ΔpdtB ::pSW196pdtB* montrant que le phénotype est bien complété. La différence avec la condition non infectée est significative pour toutes les souches mais n'a pas été indiquée sur la figure pour plus de clarté.

Ces résultats montrent que la présence de PdtA sur la surface des bactéries accélère la cytotoxicité. Les bactéries ayant PdtA tuent plus rapidement, et plus de cellules que les bactéries mutantes. Cependant, PdtA n'est pas essentielle à la cytotoxicité puisque les souches mutantes parviennent tout de même à tuer les cellules. Ceci est en concordance avec ce qui avait été observé dans le modèle de *C. elegans* puisque la souche mutante tuait moins rapidement que la souche sauvage, mais était tout de même virulente.

IV.5 Analyse transcriptomique

Le RNAseq est une technique permettant de faire apparaître des signatures transcriptomiques et de comparer l'expression des gènes entre plusieurs conditions expérimentales. Grâce aux avancées technologiques et au développement des séquençages à haut débit (NGS pour Next-Generation Sequencing en anglais), il est possible de révéler le transcriptome en séquençant l'ADNc obtenu à partir de l'ARN messager extrait des bactéries (Pinto et al., 2011). Cette technique a été utilisée chez *P. aeruginosa* pour comparer les gènes exprimés sous différentes conditions, comme entre les bactéries planctoniques et les bactéries sous forme de biofilm par exemple (Dötsch et al., 2012). Cela peut également être utilisé afin de valider l'efficacité d'un modèle en comparant les différences entre des conditions *in vitro* ou *ex vivo* avec les conditions *in vivo* (Cornforth et al., 2020; Harrington et al., 2022).

Afin de mieux comprendre le rôle de l'auto-agrégation médiée par PdtA, nous avons réalisé un séquençage des ARN (RNAseq) exprimés par les bactéries agrégées et non agrégées, avec ou sans *pdtA*. Les bactéries ont été cultivées en milieu SCFM2 jusqu'à une DO₆₀₀ de 1, et les bactéries agrégées et planctoniques ont été séparées comme cela est décrit dans la partie Matériel et Méthodes, en triplicats biologiques. Mylène Robert-Genthon a ensuite extrait l'ARN des bactéries *PaG30* agrégées et non agrégées, ainsi que celui des bactéries planctoniques *PaG30ΔpdtA* et a procédé à la préparation des échantillons pour le

séquençage. La plateforme MGX (Montpellier GenomiX) a réalisé le séquençage et les gènes exprimés différemment entre deux conditions ont été identifiés (Matériel et Méthodes). Un volcano plot permet de visualiser ces gènes (**Figure 45**). Le gène *pdtA* étant absent dans la souche *PaG30ΔpdtA*, il est exprimé différemment entre les deux conditions mais a été retiré du volcano plot afin de mieux visualiser les autres cibles. Seul les gènes dont l'expression différentielle est d'un facteur supérieur à deux ($\log_2(\text{FC}) > 1$) sont considérés pour l'analyse. Le Fold Change (FC) décrit le ratio entre deux valeurs, et décrit donc à quel point une valeur est différente de la deuxième. Le **tableau 8** comporte la liste des gènes dont l'expression varie entre les bactéries sauvages agrégées et les bactéries mutantes non agrégées, ainsi que la valeur $\log_2(\text{FC})$ et que la probabilité (p-value) pour que cette différence soit due au hasard.

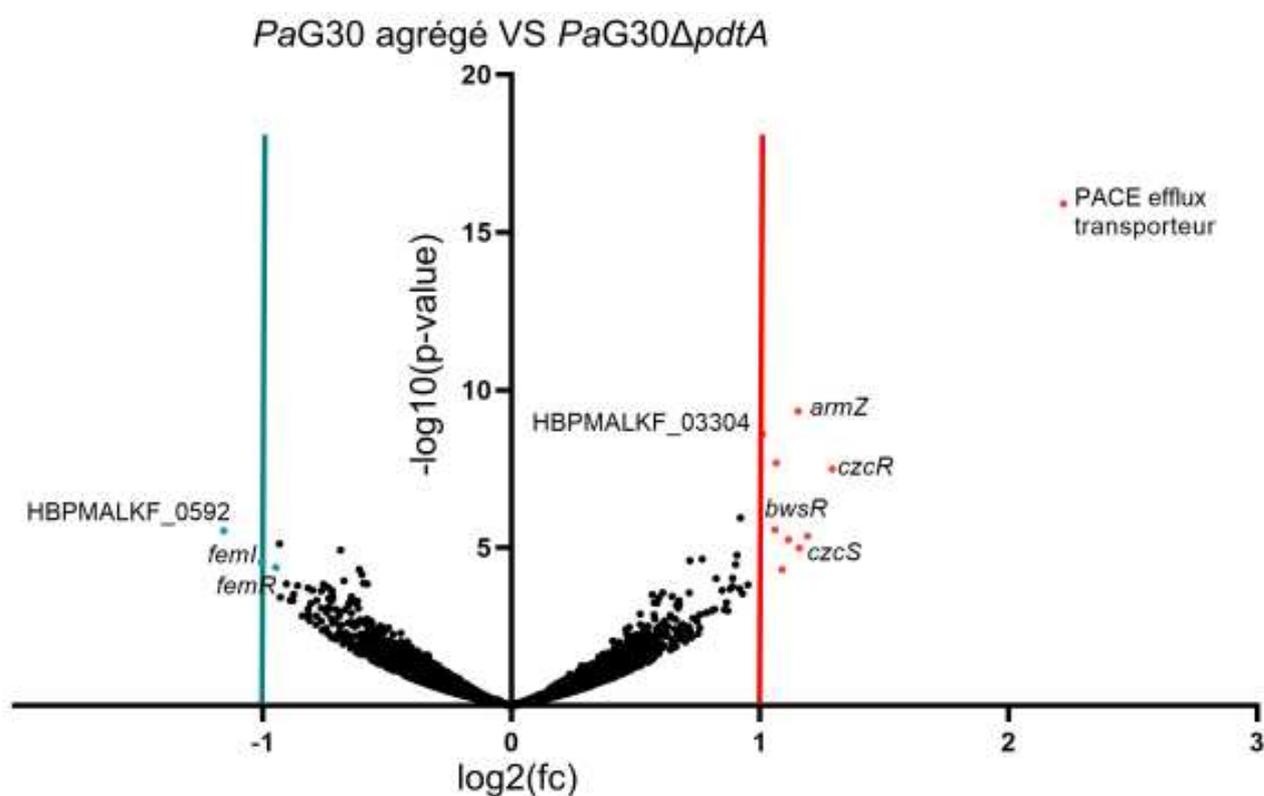


Figure 45. Expression différentielle des gènes des bactéries agrégées ou non agrégées. Les volcano plots ont été construits dans GraphPad à partir des données obtenues. Les gènes exprimés différemment de manière significative et avec un rapport différentiel d'au moins 2 sont indiqués, en rouge pour les gènes surexprimés, et en bleu pour les gènes sous-exprimés. Les données ont été obtenues à partir de triplicats biologiques pour chaque condition.

ID <i>PaG30</i>	ID PAO1	log ₂ (Fc)	P-value	Nom
HBPMALKF_03925	PA0690	4,98	2,18e-107	<i>pdtA</i>
HBPMALKF_02552	PA2757	2,22	1,24e-16	PACE efflux transporter
HBPMALKF_03305	PA5471	1,15	4,69e-10	<i>armZ</i>
HBPMALKF_03304	PA5470	1,06	2,04e-08	
HBPMALKF_03168	PA2523	1,29	3,12e-08	<i>czcR</i>
HBPMALKF_02523	PA2780	1,06	2,69e-06	<i>bswR</i>
HBPMALKF_03167	PA2524	1,16	1,2e-05	<i>czcS</i>
HBPMALKF_02772	PA3690	1,09	4,89e-05	Cadmium-transporting ATPase
HBPMALKF_05912	PA2411	-1,16	2,87e-06	
HBPMALKF_05203	PA1912	-1,01	2,90e-05	<i>femI</i>
HBPMALKF_05202	PA1911	-0,95	4,17e-05	<i>femR</i>

Tableau 8. Gènes exprimés différemment entre les bactéries *PaG30* agrégées VS *PaG30ΔpdtA*.

Tout d'abord, nous pouvons noter qu'il y a peu de gènes exprimés différemment en comparant les bactéries agrégées et les bactéries planctoniques n'exprimant pas *pdtA*, et que 7 gènes sont surexprimés dans les bactéries agrégées, tandis que 3 gènes sont sous-exprimés. Le gène le plus différemment surexprimé code pour une protéine homologue à un transporteur de la famille des pompes à efflux PACE. La souche de référence PAO1 possède deux gènes codant pour des transporteurs de la famille PACE également, et celui identifié dans *PaG30* est homologue à 99% à PA2757 et à 34% à PA2880. Cette protéine fait partie d'une famille de transporteurs qui est impliquée dans la résistance aux antiseptiques, comme le déqualinium (Hassan et al., 2015).

Nous pouvons noter que le transporteur de la famille PACE est surexprimé d'un facteur 2, dans la souche sauvage *PaG30* planctonique par rapport à la souche *ΔpdtA*. Il est encore plus surexprimé dans la souche sauvage agrégée, environ deux fois plus par rapport à la souche sauvage planctonique. Il est intéressant de noter que ce transporteur est déjà surexprimé dans les bactéries planctoniques synthétisant PdtA par rapport à celles qui n'ont pas PdtA, et qu'il est encore deux fois plus exprimé lorsque les bactéries s'agrègent par le biais de PdtA (les tableaux des gènes exprimés différemment entre les souches *PaG30* agrégées versus *PaG30* non agrégées et *PaG30* non agrégées versus *PaG30ΔpdtA* sont disponibles dans l'annexe 8).

En comparant les gènes exprimés dans la souche sauvage *PaG30* agrégée par rapport à la souche *PaG30 ΔpdtA* (**Tableau 8**), plusieurs systèmes ont pu être identifiés.

D'abord, le système CzcRS est surexprimé dans les bactéries agrégées par le biais de PdtA par rapport aux bactéries non agrégées n'exprimant pas PdtA. CzcR et CzcS forment un système à deux composants, responsable de la résistance aux métaux zinc, cadmium et cobalt. En effet, en présence de ces métaux, le système CzcR induit l'expression de la pompe à efflux CzcCBA qui expulse ces métaux, conférant une résistance à leur toxicité. Il a également été montré que le système co-régulait la résistance aux carbapénèmes, en réprimant l'expression de la porine OprD, qui permet à ces antibiotiques d'entrer dans la bactérie. Une étude a permis d'identifier d'autres facteurs régulés par le système CzcRS, et a montré que CzcR régule positivement le QS. Cela a pour conséquence de promouvoir la production de rhamnolipides, d'élastase et la formation de biofilm. De plus, dans un modèle de *C. elegans* il a été montré que CzcR est impliqué dans la virulence de *P. aeruginosa* (Dieppois et al., 2012).

En comparant les bactéries *PaG30* agrégées et planctoniques il y a peu de gènes exprimés différemment. On retrouve les gènes *czcR* et *czcS* mais avec un rapport différentiel très faible comparé à celui observé entre la souche agrégée et la souche planctonique mutante ($\log_2(FC)=0,59$ pour *czcR* et $0,46$ pour *czcS*) contre $1,29$ et $1,16$ respectivement (**Tableau 8**)

Une des cibles du système CzcSR, la protéine CzcC qui fait partie du système de pompe à efflux de métaux CzcABC, est également légèrement surexprimée chez les bactéries sauvages agrégées ($p\text{-value} = 0,025$, $\log_2(FC)=0,57$) par rapport aux bactéries ne synthétisant pas PdtA.

La protéine BswR a été précédemment identifiée chez *P. aeruginosa* comme régulateur de la motilité et de la formation de biofilm, en modulant la transcription de *rsmZ* (Wang et al., 2014). Cette protéine est surexprimée chez les bactéries agrégées par rapport aux bactéries mutantes planctoniques.

Le gène PA5470 appartient à un opéron où il est associé à *armZ*, qui régule positivement *mexXY*. Ce système permet, en présence d'antibiotiques de la classe des aminoglycosides, d'exprimer la pompe à efflux MexXY, responsable de la résistance aux aminoglycosides (Z. Fan et al., 2021). Les produits de PA5470 et *armZ*, exprimés dans les bactéries agrégées par rapport aux bactéries non agrégées, induisent la résistance aux aminoglycosides. Le gène *mexY* est légèrement surexprimé dans la souche sauvage agrégée ($p\text{-value} = 0,021$, $\log_2(FC)=0,55$).

Enfin, les gènes *femI* et *femR* faisant partie du système *fmeAIR* sont sous-exprimés dans les agrégats par rapport aux bactéries $\Delta pdtA$. FemI fait partie des facteurs sigma de fonction extra-cytoplasmique (ECF), comme Vrel. FemR est son anti-facteur sigma et FemA est le récepteur du système. L'anti-facteur sigma garde le facteur sigma inactif en l'absence de sidérophore, et permet l'absorption du sidérophore lorsqu'il est détecté dans l'environnement. Ces systèmes répondent à des signaux de l'environnement. FemA permet d'absorber la mycobactine, un sidérophore produit par *Mycobacterium* et permet d'utiliser ce sidérophore hétérologue (Llamas et al., 2007). Lorsqu'elles sont agrégées, les bactéries expriment moins ce système impliqué dans l'absorption du fer que lorsqu'elles sont planctoniques.

De manière générale, les bactéries agrégées surexpriment des gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques et dans la pathogénicité. Des gènes surexprimés dans les agrégats sont également impliqués dans la formation de biofilm, ce qui n'est pas surprenant au vu des similarités entre les agrégats et les biofilms. En effet, même si ce sont des phénotypes différents, les bactéries sous forme de biofilm et sous forme d'agrégats flottants ont de nombreuses propriétés en commun, comme la résistance aux antibiotiques.

En conclusion, PdtA pourrait permettre de former des agrégats plus résistants aux antibiotiques et possédant une pathogénicité accrue.

V. Etude préliminaire de la structure de PdtA

Afin de visualiser la protéine PdtA, nous avons scruté la surface des bactéries par microscopie électronique. Lors de ces expériences préliminaires, nous avons observé des structures en forme de L qui semblent correspondre à une large protéine ancrée dans la membrane externe de la bactérie (**Figure 46, A**). Un modèle structural de la protéine PdtA a été obtenu afin de le comparer à ces images (**Figure 46, B**). La protéine ne présentant aucune homologie avec une protéine de structure connue, la modélisation a été faite *ab initio* avec RoseTTAFold (Baek et al., 2021). Le modèle a été obtenu en combinant plusieurs tronçons chevauchants afin d'avoir un modèle de la protéine entière, trop grande pour être obtenue en une seule fois (limite de RoseTTAFold : 1200 résidus). Tous les tronçons ont été modélisés sous forme d'une hélice β , conformément à ce qui est attendu pour les protéines TpsA. Le modèle obtenu présente une forme globale peu réaliste, où les différents domaines se superposent, créant un encombrement stérique important. Ceci résulte au moins en partie d'un échantillonnage de conformations insuffisant dans le cadre d'une modélisation par collation de fragments : les conformations proposées par RoseTTAFold pour chaque tronçon ne sont pas toutes compatibles entre elles.

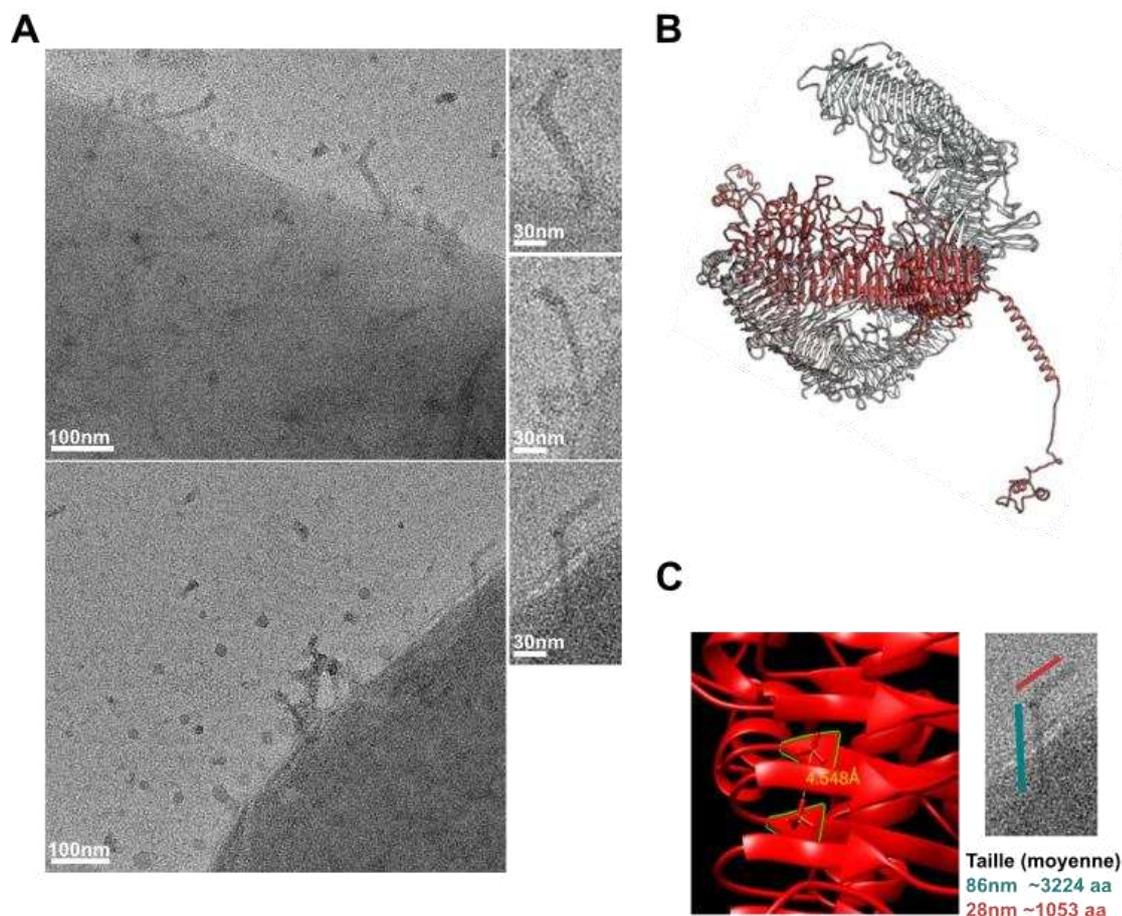


Figure 46. Visualisation par microscopie électronique et modélisation de PdtA.

A. Visualisation de la bactérie *PaG30* par microscopie électronique à transmission. Les bactéries ont été cultivées en milieu LB jusqu'à une DO_{600} de 0,8 puis fixées avec 0,5% de PFA. Les bactéries ont été déposées sur une grille de carbone et la grille a été colorée avec de l'acétate d'uranyle. Résultats préliminaires. **B.** Modèle de PdtA obtenu avec RoseTTAFold (Baek et al., 2021). **C.** Estimation de la longueur des deux parties de la protéine visualisée en microscopie électronique (à droite) et calcul du nombre d'acides aminés pouvant correspondre d'après les paramètres de l'hélice β modélisée (à gauche).

L'examen du modèle de PdtA montre deux parties : les résidus 148-2636 forment une arcade en N-ter (en blanc **Figure 46, B**) articulée avec un segment d'hélice C-ter (résidus 2748-4181 en rouge **Figure 46, B**). Le modèle obtenu suggère que l'extrémité C-ter, qui prolonge ce segment d'hélice, est un peptide de 95 résidus, à propension hélicoïdale et libre de ses mouvements. Le coude prédit est compatible avec la forme en L de la protéine imagée. Ensuite, en mesurant le pas de l'hélice en moyennant les mesures faites sur plusieurs tronçons et le nombre de résidus par tour, il est possible de convertir une longueur géométrique en nombre de résidus. A partir de mesures réalisées avec ImageJ (Schindelin et al., 2012), nous avons pu mesurer les tailles approximatives des deux parties de la protéine imagée par microscopie électronique, indiquées sur la **figure 46, C**. Grâce aux mesures faites sur le

modèle, nous avons pu déduire le nombre d'acides aminés correspondant aux deux parties de la protéine. La protéine imagée par microscopie électronique serait donc composée de 4 250 acides aminés environ. Cette structure en forme de L pourrait donc correspondre à la protéine PdtA, qui est composée de 4181 acides aminés. Ces résultats préliminaires doivent encore être confirmés, par exemple en réalisant un immunomarquage avec nos anticorps anti-PdtA et des anticorps secondaires couplés à des billes d'or.

VI. Présence d'anticorps anti-PdtA dans les sérums de patients

Cette dernière partie était l'objet du stage de Loréline Ménager, étudiante en master 1 à l'ENS de Paris-Saclay et que j'ai encadrée du 13 juin au 11 août 2022.

Une stratégie qui se développe actuellement pour combattre l'antibiorésistance est l'anti-virulence (Clatworthy et al., 2007; Dehbanipour and Ghalavand, 2022). Cette approche vise à cibler les facteurs de virulence de la bactérie et de les rendre inactifs, ce qui permet d'éviter les dommages causés par la bactérie sans la tuer. Contrairement aux antibiotiques, cette technique n'impose pas une pression sélective qui est la cause de la résistance croissante aux antibiotiques. Plusieurs agents sont étudiés afin de cibler les facteurs de virulence, dont des anticorps monoclonaux (Hebert et al., 2020; Yu et al., 2017).

Dans la littérature, des anticorps dirigés contre la protéine PdtA ont été détectés dans des sérums de patients infectés à *P. aeruginosa* (Llamas et al., 2009). Le gène *pdtA* étant présent dans de nombreuses souches de *P. aeruginosa* elle est une cible intéressante pour le développement d'une thérapie à base d'anticorps monoclonaux pouvant cibler la plupart des souches. L'équipe de Pascal Poignard (équipe CAID, IBS) utilise une technique permettant d'isoler des anticorps monoclonaux à partir des cellules des patients. En effet, il est possible grâce à un tri d'isoler des lymphocytes B mémoires à partir du sang des patients. Les anticorps monoclonaux produits par les lymphocytes B mémoires peuvent ensuite être criblés afin d'identifier ceux qui reconnaissent la cible désirée. Il est alors possible de produire les anticorps monoclonaux identifiés. Pour cela, la première étape est d'identifier des patients ayant des anticorps dirigés contre PdtA avant d'isoler leurs lymphocytes B mémoires. Nous avons donc dans un premier temps cherché des anticorps anti-PdtA parmi une collection de sérums de patients (**Tableau 13**, Matériel et Méthodes). Les patients sélectionnés pour cette étude sont des patients atteints de la mucoviscidose car ils sont souvent sujets à des infections chroniques à *P. aeruginosa*. Lors d'une infection chronique, les patients ont plus de probabilité de développer des anticorps car ils sont en contact plus longtemps avec l'agent pathogène. Au contraire, lors des infections aiguës, qui sont très virulentes, les patients sont rapidement traités pour éliminer au plus vite l'agent pathogène et les patients n'ont pas le temps de

développer des anticorps. Sur 17 sérums de patients atteints de la mucoviscidose testés, 12 comportaient des anticorps spécifiques dirigés contre PdtA (Llamas et al., 2009), démontrant que la protéine est produite lors des infections chroniques et qu'elle engendre une réponse immunitaire.

Nous avons dans un premier temps mis en place un ELISA permettant de détecter des anticorps anti-PdtA puis nous l'avons utilisé pour identifier des sérums de patients ayant développé des anticorps dirigés contre PdtA.

V.1 Mise en place d'un ELISA permettant la détection d'anticorps anti-PdtA

Nous avons d'abord cherché à identifier des patients ayant des anticorps anti-PdtA. Pour cela, nous avons d'abord mis en place un ELISA indirect permettant la détection d'anticorps anti-PdtA en utilisant les anticorps polyclonaux de lapin anti-PdtA (Biotem). Nous avons utilisé les domaines PdtA^{NTD} et PdtA^{CTD} solubilisés dans l'urée comme antigène, les anticorps polyclonaux de lapin anti-PdtA comme anticorps primaires et des anticorps anti-IgG de lapin couplés à la HRP comme anticorps secondaires. La protéine Pbp2 (Penicillin Binding Protein 2), une protéine périplasmique impliquée dans la synthèse du peptidoglycane, a été utilisée comme contrôle négatif (protéine purifiée donnée par le groupe Pathogénie Bactérienne de l'IBS). Plusieurs concentrations d'antigène, entre 10 µg/mL et 0,078 µg/mL, ont été testées afin de déterminer la concentration optimale pour la suite des expériences.

L'ELISA montre que l'on n'obtient aucun signal pour la protéine Pbp2. En revanche, les deux domaines protéiques de PdtA ont bien été reconnus par les anticorps anti-PdtA (**Figure 47**) jusqu'à une concentration de 2,5 µg/mL. L'ELISA montre également que le domaine PdtA^{NTD} est mieux détecté que le domaine PdtA^{CTD}. Deux des trois peptides utilisés pour l'immunisation proviennent du domaine PdtA^{NTD}, ce qui peut expliquer la présence de plus d'anticorps dirigés contre ce domaine que contre le domaine PdtA^{CTD}. Pour la suite des expériences, nous avons sélectionné la concentration la plus haute, tous les ELISA ont été réalisés avec 10 µg/mL de protéine.

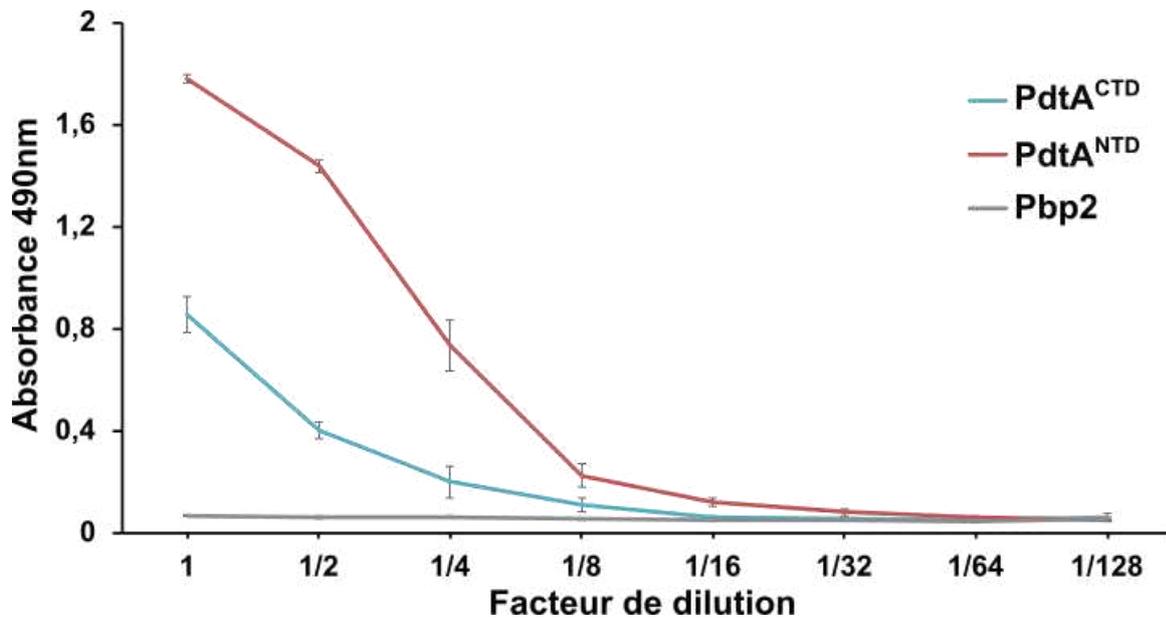


Figure 47. Mise en place d'un ELISA pour détecter des anticorps anti-PdtA.

Les protéines PdtA^{NTD}, PdtA^{CTD} et Pbp2 ont été déposées puis adsorbées sur une plaque 96 puits Maxisorp, à différentes concentrations. La concentration la plus élevée est de 10 µg/mL, correspondant au facteur de dilution de 1 puis les dilutions utilisées sont indiquées. Les anticorps polyclonaux de lapin anti-PdtA dilués au 4000^{ème} ont été utilisés comme anticorps primaires, et les anticorps anti-lapin couplés à la HRP comme anticorps secondaires dilués au 5000^{ème}. Une solution de TMB a été ajoutée afin de détecter la présence de la HRP et l'absorbance a été mesurée par un spectrophotomètre (SAFAS) à 490 nm. L'absorbance a été mesurée en triplicats techniques lors de chaque expérience. L'ELISA a été réalisé en duplicats biologiques.

V.2 Criblage de sérums de patients

Nous avons obtenu deux collections de sérums, tous issus de patients atteints de la mucoviscidose et ayant une infection chronique à *P. aeruginosa*. Les sérums de patients sont listés dans le **tableau 13** (Matériel et Méthodes). La première collection comporte également des sérums de patients ayant la mucoviscidose mais n'ayant pas d'infection à *P. aeruginosa*, qui ont été utilisés comme contrôle négatif. Un premier criblage a été réalisé en testant une seule concentration de sérum, dilué au 25^{ème} dans une solution de PBS/BSA 1%. La moyenne des valeurs d'absorbance à 490nm obtenues avec les sérums de patients non infectés a été calculée afin de servir de seuil de positivité du signal. La moyenne de l'absorbance mesurée pour les six sérums de patients non infectés est de 0,5, tous les sérums qui donnent une valeur supérieure à ce seuil sont considérés comme positifs.

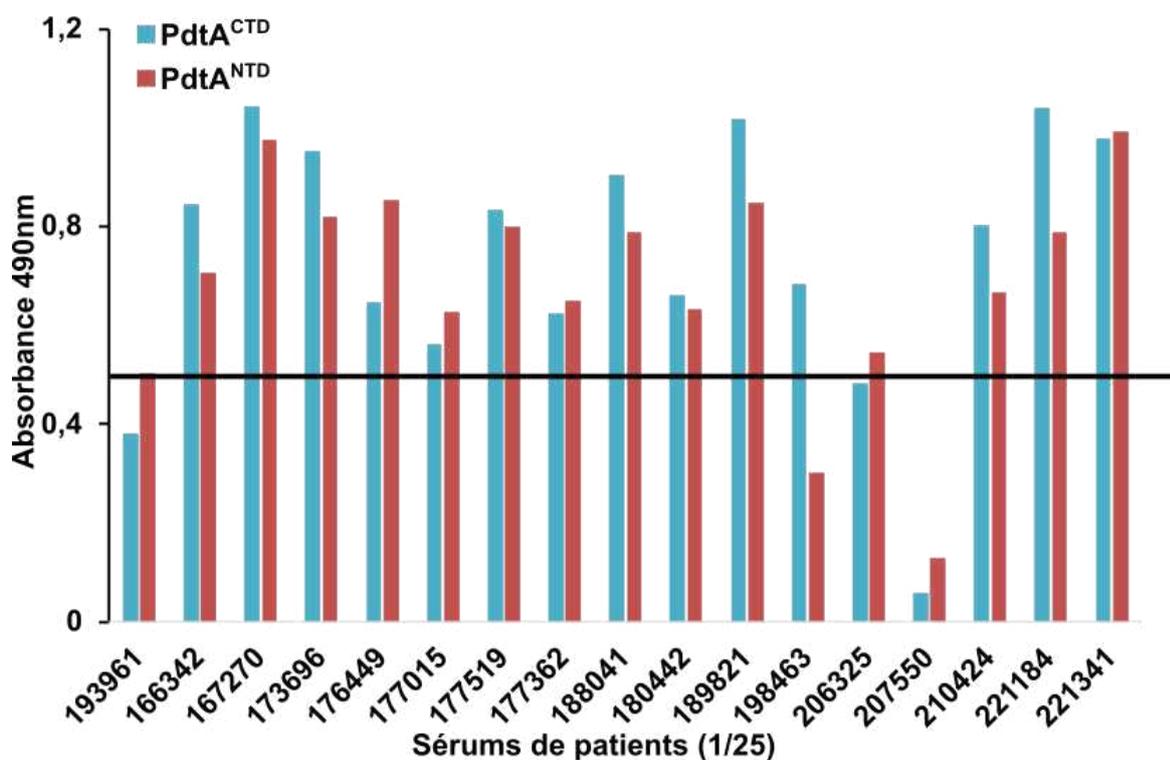
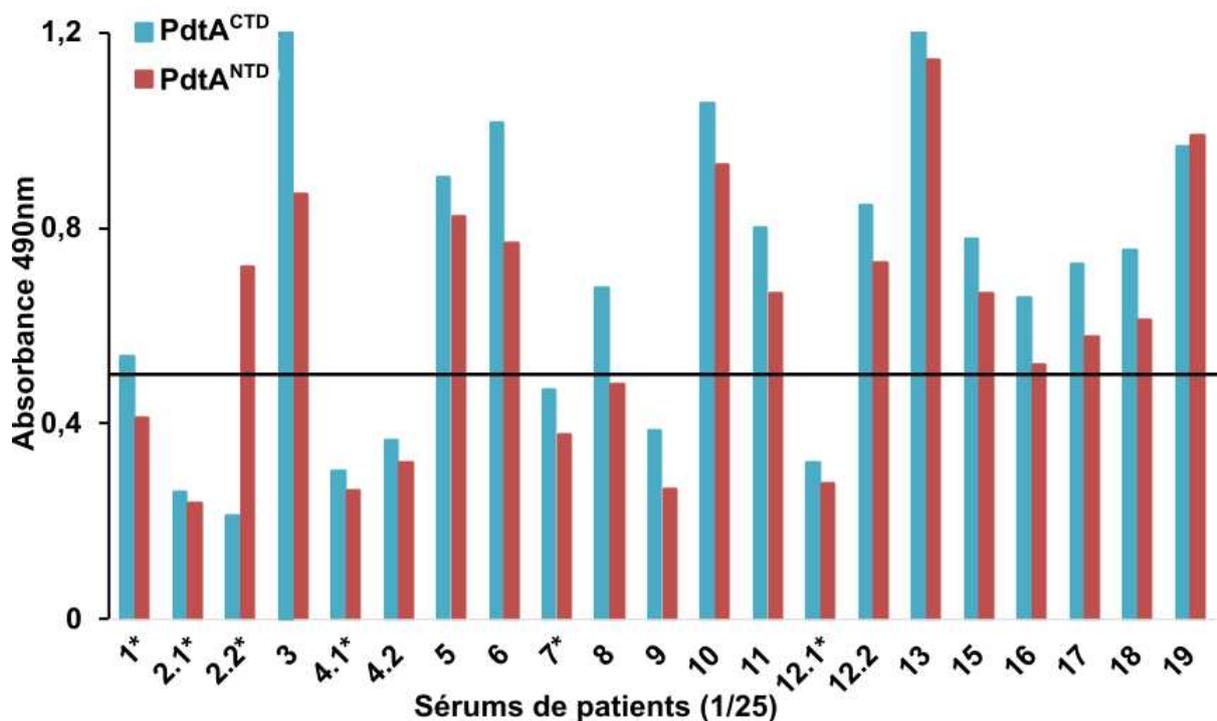


Figure 48. Criblage de sérums de patients.

Les patients indiqués avec un astérisque sont les patients non infectés par *P. aeruginosa*. Les antigènes PdtA^{NTD} et PdtA^{CTD} ont été déposés à 10µg/mL et adsorbés sur une plaque 96 puits (Nunc Maxisorp). Les sérums ont été dilués à 1/25^{ème} dans une solution de PBS/BSA 1% et utilisés comme anticorps primaires. Des anticorps anti-IgG humains couplés à la HRP ont été utilisés comme anticorps secondaires, et une solution de TMB a été ajoutée pour détecter la présence de HRP. L'absorbance à

490nm a été mesurée avec un spectrophotomètre (SAFAS). Les résultats montrés correspondent à la moyenne des absorbances mesurées lors de trois expériences indépendantes.

La plupart des sérums testés montrent une réponse contre les deux parties de la protéine PdtA (**Figure 48**), suggérant la présence d'anticorps. Dans l'ensemble, l'ELISA montre que PdtA^{CTD} est mieux reconnu que le domaine PdtA^{NTD}, au contraire ce qui a été obtenu avec les anticorps polyclonaux de lapin. *In vivo*, le domaine PdtA^{CTD} semble donc plus antigénique que PdtA^{NTD} chez l'homme. Cependant, l'ELISA a été réalisé sur des morceaux de PdtA, d'autres parties de la protéine sont peut-être plus antigéniques. On note aussi qu'il y a la même proportion de sérums de patients infectés à *P. aeruginosa* qui semblent avoir des anticorps anti-PdtA dans les deux collections, 87% et 82% respectivement, en considérant comme positif un signal supérieur à 0,5 d'absorbance à 490nm.

Nous pouvons noter sur la **figure 48** que le patient numéro 12, qui a été prélevé avant (sérum n°12.1) et après (sérum n°12.2) avoir contracté une infection à *P. aeruginosa*, a développé des anticorps anti-PdtA pendant l'infection. En effet, le signal du sérum 12.2 est environ 3 fois supérieur à celui obtenu avec le sérum 12.1. Le patient numéro 4 a également été prélevé avant et après une infection à *P. aeruginosa*, cependant il n'a pas développé d'anticorps pendant l'infection. Le deuxième prélèvement du patient n°12 a été fait 5 mois après la détection de l'infection à *P. aeruginosa* alors que celui du patient n°4 a été fait seulement 1 mois après la détection de l'infection, ce qui peut expliquer ces résultats. En effet l'infection est plus précoce et ce test permet de détecter uniquement les IgG qui se développent plus tardivement que les IgM, le patient n'a peut-être pas encore développé des IgG anti-PdtA.

Etant donné que les deux collections donnent la même proportion de sérums ayant des anticorps anti-PdtA, nous avons sélectionné uniquement la première collection de sérums de patients ayant la mucoviscidose pour la suite des expériences.

Afin de confirmer la présence d'anticorps anti-PdtA dans ces sérums de patients, un nouveau ELISA a été réalisé mais en faisant une dilution en série des sérums cette fois, afin de déterminer s'il y a un effet-dose. Seuls les sérums des patients ayant contracté une infection à *P. aeruginosa* ont été inclus, sauf le sérum 12.1 qui a été utilisé comme contrôle négatif.

Les sérums ont été testés en triplicats biologiques sur la protéine PdtA^{CTD} et sur le contrôle négatif Pbp2. Un test de Student a été réalisé pour comparer ces deux conditions. 11 sérums sur 14 testés reconnaissent significativement plus PdtA^{CTD} que le contrôle Pbp2 au moins à l'une des dilutions (**Figure 49**).

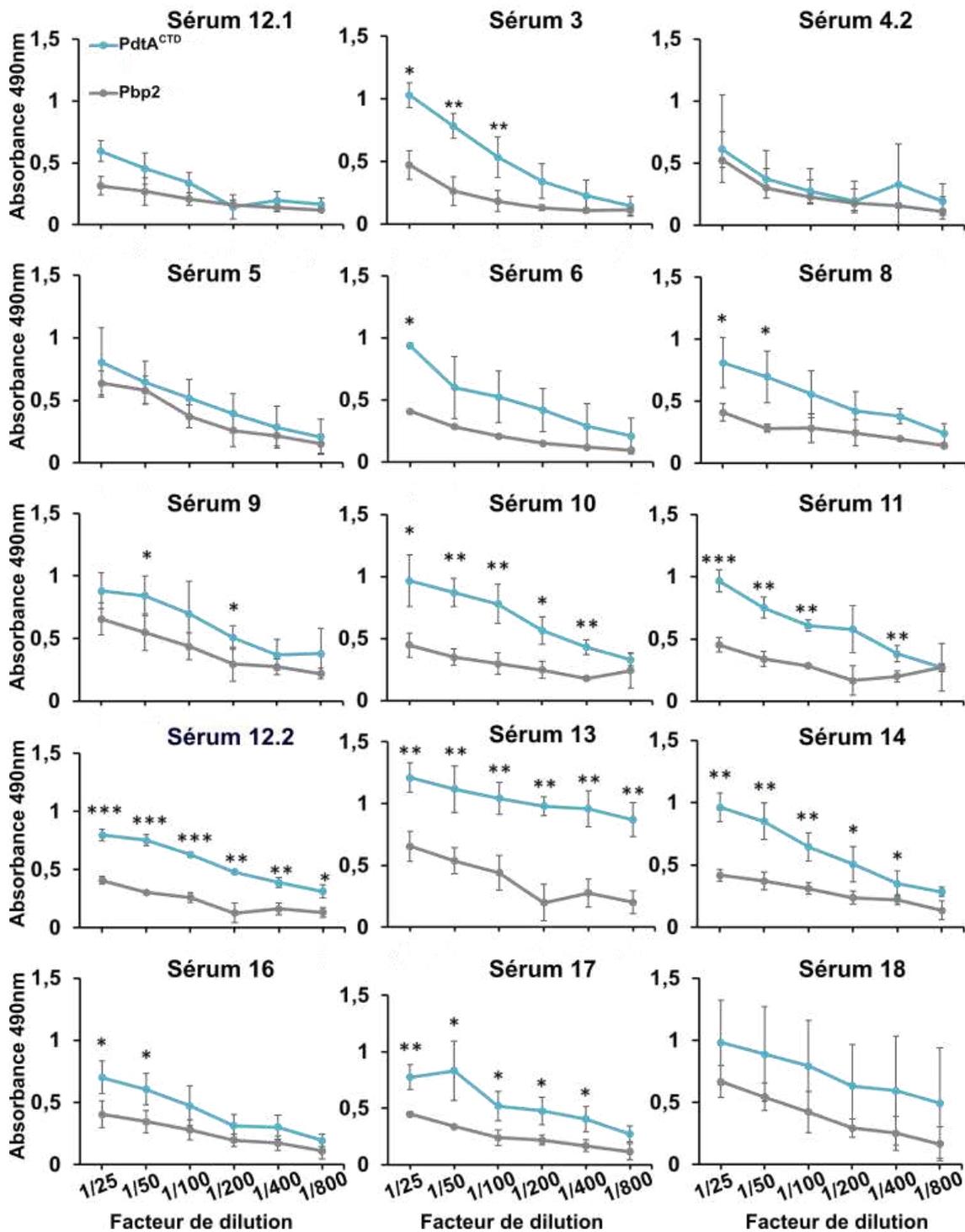


Figure 49. ELISA des sérums de patients infectés par *P. aeruginosa* contre PdtA^{CTD} et Pbp2. Le sérum 12.1 a été utilisé comme contrôle négatif. Une plaque 96 puits (Nunc, Maxisorp) a été recouverte de 10 µg/mL de protéine PdtA^{CTD} ou de Pbp2. Les sérums ont été dilués en série de 1/25^{ème} à 1/800^{ème} avec un facteur de dilution de 2, dans une solution de PBS/BSA 1%. Les absorbances ont été mesurées lors de trois expériences indépendantes. p<0,05 (*); p<0,01(**); p<0,001(***)

Nous observons un effet-dose pour les sérums 8, 10, 12.2 et 14. Dans certains sérums, comme le sérum 5 et 18, le signal de Pbp2 est plus élevé, il y a une faible reconnaissance du contrôle négatif. Comme Pbp2 est une protéine périplasmique, il est possible que certaines bactéries aient été lysées lors de l'infection et que la protéine Pbp2 ait été exposée, provoquant la production d'anticorps dirigés contre Pbp2. Cependant, il y a une différence significative entre Pbp2 et PdtA^{CTD} dans la plupart des cas, démontrant qu'il y a des anticorps spécifiques dirigés contre PdtA.

V.3 Immunofluorescence avec certains sérums sélectionnés

La plupart des sérums ont des anticorps qui reconnaissent les domaines protéiques de PdtA. Afin d'évaluer leur reconnaissance de la protéine *in situ*, 3 des sérums présentant les plus hauts signaux en ELISA ont été testés en immunofluorescence sur la souche PaG30 (les sérums 3, 11 et 13). Pour cela, les sérums ont dans un premier temps été déplétés sur la souche PaG30mutpdtA afin d'éliminer tous les autres anticorps qui pourraient reconnaître d'autres protéines de la souche PaG30 (Matériel et Méthodes). En effet, lors d'une infection chronique, les patients développent des anticorps contre plusieurs protéines de *P. aeruginosa*, ce qui peut masquer la réponse spécifique à PdtA.

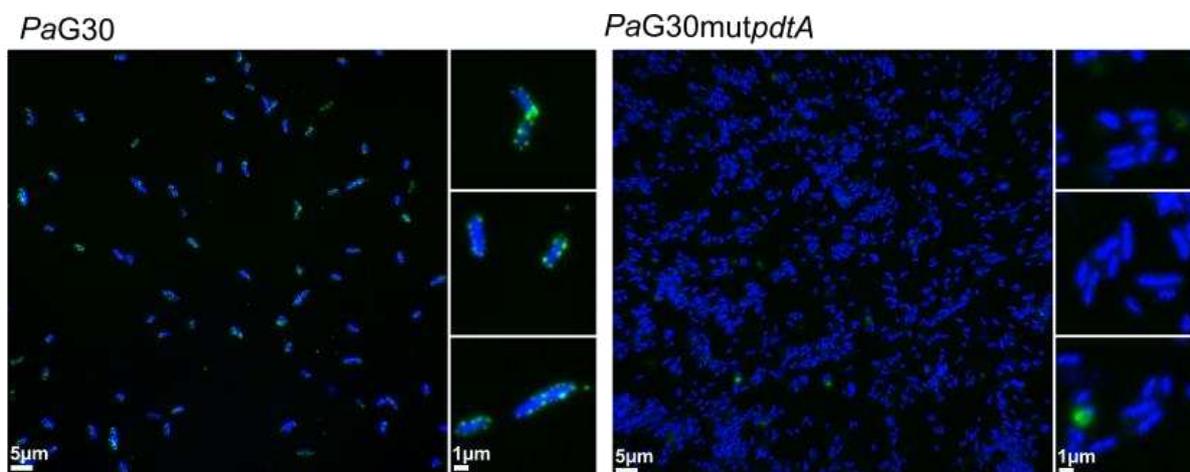


Figure 50. Immunofluorescence avec les anticorps anti-PdtA isolés dans le sérum 11.

Le sérum 11 a été déplété sur la souche PaG30mutpdtA et utilisé comme anticorps primaire pour réaliser une immunofluorescence sur la souche PaG30 et sur le contrôle négatif PaG30mutpdtA. L'ADN des bactéries a été marqué avec Hoechst Vital. Les images ont été prises avec le microscope Zeiss. L'expérience a été réalisée en duplicat biologique.

Sur les trois sérums testés, seul le sérum 11 déplété sur la souche PaG30 mutante reconnaît PdtA *in situ* à la surface des bactéries (**Figure 50**). En effet, le sérum déplété ne reconnaît aucune protéine à la surface de la souche mutante, démontrant que la déplétion a fonctionné

et que le signal observé est spécifique à PdtA. On observe un signal à la surface des bactéries, comme ce qu'on avait observé avec les anticorps polyclonaux de lapin. Les autres sérums testés avaient également un signal mais la déplétion n'était pas complète puisqu'il y avait également un signal sur le contrôle négatif. Au vu des ELISA, ces sérums avaient plus d'anticorps que le sérum 11 ce qui pourrait expliquer que la déplétion n'ait pas été pas suffisante.

VII. Conclusion

Dans cette partie, nous avons vu que PdtA était produite lors de la phase exponentielle dans plusieurs souches cliniques et qu'elle était exposée à la surface des bactéries. Les souches cliniques qui synthétisent PdtA ont des caractéristiques très différentes, montrant que PdtA est conservée à travers la diversité des souches de *P. aeruginosa*. Plusieurs techniques ont permis de mettre en évidence l'implication de PdtA dans l'auto-agrégation de *P. aeruginosa*. Nous n'avons pas vu d'effet de la présence de PdtA sur la formation de biofilm pelliculaire à l'interface air-liquide. Cependant, nous avons constaté un léger retard de la cytotoxicité des souches ne produisant PdtA par rapport à celles qui synthétisent la protéine. Nous avons détecté des anticorps anti-PdtA dans la majorité des sérums de patients testés. Une étude préliminaire a également permis de visualiser une protéine en forme de L à la surface des bactéries, pouvant correspondre à PdtA. Finalement, une analyse transcriptomique comparant les bactéries agrégées aux bactéries planctoniques a permis d'identifier plusieurs gènes exprimés différemment entre ces deux conditions.

Partie 2 : Etude de protéines ExlA-like chez différentes espèces de *Pseudomonas*

I. Introduction

La protéine ExlA est, comme PdtA, une protéine sécrétée par le système de sécrétion à deux partenaires chez *P. aeruginosa*. C'est un facteur de virulence majeur chez les souches qui possèdent les gènes *exlBA*. Il est important de mieux comprendre les différents facteurs de virulence de *P. aeruginosa* afin de mieux pouvoir combattre ses infections.

Le laboratoire a étudié et décrypté le mécanisme d'action d'ExlA chez *P. aeruginosa*. C'est une toxine qui forme un pore dans la membrane de la cellule hôte. Ce pore entraîne un afflux de calcium. La concentration de calcium augmente, ce signal est perçu par la cellule et active la protéase ADAM10. C'est une métallo-protéase transmembranaire qui permet le relargage de différentes protéines à la surface de la cellule. C'est le cas de la E-cadhérine, protéine responsable de la jonction cellule-cellule. ADAM10 clive la E-cadhérine, ce qui provoque le relargage de la partie extracellulaire et une portion de 30kDa reste dans la cellule (**Figure 51**). De plus, le clivage de la cadhérine entraîne la perte des jonctions adhérentes, les cellules se détachent les unes des autres et s'arrondissent.

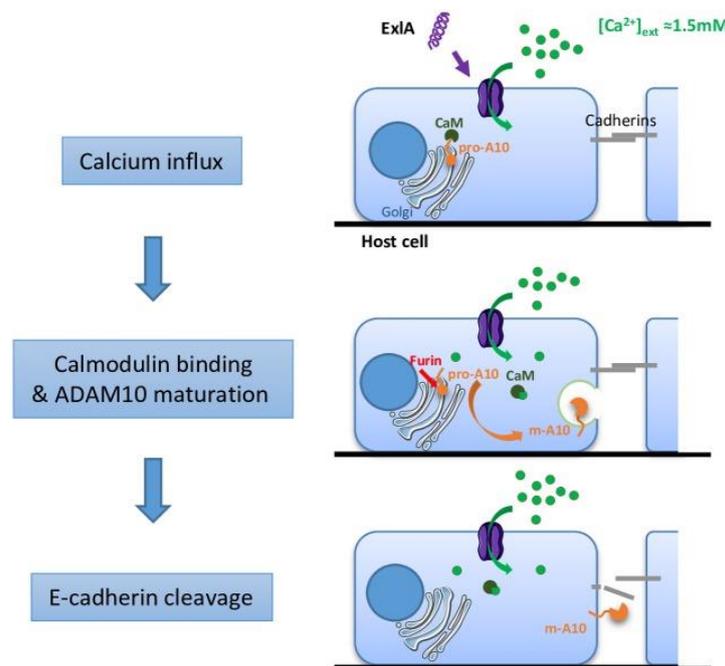


Figure 51. Mécanisme d'action de la protéine ExlA.

(Reboud et al., 2017)

La fonctionnalité et le mode d'action d'ExlA chez *P. aeruginosa* ont été largement étudiés mais des protéines homologues existent chez d'autres espèces de *Pseudomonas*

environnementales. Ce travail s'est concentré sur la caractérisation des protéines ExlA-like chez *Pseudomonas entomophila*, *Pseudomonas chlororaphis* et *Pseudomonas putida*. *P. putida* est une bactérie environnementale utilisée dans l'agriculture pour ses propriétés de bioremédiation et car elle favorise la croissance des plantes (Wu et al., 2011). *P. entomophila*, proche de *P. putida*, est le pathogène naturel de la drosophile et est utilisé comme modèle d'infection (Vodovar et al., 2006, 2005) *P. chlororaphis* peut également être utilisée comme agent de bio-contrôle, étant donné que plusieurs souches ont des propriétés d'insecticides contre les parasites et sont capables d'éliminer le champignon pathogène *Sclerotinia sclerotiorum* responsable de la maladie de la moisissure blanche qui atteint de nombreuses plantes (Arrebola et al., 2019; Manuel et al., 2012).

Plusieurs indices semblent indiquer que l'opéron *exlBA* a été transféré entre ces espèces par transfert horizontal de gène au cours de l'évolution (Trouillon et al., 2020) et nous pouvons nous demander si ces protéines ont évolué différemment au sein de chaque espèce puisque celles-ci n'appartiennent pas aux mêmes niches environnementales. De plus, en comparant les séquences en acides aminés de ces différentes protéines ExlA-like, deux groupes se distinguent et nous nous sommes demandé si ces protéines avaient la même activité envers leur hôte. En effet, ExlA-like de *P. chlororaphis* et ExlA de *P. aeruginosa* font la même taille et sont très similaires mais ExlA-like de *P. entomophila* et de *P. putida* ont une partie C-terminale plus courte que les autres. Le domaine TPS de ces quatre protéines est identique à 82%, cependant la partie C-terminale est très divergente et est conservée à seulement 9%. La fonction de la protéine ExlA étant due principalement au domaine C-terminal (Bertrand et al., 2020), notre hypothèse était que les protéines ExlA-like de *P. entomophila* et de *P. putida* ont une activité différente de celle de *P. chlororaphis* et de la protéine ExlA de *P. aeruginosa*.

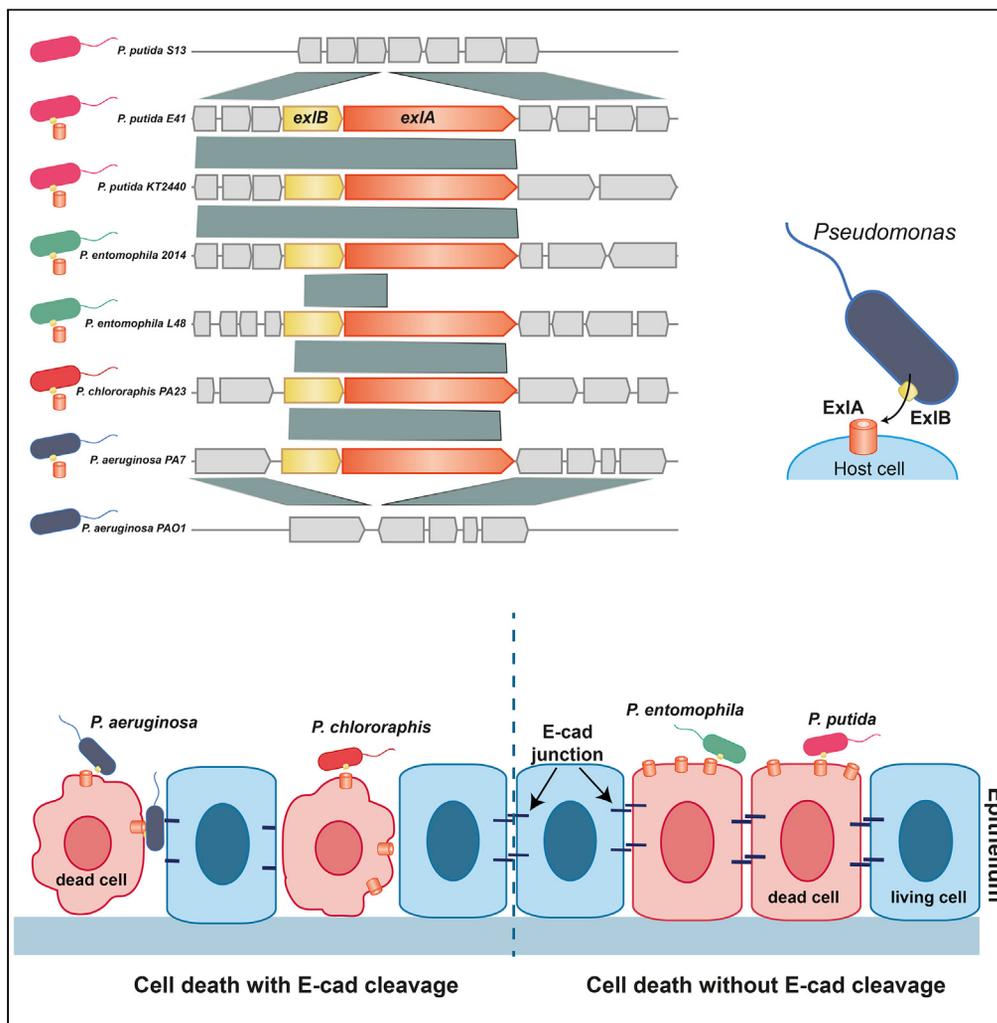
Pour tester notre hypothèse, nous avons contrôlé la sécrétion de ces différentes protéines par western blot et étudié le phénotype sur les cellules eucaryotes par différents tests. Nous avons également créé des protéines chimériques avec les parties C-terminales interchangeées pour étudier l'implication de cette partie sur la fonction des différentes protéines.

II. Publication

J'ai participé à ce projet lors de ma première année de thèse. J'ai construit les protéines chimériques et produit l'ensemble des résultats concernant ces protéines. J'ai également contribué aux expériences de cytotoxicité, j'ai réalisé les expériences sur les différentes souches cliniques de *P. putida*. J'ai également réalisé les infections par injection sur les drosophiles.

Article

Genomic erosion and horizontal gene transfer shape functional differences of the ExlA toxin in *Pseudomonas* spp.



Viviana Job, Laura Gomez-Valero, Adèle Renier, ..., Yann Couté, Carmen Buchrieser, Ina Attrée

cbuch@pasteur.fr (C.B.)
ina.attrée@ibs.fr (I.A.)

Highlights

ExlA is a two-partner secreted toxin conserved across *Pseudomonas* spp.

Environmental *Pseudomonas* strains encode ExlA with different cytotoxic activities

ExlA of environmental *Pseudomonas* strains play a role in bacteria-insect interactions

ExlBA operon shows a complex evolutionary history of horizontal gene transfer

Job et al., iScience 25, 104596
July 15, 2022 © 2022 The Authors.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104596>



Article

Genomic erosion and horizontal gene transfer shape functional differences of the ExlA toxin in *Pseudomonas* spp.

Viviana Job,¹ Laura Gomez-Valero,² Adèle Renier,¹ Christophe Rusniok,² Stephanie Bouillot,¹ Viviane Chenal-Francisque,² Erwan Gueguen,³ Annie Adrait,⁴ Mylène Robert-Genthon,¹ Katy Jeannot,⁶ Peter Panchev,¹ Sylvie Elsen,¹ Marie-Odile Fauvarque,⁴ Yohann Couté,^{4,5} Carmen Buchrieser,^{2,*} and Ina Attrée^{1,7,*}

SUMMARY

Two-partner secretion (TPS) is widespread in the bacterial world. The pore-forming TPS toxin ExlA of *Pseudomonas aeruginosa* is conserved in pathogenic and environmental *Pseudomonas*. While *P. chlororaphis* and *P. entomophila* displayed ExlA-dependent killing, *P. putida* did not cause damage to eukaryotic cells. ExlA proteins interacted with epithelial cell membranes; however, only ExlA^{Pch} induced the cleavage of the adhesive molecule E-cadherin. ExlA proteins participated in insecticidal activity toward the larvae of *Galleria mellonella* and the fly *Drosophila melanogaster*. Evolutionary analyses demonstrated that the differences in the C-terminal domains are partly due to horizontal movements of the operon within the genus *Pseudomonas*. Reconstruction of the evolutionary history revealed the complex horizontal acquisitions. Together, our results provide evidence that conserved TPS toxins in environmental *Pseudomonas* play a role in bacteria-insect interactions and discrete differences in CTDs may determine their specificity and mode of action toward eukaryotic cells.

INTRODUCTION

Bacterial evolution is largely driven by horizontal gene transfer (HGT) between populations thriving in the same habitats (Gomez-Valero and Buchrieser, 2019; Koonin, 2016). Bacteria from the genus *Pseudomonas* are ubiquitous on earth because of their extraordinary capacities to adapt to diverse niches. *Pseudomonas* species are associated with plants and animals and are frequently found in the proximity of human activities (Silby et al., 2011). *Pseudomonas aeruginosa* is a human opportunistic pathogen that causes high-cost health problems notably due to the increasing number of multi-drug resistant strains. The World Health Organization [WHO] classified carbapenem-resistant *P. aeruginosa* in the high-priority category of bacterial pathogens for which there is an urgent need to define new antimicrobials (Organization, 2019). In addition to a panoply of surface-attached and exported virulence factors, some clinical *P. aeruginosa* strains use a pore-forming toxin Exolysin (ExlA^{Fa}) for efficient host cell destruction and infectivity (Elsen et al., 2014; Reboud et al., 2016). ExlA-positive *P. aeruginosa* represents around 2% of the strains present in clinical cohorts and is more frequent in aquatic environments (Reboud et al., 2016; Wiehlmann et al., 2015). Examination of the genetic environment of exlA homologs identified in different *Pseudomonas* species and their species-specific regulation led to a speculation that the operon has been acquired through HGT (Trouillon et al., 2020).

ExlA is exported by a cognate outer-membrane transporter, ExlB (Basso et al., 2017), and the two proteins belong to a two-partner secretion (TPS) system, also known as a type 5b secretion system (T5bSS) (Guerin et al., 2017; Nash and Cotter, 2019a, 2019b). ExlA shares the common TpsA domain architecture (Guerin et al., 2017), comprising Sec and TPS signals at the N-terminal part of the protein, central repeated filamentous hemagglutinin domains (FHA), and a C-terminal domain (CTD) that carries the activity. ExlB contains the conserved “loop 6” of the Omp85 family defined by the conserved arginine and aspartate of the (V/I) RG(Y/F) and (G/F)xDxG motifs of the FhaC family of TpsB proteins (Yeo et al., 2007; Maier et al., 2015). Based on the molecular studies of model systems, TpsA and TpsB proteins are first translocated across the cytoplasmic membrane to the periplasm by the Sec secretion system.

¹Université Grenoble Alpes, Institute of Structural Biology, Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses Team, UMR5075 CNRS, IRIG, CEA, Grenoble, France

²Institut Pasteur, Université de Paris, CNRS UMR 6047, Unité Biologie des Bactéries Intracellulaires, 75015 Paris, France

³University of Lyon, Université Lyon 1, INSA de Lyon, CNRS UMR 5240 Microbiologie Adaptation et Pathogénie, Lyon, France

⁴Université Grenoble Alpes, INSERM, CEA, UMR BioSanté U1292, Grenoble, France

⁵CNRS, CEA, FR2048, Grenoble, France

⁶Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques, Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire Jean Minjoz, UMR6249 CNRS, Université de Bourgogne-Franche Comté, Besançon, France

⁷Lead contact

*Correspondence: cbuch@pasteur.fr (C.B.), ina.attree@ibs.fr (I.A.)

<https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104596>



There, TpsB is inserted into the outer membrane and forms a β -barrel that has channel activity. TpsA remains in an extended conformation in the periplasm and interacts with periplasmic chaperones (Baud et al., 2009; Johnson et al., 2021) and with the two periplasmic POTRA domains of its TpsB partner (Delattre et al., 2011; ur Rahman et al., 2014), which opens the pore and starts the translocation of TpsA across the outer membrane. Once it reaches the cell surface, TpsA starts to fold into a β -helix and the TPS domain is thought to initiate the folding (Jacob-Dubuisson et al., 2004; Nash and Cotter, 2019a, 2019b). TpsA proteins have different activities and are classified in families of adhesins, proteases, contact-dependent growth inhibition proteins (Cdi), and cytolysins/hemolysins. ExlA belongs to the cytolysin/hemolysin family, with ShlA of *Serratia marcescens*, HmpA of *Proteus mirabilis*, EthA of *Edwardsiella tarda*, or HhdA of *Haemophilus ducreyi* as representatives (Guerin et al., 2017; Jacob-Dubuisson et al., 2013).

The three-dimensional structures of the TPS and FHA domains have been reported for several TpsA proteins of different classes (Clantin et al., 2004; Guerin et al., 2017; Weaver et al., 2009; Yeo et al., 2007; Zambolin et al., 2016). The *P. aeruginosa* ExlA (ExlA^{Pa}) CTD folds in a so-called molten globule without any recognized structural features. The “molten globule” fold was proposed to facilitate the incorporation of the protein in the host lipid bilayer where it forms a pore of defined size (Bertrand et al., 2020; Faudry et al., 2007). The consequences of the pore formation are immediate influx of Ca²⁺ ions within the host cytoplasm and the activation of the host metalloprotease ADAM10, which in turn cleaves the main cell-cell junction protein E-cadherin (Maretzky et al., 2005). *In vivo*, the ExlA-dependent cleavage of E-cadherin results in bacterial dissemination and hemorrhagic pneumonia (Bouillot et al., 2020; Elsen et al., 2014). The presence of *exlBA*-like operons in *Pseudomonas* species other than *P. aeruginosa* that are non-pathogenic for humans suggested that this TPS may play a role in the infection of other organisms, prokaryotes or eukaryotes, as it was recently suggested for *Pseudomonas protegens* (Vesga et al., 2020).

Here, we examined 191 ExlA sequences retrieved from publicly available databases. The overall amino acid sequence identity of proteins was distributed unevenly throughout the protein sequences. Furthermore, the subclass of ExlA proteins present in the natural fly pathogen *P. entomophila* (ExlA^{Pe}) and other soil-dwelling *Pseudomonas* exhibited CTDs that were shorter and differed in sequence compared to the ExlA^P class. The analyses of the expression and functionality of ExlA homologs in strains of *P. chlororaphis* (ExlA^{Pc}), *P. putida* (ExlA^{Pp}), and *P. entomophila* (ExlA^{Pe}) and their comparison with the well-characterized *P. aeruginosa* ExlA identified similarities and differences between their structures and activities *in vitro* toward the eukaryotic cells and *in vivo* in infection of their specific hosts. Comparative genomics and phylogenetic analyses allowed to gain insight in the origin and evolution of these genes in the different *Pseudomonas* species.

RESULTS

TPS exolysins display divergent CTDs across *Pseudomonas* species

Our previous study analyzing the promotor sequences and regulation of the *exlBA* operon identified *exlBA* sequences in 466 *Pseudomonas* strains among the over 4,800 *Pseudomonas* strains present in the *Pseudomonas* database (Trouillon et al., 2020). This intriguing finding led us to investigate here the sequences and the function of the corresponding proteins in selected, commonly used strains of the species *P. entomophila*, *P. putida*, and *P. chlororaphis* that can be genetically manipulated. Interestingly, although the sequence of the overall ExlA protein is conserved in all species, it differs among domains. The TPS domain is 82% conserved, whereas the FHA domains are only 34% conserved and exhibit two different regions in which indels are present. The highest divergence is present in the CTDs as they are only 9% conserved (Figure 1A). Importantly, the ExlA^{Pp}-CTD lacks 118 residues compared to the CTDs from its homologs in *P. aeruginosa* and *P. chlororaphis* (Figures 1B and S1), due to a fragment missing inside the CTD of *P. putida* strains. Similarly, a deletion is present in strains of the species *Pseudomonas parafulva* and *Pseudomonas rhizosphaerae* (Figure S2). In *P. entomophila* strains, the ExlA^{Pe}-CTD is even shorter as it comprises only 121 or 168 residues in strains L48 and 2014/1257, respectively, compared to 287 amino acids for the CTDs in *P. aeruginosa* and *P. chlororaphis* PA23. Despite the difference in sequence conservation, the global conservation of the exporters TpsB/ExlB (between 42 and 69% identity) in the four species studied within this work is considerably higher than that of the exported protein TpsA/ExlA (Figure 1C and Table S4), suggesting that, while the TPS export is conserved, the substrates may have evolved to perform different activities.

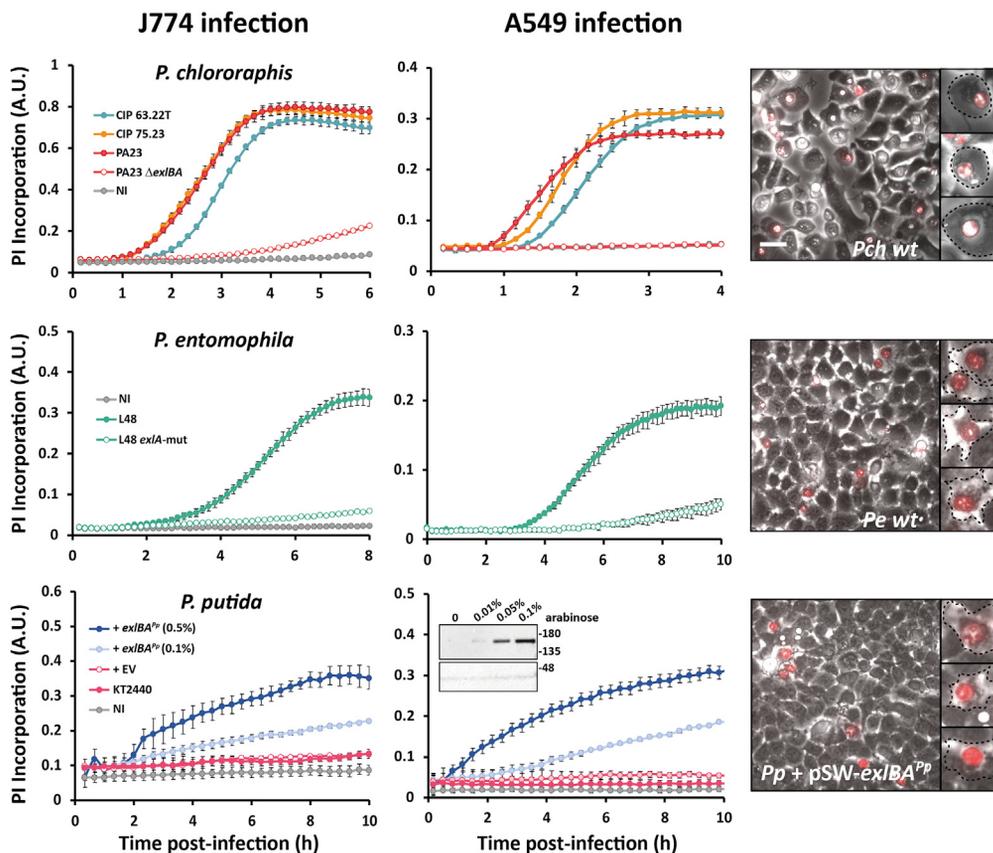


Figure 2. Cytotoxicity of various *Pseudomonas* strains on eukaryotic cells is ExlA-dependent

Cytotoxicity profiles on epithelial A549 cells and J774 macrophages of *P. chlororaphis* PA23, *P. entomophila* L48, and *P. putida* KT2440 overexpressing *exlBA* in trans in pSW vector. Murine macrophages (J774, left panel) and epithelial cells (A549, middle and right panels) were infected at an MOI of 10 at 30°C with different strains, as indicated. Cell death was monitored by PI incorporation. Fluorescence emission at 590 nm, expressed as arbitrary units (A.U.), was recorded over indicated time post-infection (h). Immunoblot of secreted ExlA^{Pp} induced with different concentrations of arabinose and detected by anti-ExlA^{Pa} antibodies are shown in the inner panel with loading controls (an unspecific western blot signal for *P. putida* KT2440). Microscopy images (right panel) were taken after 2 h of infections with *P. chlororaphis* PA23 (*Pch wt*) or 4 h of infection with *P. entomophila* L48 (*Pe wt*) and *P. putida* KT2440 expressing *exlBA* in trans (*Pp* + pSW-*exlBA*^{Pp}) in presence of 0.1% arabinose. One representative superposed image of transmission and PI-fluorescence is shown for each bacterium, with zoom on several selected cells showing incorporation of PI. To note, the A549 cells infected by *P. chlororaphis* lost cell-cell contacts. On the other hand, the A549 cells infected by *P. entomophila* and *P. putida* + *exlA*^{Pp} kept their initial shape while having incorporated the PI within the nuclei. Scale bar represents 50 μm. Each experiment was repeated at least three times. The representative graphs are issued from four technical replicates; means are calculated and presented with corresponding standard deviation. See also [Figures S3–S5](#), [Table S2](#) and [Table S3](#).

proteomics, showed that *P. chlororaphis* CIP63 and *P. chlororaphis* CIP75, like the reference strain *P. chlororaphis* PA23, secrete the ExlA homologs in culture supernatants ([Figure S3A](#) and [Table S2](#)). Of note, *P. chlororaphis* CIP63 secreted less ExlA, which correlated with a slightly lower cytotoxicity ([Figure 2](#)).

P. entomophila L48 is widely studied in the context of host-pathogen interactions using *Drosophila* flies ([Liehl et al., 2006](#); [Vodovar et al., 2005, 2006](#)). It secretes three main virulence factors regulated by the global GacS/GacA two-component regulatory system: the pore-forming toxin Monalysin, the protease AprA, and the hemolytic Entolysin A, all contributing to the bacterial invasion and/or killing of the host ([Opota et al., 2011](#); [Vallet-Gely et al., 2010b](#); [Vodovar et al., 2005](#)). To study the role of ExlA in eukaryotic cell lysis without interference of Monalysin, the principal virulence factor, we inactivated *P. entomophila exlA* in a Δmnl and $\Delta gacA$ background ([Opota et al., 2011](#)). As for *P. chlororaphis*, the secretome produced by these different *P. entomophila* mutant strains was characterized by MS-based quantitative proteomics, and the relative abundances of secreted proteins in each strain and between strains were compared ([Figure S3B](#) and

Table S3). These results confirmed that ExIA^{Pe} and Monalysin were both synthesized and secreted independently and that GacA had no influence on ExIA^{Pe} abundance as judged from the secretome. The kinetics of cytotoxicity on epithelial cells and macrophages of *P. entomophila* strains were delayed compared to that observed with *P. chlororaphis* or *P. aeruginosa* strains. However, in all three genetic backgrounds (wild-type, Δmnl , $\Delta gacA$), deficiency of ExIA abolished the capacity of the strains to induce necrosis of the eukaryotic cell (**Figures 2** and **S4**).

We then tested a collection of strains belonging to the *P. putida* complex (**Key resources table** and **Figure S4**), including the reference strain KT2440 which harbors the *exlBA* operon. None of the strains, including KT2440, was cytotoxic, except one that was identified as *P. mosselii* (185886). To be able to study the activity of the ExIA homolog in *P. putida* KT2440, we expressed the *exlBA* operon (*PP_1449-PP_1450*) from the arabinose-inducible promoter. Upon induction by arabinose, ExIA^{Pp} was readily detected in bacterial culture supernatants using antibodies raised against ExIA^{Pa} (**Figure 2** inset), and the cytotoxicity toward macrophages and epithelial cells increased with higher arabinose concentrations (**Figure 2**).

Microscopy analyses revealed different morphological changes on A549 cells during the infection with these four species. Although *P. aeruginosa*- and *P. chlororaphis*-infected cells that were PI positive detached from each other and rounded up, the cell layer infected by *P. entomophila* or *P. putida* looked intact and kept the cell-cell contact, despite the presence of PI-positive cells (**Figures 2** and **S5**). Together, these results revealed that all four ExIA proteins cause permeability of eukaryotic cell membranes, but the mechanism leading to cell death seems different for *P. entomophila* and *P. putida* compared to *P. aeruginosa* and *P. chlororaphis*.

ExIA proteins display different activities toward membranes and E-cadherin

As ExIA^{Pa} is a membrane pore-forming toxin that binds to liposomes and host membranes (**Basso et al., 2017; Bertrand et al., 2020**), we tested whether the ExIA homologs can also be detected within infected cell membranes. In particular, we analyzed the detergent-resistant membrane (DRM) fractions called lipid rafts, enriched in cholesterol and sphingolipids, which are involved in protein sorting, signaling, and trafficking (**Simons and Vintiner, 2011; Simons and Gerl, 2010**). Membranes of infected human epithelial cells were separated using a sucrose density gradient centrifugation and the fractions were tested for the presence of ExIA proteins by immunoblotting. ExIA^{Pch} and ExIA^{Pa} were recovered only in the DRM fractions containing the lipid raft marker flotillin-2 (**Figure 3A**), demonstrating interactions and affinities toward host lipids similar to *P. aeruginosa*. In contrast, ExIA^{Pp} seems to be able to bind both DRM and detergent-soluble membranes (DSM) with a preference for DSM. Surprisingly, ExIA^{Pe} did not co-fractionate with DRM but was recovered in fractions containing DSM and cytoplasmic content (**Figure 3A**). To further investigate the localization of ExIA^{Pe} during infection, we labeled host surface proteins with biotin and purified the labeled proteins using NeutrAvidin Agarose beads. This strategy allowed us to show that ExIA^{Pe} co-eluted with the marker of membrane fractions, indicating that all four ExIA proteins are associated with eukaryotic membranes (**Figures 3B** and **S6**).

The cleavage of the cell-cell junction protein E-cadherin is a hallmark of cellular perturbations caused by the ExIA^{Pa} toxin upon activation of the host protease ADAM10 by Ca²⁺ influx (**Reboud et al., 2017**). ExIA^{Pch} also induced the cleavage of E-cadherin, producing a soluble C-terminal fragment of 30 kDa (**Figures 3A** and **S6**). Interestingly, neither ExIA^{Pp} nor ExIA^{Pe} induced E-cadherin cleavage. The fact that E-cadherin stays intact upon infection by *P. entomophila* L48 or *P. putida* KT2440 is in agreement with the observation that despite the detection of PI within the cell nuclei there is a conservation of A549 cell-cell adhesion contacts (**Figure 2**).

Therefore, ExIA^{Pe} has the capacity to associate with epithelial membranes, but its membrane anchor/interaction seems to be different compared to the three other *Pseudomonas* ExIA proteins that bind the lipid rafts. As neither *P. entomophila* L48 nor *P. putida* KT2440 expressing ExIA^{Pp} induce the E-cadherin cleavage, we concluded that lipid raft association and E-cadherin cleavage are independent events.

Contribution of CTDs to toxin activity

In different classes of TpsA proteins and in many polymorphic toxins (**Zhang et al., 2012**), the functional domain is located at the C-terminal part of the protein. Indeed, the ExIA^{Pa} CTD harbors the pore-forming activity (**Basso et al., 2017**). Considering the divergent sequences of the CTDs of ExIA^{Pa}/ExIA^{Pch}, ExIA^{Pp},

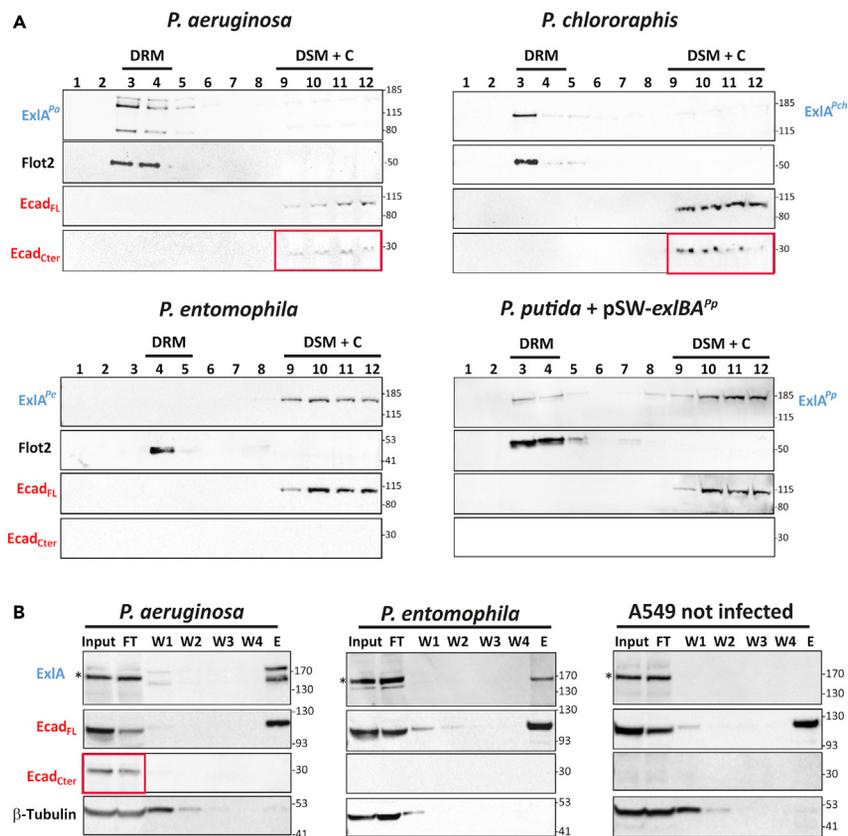


Figure 3. Association of ExlA proteins with lipid rafts and cleavage of E-cadherin

(A) Sucrose gradient fractions of infected epithelial cell membranes. Epithelial cells (A549) were infected with *P. chlororaphis* PA23, *P. entomophila* L48, *P. putida* KT2440 carrying pSW196-exlBA^{Pp}, and *P. aeruginosa* IHMA87, used here as positive control. Detergent-resistant membranes (DRM) containing lipid rafts were separated on sucrose gradient from the detergent-soluble membranes (DSM) and the cytoplasm (C), as described in STAR Methods. Protein contents of each fraction were separated on a gradient 4-12% acrylamide gel and analyzed by Western blotting using anti-ExlA^{Pa} antibodies. Anti-Flotillin-2 antibodies were used to localize lipid raft fractions. Anti-E-cadherin antibodies were used to assess the cleavage of the protein (full length, FL, and cleaved C-terminal fragment 30-kDa, Cter). Note that the *P. entomophila* ExlA does not co-fractionate with DRMs. Both *P. aeruginosa* and *P. chlororaphis* ExlAs induced the E-cadherin cleavage (highlighted in red boxes). Numbers on the top refer to the 12 fractions recovered from the top to the bottom of the tubes containing sucrose gradient, while sizes of protein markers in kDa are shown on the right.

(B) Affinity purifications of whole plasma membrane-bound protein contents using surface biotinylation. After 2-3 h of infections with *P. entomophila* or *P. aeruginosa*, used as positive control, the samples were biotinylated, and the whole lysates were subjected to affinity purification on avidin resin. The fractions from different purification steps were analyzed by Western blots using anti-ExlA^{Pa} antibodies, anti-E-cadherin antibodies as membrane control and anti-β-tubulin as cytoplasm control. Not infected A549 cells were treated in parallel. Input, cell lysate; FT, flow through; W, four washing steps; E, elution. *Non-specific signal revealed by the anti-ExlA^{Pa} antibodies. Note the presence of *P. entomophila* ExlA together with full-length E-cadherin within membranes, and absence of soluble cleaved C-terminal fragment, readily detected in sample from *P. aeruginosa* infection. See also Figure S6.

and ExlA^{Pe}, we hypothesized that the difference between the protein families in the affinity and activity toward membranes depends on their CTDs. To investigate their structure-function relationship, we designed chimeras with switched CTDs ExlA^{PaNter-PeCTD}, ExlA^{PaNter-PpCTD}, ExlA^{PeNter-PaCTD}, and ExlA^{PeNter-PpCTD} (Figure 4A), and introduced them into two host strains: *P. aeruginosa* IHMA87 ΔexlBA and *P. entomophila* L48 ΔexlBA. We used ExlA^{Pa-Nter} previously described (Bertrand et al., 2020) and engineered the *P. entomophila* protein lacking the CTD (ExlA^{Pe-Nter}) (Key resources table and Table S1) as controls. All chimeric proteins were synthesized and secreted at similar levels in the two bacterial backgrounds (Figure 4B inset). We then assessed the cytotoxicity of the chimeras on A549 cells. ExlA^{Pa-Nter} was non-cytotoxic toward epithelial cells as previously reported (Basso et al., 2017), yet both chimeras carrying CTDs of *P. entomophila* or *P. putida* proteins restored the cytotoxicity, showing that the amino acid sequence

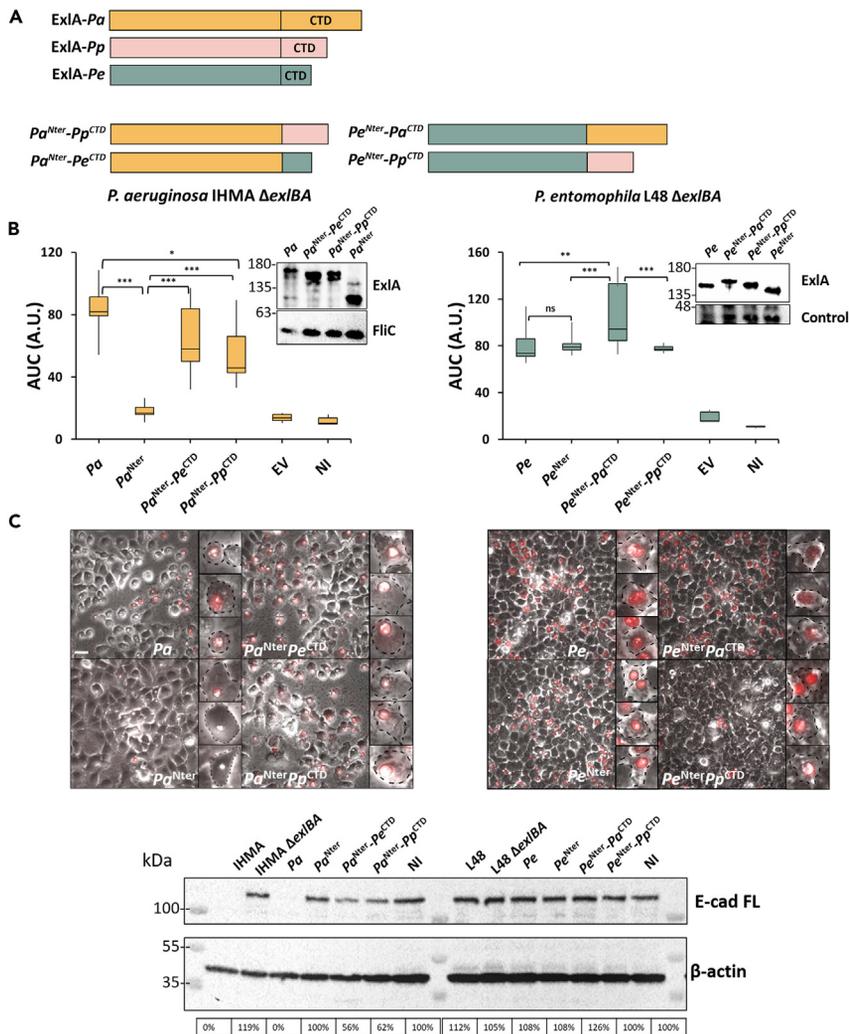


Figure 4. Contribution of different protein domains to ExIA function

(A) Schematic representation of chimeric proteins with switched CTDs.

(B) Comparison of cytotoxicity on epithelial A549 cells of *P. aeruginosa* IHMA Δ exlBA and *P. entomophila* L48 Δ exlBA expressing different chimeric proteins. Epithelial cells were infected at an MOI of 10 at 37°C without arabinose for *P. aeruginosa* and at 30°C in the presence of 0.01% arabinose for *P. entomophila*. PI incorporation was measured as fluorescence emission at 590 nm. AUCs were calculated according to the linear trapezoidal rule and are expressed in arbitrary unit. One-way ANOVA followed by a Holm-Sidak test was performed to determine statistically significant difference. $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***), ns: not significant. Cytotoxicity was followed for each strain at least three times in triplicates. Box plots show the median and standard deviation values.

(C) Microscopy images were taken during the infections with *P. aeruginosa* IHMA wild-type, IHMA Δ exlBA expressing exlBA^{Pa} (*Pa*), exlBA^{Pa-Nter} (*Pa*^{Nter}) and the chimeric proteins (*Pa*^{Nter}-*Pe*^{CTD}, *Pa*^{Nter}-*Pp*^{CTD}) without arabinose and with *P. entomophila* L48 wild-type, L48 Δ exlBA expressing exlBA^{Pe} (*Pe*), exlBA^{Pe-Nter} (*Pe*^{Nter}) and the chimeric proteins (*Pe*^{Nter}-*Pa*^{CTD}, *Pe*^{Nter}-*Pp*^{CTD}) in presence of 0.01% of arabinose. For each bacterium, a superposed image of transmission and PI-fluorescence is shown, with zoom at several selected cells. Scale bar represents 50 μ m. Cells were lysed after the infection and proteins recovered in the lysate were separated on a gradient of 4-20% acrylamide Tris-glycine gel and analyzed by Western blotting using anti-E-cadherin antibodies. Anti- β -actin antibodies were used as a loading control to normalize E-cadherin bands. 100% correspond to the non-infected condition. CTD of *Pa* increases ExIA^{Pe} cytotoxic activity but does not provoke the E-cadherin cleavage during *P. entomophila* infection, whereas ExIA^{Pa} chimeras with CTD of *P. entomophila* and *P. putida* partially restores the ExIA^{Pa} activity. The experiment for cadherin quantification was repeated three times; one representative western blot and quantification are shown.

at the CTD is important for the cytotoxicity and can be exchanged between the two CTD classes. Similar to ExIA^{Pa}, the absence of CTD in the *P. entomophila* protein (ExIA^{Pe-Nter}) resulted in a reduced cytotoxicity. Chimeric proteins are significantly different from full-length ExIA^{Pe}, with ExIA^{PeNter-PaCTD} being more active and ExIA^{PeNter-PpCTD} less active than the native protein; however, they were both significantly more cytotoxic than ExIA^{Pe-Nter}.

As the E-cadherin integrity can serve as a read-out of the pore-forming activity of ExIA through ADAM10 activation, we tested its cleavage by immunoblot and imaged the infection process by microscopy. None of the chimeric proteins in *P. entomophila* induced the cleavage of E-cadherin, nor cell-to-cell adhesion rupture or cell rounding during infection (Figure 4C), although they all caused PI incorporation. This result shows notably, that the CTD of ExIA^{Pa} is not sufficient to form a pore in association with ExIA^{Pe-Nter}. On the contrary, in *P. aeruginosa* the ExIA^{Pa-Nter} chimeric proteins with CTD of *P. entomophila* or *P. putida* induced partial cleavage of E-cadherin with the partial loss of cell-to-cell adhesion (Figure 4C), showing that the presence of any CTD could partially restore the ExIA^{Pa} pore-forming activity. Together, these results suggest that these ExIA orthologues may induce cell death through different mechanisms and that the CTDs and N-terminal domains with FHA repeat domains define together the protein function.

ExIA-like proteins contribute to virulence in *Galleria mellonella* larvae and *Drosophila* flies

We then sought to determine the role and the activity of ExIA proteins *in vivo*, in known hosts or targets such as fungi, amoeba, and insect larvae for *P. chlororaphis* (Kupferschmied et al., 2013; Pukatzki et al., 2002) and *Drosophila* flies for *P. entomophila* (Opota et al., 2011; Vallet-Gely et al., 2010b). We first tested the capacity of *P. chlororaphis* to inhibit the growth of the fungal plant pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea* (Manuel et al., 2012; Savchuk and Dilantha Fernando, 2004), using radial inhibition assays on agar plates. No significant difference in growth inhibition of these two fungi was observed, showing that the ExIA toxin does not participate in the fungicide activity of PA23 (Figure S7A). We then wondered if ExIA could influence the growth of eukaryotic organisms such as amoeba. To test whether *P. chlororaphis* could infect *Acanthamoeba castellanii*, the cytotoxicity of *P. chlororaphis* cells was determined by using a simple plating assay (Pukatzki et al., 2002). No difference in plaque formation was observed between wild-type and $\Delta exlBA$ strains (Figure S7B).

P. chlororaphis strains possess oral and systemic insecticidal activity (Flury et al., 2016) and *P. entomophila* is a natural entomopathogen (Vodovar et al., 2006). To assess whether there is a contribution of ExIA toxins to insect killing, we used *G. mellonella* larvae and *Drosophila melanogaster* adult flies, as models. As we previously reported (Trouillon et al., 2020), the wild-type strain PA23 efficiently kills *G. mellonella* larvae, whereas the $\Delta exlBA$ mutant was significantly attenuated (Figure 5A inset). When other *P. chlororaphis* strains were injected into the hemocoel of the larvae (approx. 6×10^4 CFU), mortality occurred within 18–26 h post-injection with typical changes in color of the larvae due to melanization, an immune response of the larvae (Figures 5A, S8A, and S8B). The *P. chlororaphis* strain CIP75.23 was more virulent than the CIP63.22T strain, in accordance with *in vitro* results on cytotoxicity and the higher amounts of secreted ExIA (Figures 5A and S8), further suggesting a contribution of ExIA^{Pch} to larvae mortality. We then tested the ability of *P. entomophila* strains to kill *G. mellonella* using similar conditions as those established for *P. chlororaphis* (approx. 6×10^4 CFU, incubation at 30°C). Both ΔmnI and $\Delta gacA$ mutants displayed attenuated *Galleria* killing compared to the parental strain, confirming the role of the pore-forming Monalysin in this infection model. In both genetic backgrounds, the inactivation of *exlA* resulted in significantly less virulent strains (Figure 5A) with additive effects, confirming that the ExIA protein of *P. entomophila* plays a role, although probably different than Monalysin and other GacS/GacA regulated genes, in establishing a pathogenic relationship with the host.

As *P. entomophila* was originally isolated from dead flies and is a natural pathogen for *D. melanogaster* (Vodovar et al., 2005), we tested if ExIA contributes to *D. melanogaster* killing by feeding or pricking. As previously reported (Opota et al., 2011; Vallet-Gely et al., 2010a), female flies fed with high doses of *P. entomophila* died within 2–4 days, while in the same experimental conditions, *P. chlororaphis* PA23 provoked low fly mortality over several days, independently of the presence of ExIA (Figure S8C). Surprisingly, although single mutants of Monalysin and GacA were less virulent than the wild-type *P. entomophila* strain (Opota et al., 2011), inactivation of the *exlBA* operon in these three genetic backgrounds had no impact on bacteria-induced fly killing (Figure S8C, lower panel). Recent work by Vesga et al. showed that the PPRCHA0_4278 gene encoding the TpsA/ExIA in *P. protegens* was induced when bacteria are injected

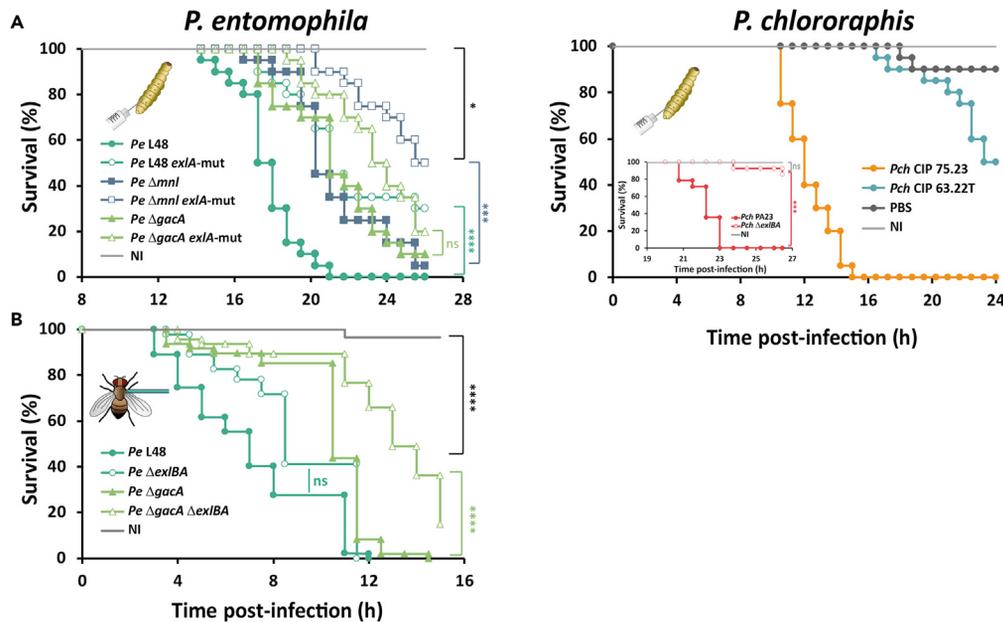


Figure 5. ExlA contributes to killing of fruit fly *Drosophila melanogaster* and larvae of wax moth *Galleria mellonella*

(A) Survival of *G. mellonella* larvae (N = 20) after injection of *P. entomophila* L48 strain (Pe) (left panel) wild type (green cyan), Δ *mnl* (deep blue), Δ *gacA* (light green), and the respective *exlA*-mut in open symbols. Infection with different strains of *P. chlororaphis* (*Pch*) (right panel), reference strain PA23 wild-type and Δ *exlBA* are shown in inset panel. Other strains of *Pch* are presented in Figure S8. Survival rates of the larvae are expressed as percentage (%). Larvae were injected with approx. 6×10^4 bacteria in PBS, and let at 30°C. Control larvae were injected with sterile PBS.

(B) *Drosophila melanogaster* infection (N = 50) with indicated *P. entomophila* strain. *Pe* were injected into the thorax of female *Drosophila* flies using a needle dipped into a bacterial suspension. The fly survival was monitored at room temperature. *P. entomophila* L48 (filled circle), the single mutant Δ *exlA* (open circle), Δ *gacA* (filled triangle), and the double mutant Δ *gacA Δ *exlA* (open triangle) were resuspended in sterile PBS corresponding to OD₆₀₀ of 20. For all experiments, Log-rank test was used to determine statistically significant difference with $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***), $p \leq 0.0001$ (****), ns: not significant. Pricking experiment was repeated five times. See also Figures S7 and S8.*

into the larvae hemocoel, in which the protein might have a specific role in evading the insect immune system (Vesga et al., 2020). This prompted us to inject bacteria directly into the hemocoel of the fly and to evaluate its contribution to virulence. Indeed, the contribution of ExlA was observed when using the Δ *gacA* genetic background, in which the deletion of the *exlBA* operon resulted in significantly delayed fly killing (Figure 5B). Together, our results showed that, in two different *Pseudomonas* species, the disruption of a gene encoding the TPS toxin ExlA reduced bacterial toxicity toward different insects revealing the role of this TPS in pathogenic bacteria-insect interactions.

Comparative genomics of the regions containing *exlA* and *exlB* genes in different *Pseudomonas* species suggests different evolutionary histories

To better understand the evolution of the *exlBA* operon in the different *Pseudomonas* species, we examined their genomic context across pathogenic and environmental isolates of *Pseudomonas* (Figure 6 and Table S4). This revealed that, although ExlB^{Pch} and ExlA^{Pch} are highly similar in sequence to the proteins of *P. aeruginosa*, the genomic environment of the operon is different compared to *P. aeruginosa* but conserved when compared to *P. protegens* (Figure 6). Furthermore, the analyses of three *P. putida* strains (reference strain KT2440 and strains S13 and E41) showed that genomic synteny is conserved only on one side of the *exlBA* cluster (Figure 6). Indeed, strain *P. putida* KT2440 is part of a small group of strains with conserved synteny, but synteny breaks are present compared to the rest of the *P. putida* strains analyzed (Figure S9). This clearly suggests that a genomic rearrangement took place in the ancestor of the small group that contains among others the *P. putida* KT2440 strain. In contrast, genomic synteny is completely lost when analyzing *P. entomophila* 2014 and the widely used L48 strain (Figure 6).

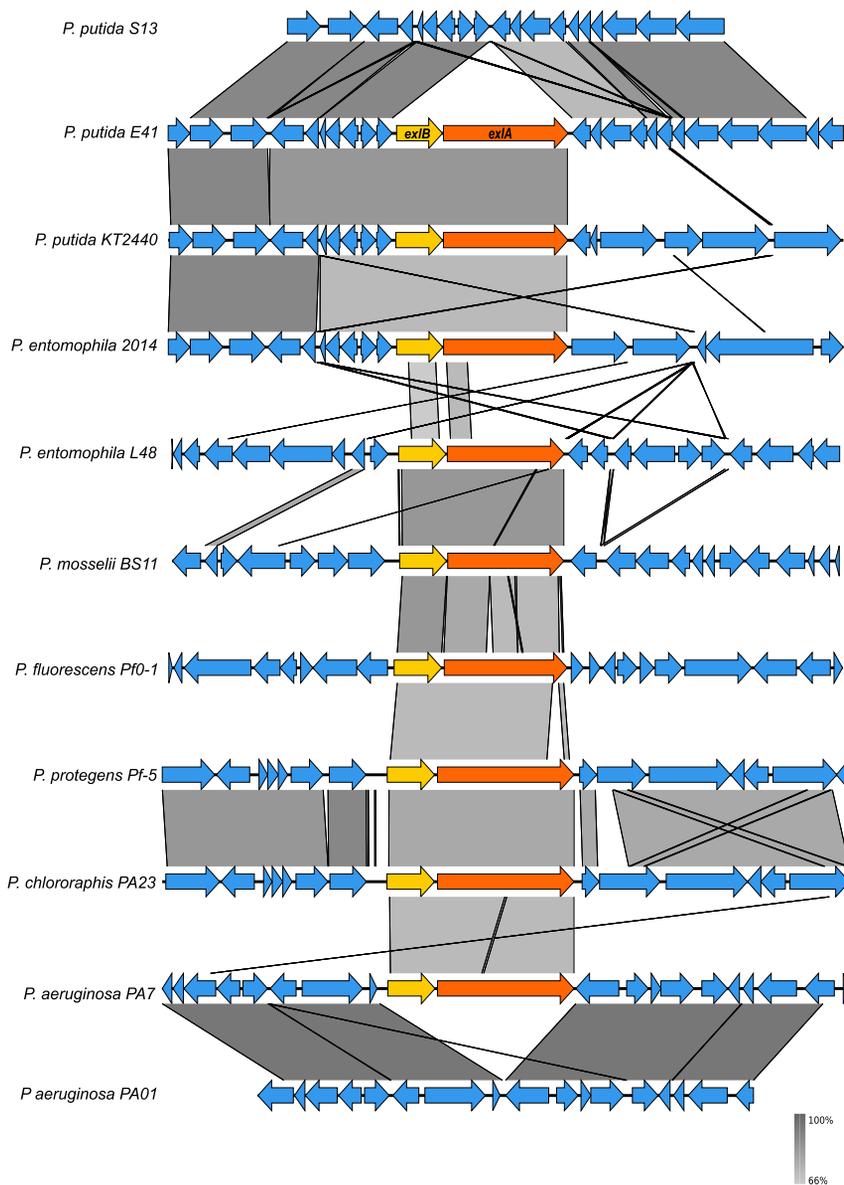


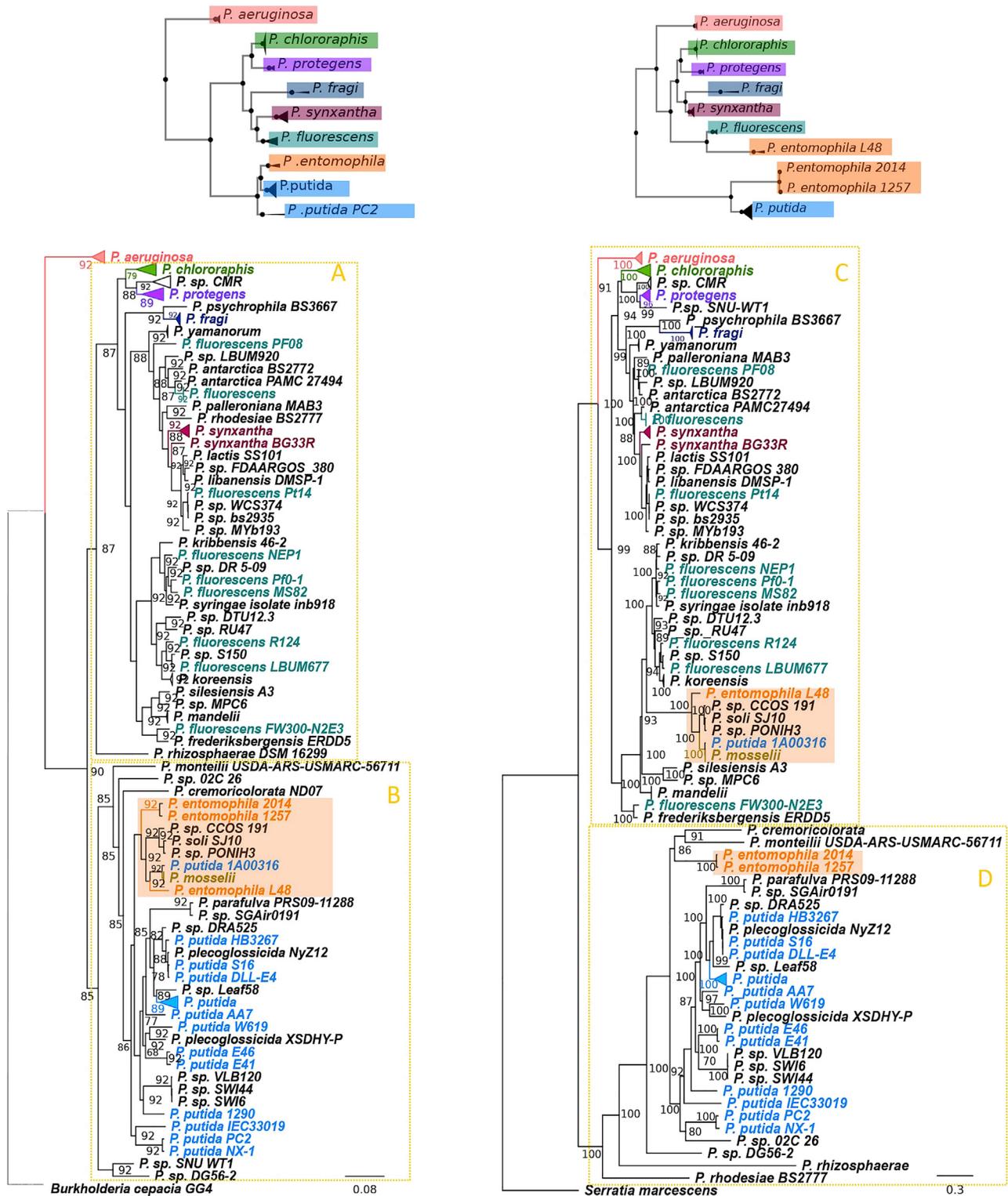
Figure 6. Graphical representation of the genomic context and BLASTn comparison of the region containing the *exlBA* locus in selected *Pseudomonas* strains

Protein-coding regions are represented by arrows (yellow and orange arrows represent *exlB* and *exlA* genes, respectively). The gradient gray shading represents regions of nucleotide sequence identity (100%–66%) determined by BLASTn analysis. Figures are drawn to scale using Easyfig 2.2.2 (Sullivan et al., 2011). See also Figure S9.

This first genomic comparison pointed to a complex history of the evolution of the *exlBA* operon in the genus *Pseudomonas*. Thus, to better understand the evolution of the operon in the analyzed *Pseudomonas* strains, we constructed phylogenetic trees of both *ExlA/B* proteins as well as a *Pseudomonas* species tree, which allowed us to compare the species versus gene histories.

The evolutionary history of the *exlBA* operon in the genus *Pseudomonas* is complex

To analyze the evolution of the *Pseudomonas* species/strains containing *exlBA* used in this study, we constructed a phylogeny based on their core set of genes using *Burkholderia cepacia* strains as outgroup (Figures 7 and S13). The phylogenetic tree we obtained is congruent with phylogenetic studies of the *Pseudomonas* genus published previously (Gomila et al., 2015; Garrido-Sanz et al., 2016; Peix et al., 2018;



Species tree

ExlA Tree

Figure 7. *Pseudomonas* species tree versus ExlA tree

In the upper right side of each tree, a small-condensed version is represented to clearly visualize the main clades. The main clusters of each phylogeny (A, B, C, and D) are highlighted by a yellow square. Orange squares highlight the main *P. entomophila* clusters in each tree. Numbers beside each node represent node support values: Gene support indices (GSIs) for the species tree and percentage bootstrap values after 1000 bootstrap replicates for the ExlA tree. Scale bar on the bottom of each tree indicates the estimated number of amino acid substitutions per site. Both trees are rooted using outgroup species: *Burkholderia cepacia* strains in the case of the *Pseudomonas* species tree and *Serratia marcescens* for the ExlA tree. The branch leading to *B. cepacia* is represented by a dotted line in the species tree, has been shortened to adapt the size of the figure, and does not represent the real distance. See also Figures S2, S10–S13, and Table S6.

Lalucat et al., 2020). The *Pseudomonas* species containing the *exlBA* operon are distributed in two main clades: one containing among others *P. chlororaphis*, *P. protegens*, and *P. fluorescens* strains (Figure 7, clade A), and a second one containing mostly *P. putida* and *P. entomophila* strains (Figure 7, clade B), whereas *P. aeruginosa* strains localize outside these two main clusters. When we reconstruct the same tree but include also *Pseudomonas* strains that do not contain the *exlBA* operon like done previously (Trouillon et al., 2020) (Figure S13), the patchy distribution of strains containing *exlBA* suggests that these genes were acquired through HGT.

To gain insight into the evolutionary history of this locus in the genus *Pseudomonas*, we performed phylogenetic tree reconstruction of both proteins, ExlA and ExlB, using maximum likelihood and Bayesian inference. The trees obtained with the different reconstruction methods were similar for both proteins, indicating that a strong phylogenetic signal is present on both sequences (Figures S10 and S11). Moreover, the trees obtained from ExlA and ExlB were also highly congruent (Figure S12), which suggests that both genes have been transferred together within the genus *Pseudomonas*, in agreement with their strong co-occurrence in different *Pseudomonas* species and their functional relationship. However, the comparison of the *Pseudomonas* species tree and the ExlA/ExlB phylogenies reveals many topological differences between both trees (Figure 7), which suggests that HGT of these two genes between *Pseudomonas* species/strains has also occurred. One of these main differences is the distribution of *Pseudomonas* species in two main groups in the ExlA/B trees (clusters C and D, Figure 7) that do not correspond exactly to the two main groups in the species tree (clusters A and B in Figure 7) in which one contains mainly *P. putida* and some *P. entomophila* strains and the other one mainly *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. protegens*, and *P. fluorescens*. Based on this analysis, the ExlA/B proteins encoded by *P. aeruginosa* are closer to those of *P. chlororaphis* or *P. protegens* than to those of *P. putida*. This result is supported by both ExlA and ExlB phylogenies with high support values, and it is also congruent with our previous sequence analyses showing a higher amino acid identity between ExlA/B from *P. aeruginosa* and *P. chlororaphis* than with that of the *P. putida* cluster. This suggests HGT of these genes between the ancestor of *P. aeruginosa* strains containing the locus and *Pseudomonas* species of cluster A of the phylogeny (Figure 7).

Another main difference is the phylogenetic position of *P. entomophila* strains in the ExlA/B tree, in which the group of *P. entomophila* L48 and *P. mosselii* does not cluster with *P. putida* strains but with the *P. fluorescens* group. In contrast, the other two *P. entomophila* strains (2014/1257) analyzed here cluster with *P. putida* strains like in the phylogeny of the genus (Figure 7). This result is also in agreement with our previous observation of a higher amino acid identity and synteny between *P. putida* and *P. entomophila* 2014/1257 strains in comparison to *P. entomophila* L48 and explains the differences we observed between strain L48 and *P. entomophila* strains 2014/1257 in sequence identity and synteny.

The *exlBA* operon has been acquired several times during the evolution of the genus *Pseudomonas*

The analyses of the genomic context of the *exlBA* operon in the different *Pseudomonas* species revealed that, upstream of *exlB*, the synteny is conserved in all species belonging to the clade B of the *Pseudomonas* phylogeny (Figures 6 and 7), as the *exlBA* genes are situated always downstream the *ytgC* gene. However, the strains belonging to the smallest cluster that contains *P. entomophila* L48 and *Pseudomonas* sp. CCOS191 (orange square, Figure 8) is an exception. In these species, the *exlBA* genes localize in a different genomic region. This is in agreement with the acquisition of the *exlBA* genes by HGT in the ancestor of these strains, as predicted by our previous results. However, the observation that, in all other species belonging to clade B, *exlBA* are downstream the *ytgC* gene suggests that the most parsimonious scenario is that the *exlBA* cluster was also present in this region in the ancestor of the clade *P. entomophila* L48 and *Pseudomonas* sp. CCOS191, and it might have been lost later. To test this hypothesis, we analyzed the

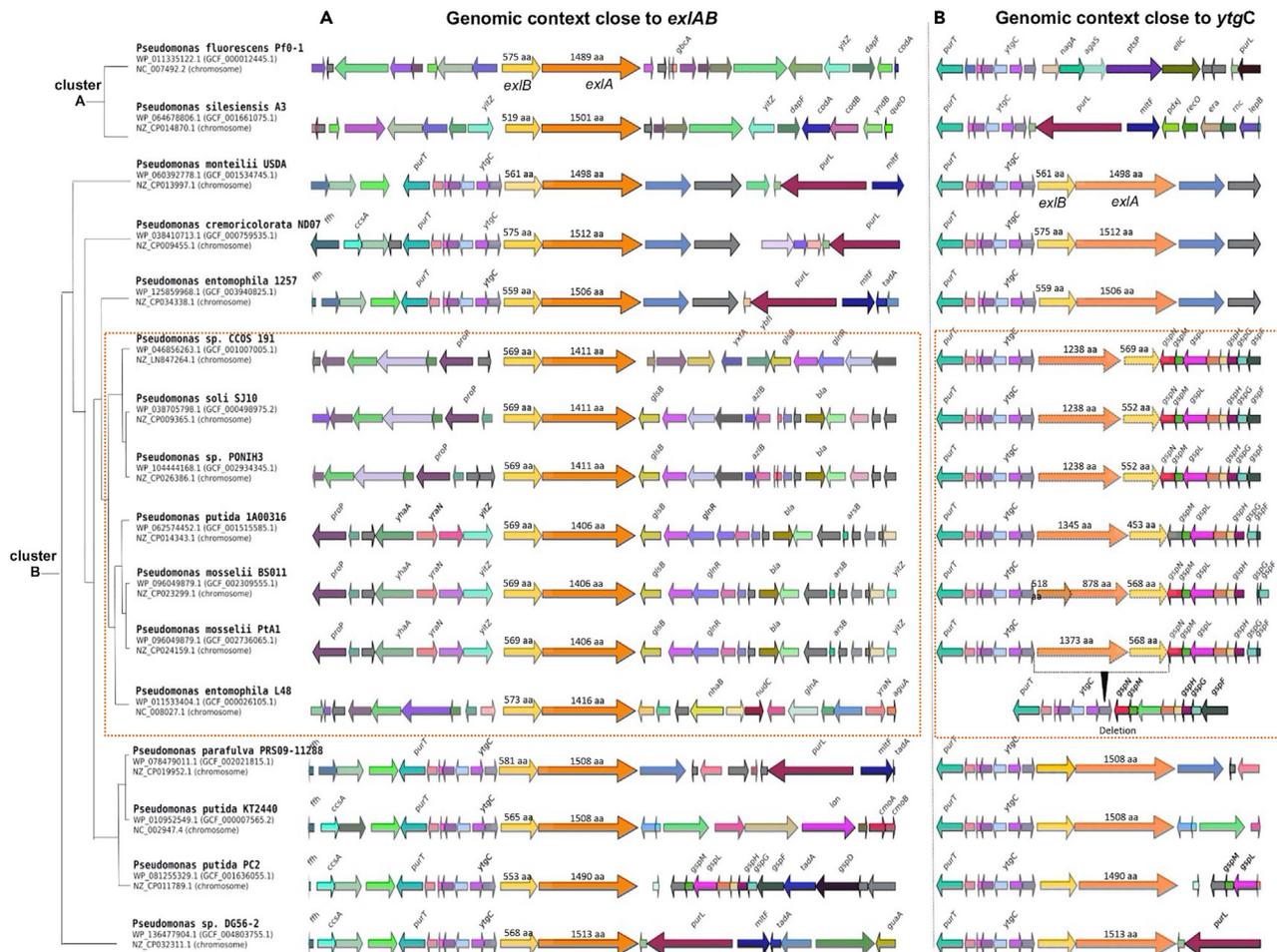


Figure 8. Comparison of the genomic regions containing *exlBA* of *Pseudomonas* species belonging to the cluster *L. entomophila* L48/P. sp. CCOS191 with selected species phylogenetically related to this cluster

(A) *exlBA* operon and its genomic environment in selected species.

(B) Genomic region containing the *ytgC* gene, the genomic location of *exlBA* or *exlAB* operon in the species belonging to cluster B of *Pseudomonas*. Synteny has been analyzed with the software GeneSpy (García et al., 2019). Orange square indicates the cluster *L. entomophila* L48/P. sp. CCOS191. See also Figure S2.

genomic context around the *ytgC* gene in the species of the *P. entomophila* L48 and *Pseudomonas* sp. CCOS191 cluster. Most interestingly, except for strain *P. entomophila* L48, all strains belonging to this cluster contained in this genomic location also sequences with partial homology to *exlB* and *exlA* genes (Figure 8). However, these *exlBA* homologous genes were shorter compared to the genuine *exlBA* genes in the same strains, and even fragmented in some strains (e.g., homologous of *exlA* in strain *P. mosselii* PtA1). Secondly, in these strains, the order of the genes is inverted with respect to the genuine *exlBA* cluster. Thirdly, these homologs had a higher identity with other *exlBA* homologs or genes located downstream of *ytgC* in other strains of the clade B than to the genuine *exlBA* genes from the same strain. This clearly indicates a different origin for the two *exlBA* operons and their homologs close to *ytgC*. Indeed, the analyses of all results suggest, as the most parsimonious scenario of evolution of these genes, that although originally the *exlBA* operon was in the same gene location for all strains belonging to clade B, these genes were duplicated in the species belonging to the small cluster containing *P. entomophila* L48 and *Pseudomonas* sp. CCOS191 due to the acquisition of a second *exlBA* cluster through an HGT event resulting in *exlBA* xenologs. The presence of duplicated copies in these strains, the original orthologs of *exlBA* and the acquired xenologs, probably led to a pseudogenization process of the original ortholog *exlBA* operon that is still ongoing, except in strain L48 in which the original *exlBA* cluster has been completely removed.

DISCUSSION

In this work, we characterized several ExlB-ExlA TPSs encoded in genomes of environmental *Pseudomonas* species that are non-pathogenic for humans. Originally annotated in the databases as secreted filamentous hemagglutinins, adhesins or hemolysins, most of the *Pseudomonas* ExlA proteins share similar size (150-170 kDa), conserved TPS domains and have a central part encoding FHA domains. Based on the primary sequences of the TPS domain and their smaller size, they can be phylogenetically separated from the TPS adhesins, proteins with contact-dependent inhibition activity (CDIs) and other TPS proteins with iron-acquisition activities (Guerin et al., 2017; Mazar and Cotter, 2007). Indeed, the *P. aeruginosa* ExlA groups with the well-studied hemolysins ShlA from *Serratia marcescens* and PhlA from *Photobacterium luminescens*. Here we show that the family of *Pseudomonas* ExlA proteins can be further sub-classified into two groups depending on their CTDs and activity toward host-cell membranes. ExlA proteins of *P. aeruginosa* and *P. chlororaphis* incorporate within lipid rafts of epithelial membranes, which results in the cleavage of the cell-cell junction protein E-cadherin. The cleavage occurs as a consequence of ExlA-dependent pore formation, massive influx of Ca^{2+} which activates in turn the host protease ADAM10 (Reboud et al., 2017). E-cadherins are natural substrates of the ADAM10 metalloprotease and frequent targets of bacterial pathogens through a variety of mechanisms (Huber, 2020). ExlA proteins of *P. entomophila* and *P. putida* although being associated with epithelial membranes did not provoke any cleavage of the E-cadherin protein, suggesting that the ExlA-dependent mechanisms leading to epithelial cell dysfunction or death differ between the species analyzed here. There are many examples where polymorphic toxins, including CDIs from the TPS family, carry functions in CTDs (Ruhe et al., 2020; Zhang et al., 2012). We showed previously that the pore-forming activity of ExlA^{Pa} is contained in its disordered, molten globule CTD (Basso et al., 2017; Bertrand et al., 2020). Indeed, the CTDs of *P. chlororaphis* and *P. aeruginosa* are 64% identical and show the same functional activity, e.g., pore-formation, cell rounding during infection, cleavage of E-cadherin, and both proteins incorporate into lipid rafts. In contrast, ExlA orthologs from *P. entomophila* and *P. putida* have shorter CTDs, and their interaction with the host membranes is different, e.g., there is no cleavage of E-cadherin and consequently no cell rounding, clearly suggesting different modes of action. Small differences in amino acid sequences, notably divergent CTDs, may alter the capacity of proteins to form pores within host membranes, probably through a different fold of molten globules. However, there is a clear contribution of FHA domains in pore-forming activity of the protein, as the chimera between the N-terminal of ExlA^{Pe} carrying CTD of ExlA^{Pa} did not restore E-cadherin cleavage.

The *P. chlororaphis* and *P. entomophila* ExlA proteins contributed to toxicity in *G. mellonella* larvae. This finding might open the possibility to modulate ExlA levels and to increase the use of these *Pseudomonas* species in management of pest insects (Keel, 2016; Kupferschmied et al., 2013). Some entomopathogens, such as *Photobacterium* and *Xenorhabdus* strains, are currently used as bio-insecticides in agriculture thanks to the activity based on the tripartite toxin complex (Tc) production (Liu et al., 2010) composed of TcdA/TcdB/TccC (Yang and Waterfield, 2013). The *P. entomophila* strain analyzed here also possesses the genes encoding TccC-type toxin and proteomic analysis identified the protein. Possible interactions or cooperation of the Tcc toxin with ExlA in insect killing will be investigated further. Moreover, some entomopathogens use the type VI secretion machinery (T6SS) to target insect microbiota (Vacheron et al., 2019). Cooperation between TPS substrates and toxins exported by different secretion machineries should be considered as virulence of entomopathogens is multi-factorial (Keel, 2016). We can speculate that ExlA proteins somehow contribute to the modulation of the host immune response by acting on macrophages, as recently proposed for ExlA from *P. protegens* (Vesga et al., 2020, 2021). In *P. aeruginosa*, two regulatory elements dictate *exlBA* expression: the activating Vfr/cAMP pathway and the Cro/C1-like repressor ErfA (Berry et al., 2018; Trouillon et al., 2020). Interestingly, none of the *exlB* promoters in different *Pseudomonas* display conserved Vfr DNA-binding sites and ErfA regulation was found to be *P. aeruginosa*-specific (Trouillon et al., 2020), suggesting novel, species-specific regulatory pathways governing the activation of the *exlBA* operons. The regulatory mechanisms governing expression of *exlBA* TPS operons in different species need to be investigated in the future, as the spatiotemporal expression of virulence factors may be essential for invasion of insect hosts by bacterial pathogens. Furthermore, the molecular tools developed in this work may allow the investigation of the mechanistic features of ExlA directly in their natural hosts.

It is intriguing, that even if only some *Pseudomonas* species contain the ExlA/B proteins, they have evolved different functions. Indeed, our evolutionary analyses demonstrate that the *exlBA* operon has moved horizontally within the genus *Pseudomonas*, explaining why the similarity values between *exlBA* from different species are not always congruent with the phylogenetic distance between them. We identified a first

putative HGT event suggesting that the *exlBA* operon might have jumped between the ancestor of some *P. aeruginosa* strains and some species of the cluster *P. fluorescens/P. chlororaphis*, although the direction of the transfer cannot be established based on our results. A second transfer event has been identified in the cluster of *P. entomophila* L48 and *Pseudomonas* sp. CCOS191, shedding light on the particularities of *exlBA* from *P. entomophila* L48 strain compared to other *P. entomophila* strains. The phylogenetic results predicted that the transfer occurred from one species of the cluster *P. fluorescens/P. mandelii* to the ancestor of the *P. entomophila* L48/*Pseudomonas* sp. CCOS191 group. Interestingly, the analysis of the genomic context of the *exlBA* in these species led us to reconstruct the evolutionary history of the *exlAB* operon in this cluster. Indeed, our results suggest that the acquisition of a second *exl* operon in the ancestor of this group gave place to the disintegration of the ancestral *exlBA* genes through a gene erosion process that is still ongoing.

Horizontal movement of the *exlBA* operon is probably also responsible for the emergence of these TPSs in the genus *Pseudomonas*, as suggested from the patchy distribution of *exlBA* genes on the *Pseudomonas* phylogeny. The determination of the putative source of acquisition of this operon by different *Pseudomonas* species is out of the scope of this study. However, a homologous search by blast revealed a surprisingly high sequence similarity of *Pseudomonas* ExlA with proteins from nematodes (46% identity and 87% coverage with a hypothetical protein of the nematode species *Dyploscapter pachys*). Given that nematodes have been described as natural hosts of *Pseudomonas*, HGT between them is highly likely and should be explored in the future. The acquisition of genes from a eukaryotic host, as it has been shown for *Legionella pneumophila* (Gomez-Valero and Buchrieser, 2019), is an efficient way to integrate new functions, and increasing adaptability in these organisms could also be possible for *Pseudomonas*.

Taken together, our analyses shed light on the dynamics of the *exlBA* operon within the genus *Pseudomonas* and demonstrated that HGT and genomic erosion shaped functional differences in the *exlBA* operon from different species that might have been acquired from a nematode host.

Limitations of the study

In this study, we functionally characterized ExlA-like toxins in restricted and representative strains of non-*P. aeruginosa*. Phylogenetic studies showed that strains differ greatly in the *exlBA* sequences and their genetic environment. More comprehensive functional approach could be applied to other strains to apprehend global diversity of ExlA functions.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
 - Lead contact
 - Materials availability
 - Data and code availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
 - Bacterial strains and culture cell conditions
 - *Drosophila* and *Galleria*
- METHOD DETAILS
 - Genetic constructions
 - Cytotoxicity assays and microscopy
 - E-cadherin cleavage
 - Lipid raft isolation and western blotting
 - Cytoplasmic membranes purifications
 - Amoeba growth by plaque formation assay
 - *Galleria mellonella* infection
 - *Drosophila* infections
 - Evolutionary analyses
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
 - Statistics
 - Mass spectrometry-based quantitative proteomic analysis of secretomes

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104596>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Isabelle Vallet-Gely and Bruno Lemaitre for providing the *P. entomophila* mutants and plasmids, and Teresa de Kievit for *P. chlororaphis* PA23 strain. *P. aeruginosa* IHMA87 was obtained from the International Health Management Association, USA. We would like to thank Emma Chastaing for her technical assistance for the experiments with amoebae and fungi during her master internship (MAP, Lyon). We thank Emmanuel Taillebourg for the technical assistance in *Drosophila melanogaster* experiments. The work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR-15-CE11-0018-01), the Laboratory of Excellence GRAL, financed within the University Grenoble Alpes graduate school (Ecoles Universitaires de Recherche) CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003) and the Fondation pour la Recherche Médicale (Team FRM 2017; DEQ20170336705) to I.A. We acknowledge the receipt of different *Pseudomonas* strains from the Collection of the Institut Pasteur (CIP). Work in the CB laboratory is financed by the Institut Pasteur and the grant n ANR-10-LABX-62-IBEID. Proteomic experiments were partially supported by ProFI (Proteomics French Infrastructure, ANR-10-INBS-08).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

I.A., C.B., and V.J. designed the study; V.J., A.R., S.B., M.R.G., P.P., E.G., and S.E. performed the experiments and analyzed the data; L.G.V., C.R., and V.C.F. performed the genomic analysis; A.A. and Y.C. performed and analyzed MS/proteomic data; K.J. and M.O.F. provided tools and materials; C.B. and I.A. wrote the manuscript; and all authors edited the manuscript.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: November 17, 2021

Revised: March 15, 2022

Accepted: June 8, 2022

Published: July 15, 2022

SUPPORTING CITATIONS

The following reference appears in the Supplemental Information: [Robinson et al., 2016](#).

REFERENCES

- Basso, P., Ragno, M., Elsen, S., Reboud, E., Golovkine, G., Bouillot, S., Huber, P., Lory, S., Faudry, E., and Attree, I. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* pore-forming exolysin and type IV pili cooperate to induce host cell lysis. *mBio* 8, e02250-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.02250-16>.
- Baud, C., Hodak, H., Willery, E., Drobecq, H., Locht, C., Jamin, M., and Jacob-Dubuisson, F. (2009). Role of DegP for two-partner secretion in *Bordetella*. *Mol. Microbiol.* 74, 315–329. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06860.x>.
- Baynham, P.J., Ramsey, D.M., Gvozdyev, B.V., Cordonnier, E.M., and Wozniak, D.J. (2006). The *Pseudomonas aeruginosa* ribbon-helix-helix DNA-binding protein AlgZ (AmrZ) controls twitching motility and biogenesis of type IV pili. *J. Bacteriol.* 188, 132–140. <https://doi.org/10.1128/JB.188.1.132-140.2006>.
- Berry, A., Han, K., Trouillon, J., Robert-Genthon, M., Ragno, M., Lory, S., Attree, I., and Elsen, S. (2018). cAMP and Vfr control exolysin expression and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* taxonomic outliers. *J. Bacteriol.* 200, e00135-18. <https://doi.org/10.1128/jb.00135-18>.
- Bertrand, Q., Job, V., Maillard, A.P., Imbert, L., Teulon, J.M., Favier, A., Pellequer, J.L., Huber, P., Attree, I., and Dessen, A. (2020). Exolysin (ExlA) from *Pseudomonas aeruginosa* punctures holes into target membranes using a molten globule domain. *J. Mol. Biol.* 432, 4466–4480. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.05.025>.
- Bouillot, S., Pont, S., Gallet, B., Moriscot, C., Deruelle, V., Attree, I., and Huber, P. (2020). Inflammasome activation by *Pseudomonas aeruginosa*'s ExlA pore-forming toxin is detrimental for the host. *Cell Microbiol.* 22, e13251. <https://doi.org/10.1111/cmi.13251>.
- Bouyssié, D., Hesse, A.M., Mouton-Barbosa, E., Rompais, M., Macron, C., Carapito, C., Gonzalez de Peredo, A., Couté, Y., Dupierris, V., Burel, A., et al. (2020). Proline: an efficient and user-friendly software suite for large-scale proteomics. *Bioinformatics* 36, 3148–3155. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa118>.
- Casabona, M.G., Vandenbrouck, Y., Attree, I., and Couté, Y. (2013). Proteomic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 inner membrane. *Proteomics* 13, 2419–2423. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200565>.
- Clantin, B., Hodak, H., Willery, E., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., and Villeret, V. (2004). The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 6194–6199. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400291101>.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., and Posada, D. (2011). ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 27, 1164–1165. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr088>.
- Delattre, A.-S., Saint, N., Clantin, B., Willery, E., Lippens, G., Locht, C., Villeret, V., and Jacob-Dubuisson, F. (2011). Substrate recognition by the POTRA domains of TpsB transporter FhaC. *Mol. Microbiol.* 81, 99–112. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07680.x>.

- Do, C.B., Mahabhashyam, M.S.P., Brudno, M., and Batzoglou, S. (2005). ProbCons: probabilistic consistency-based multiple sequence alignment. *Genome Res.* 15, 330–340. <https://doi.org/10.1101/gr.2821705>.
- Elsen, S., Huber, P., Bouillot, S., Couté, Y., Fournier, P., Dubois, Y., Timsit, J.F., Maurin, M., and Attrée, I. (2014). A type III secretion negative clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* employs a two-partner secreted exolysin to induce hemorrhagic pneumonia. *Cell Host Microbe* 15, 164–176. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.003>.
- Faccione, D., Pasteran, F., Albornoz, E., Gonzalez, L., Veliz, O., Prieto, M., Bucciarelli, R., Callejo, R., and Corso, A. (2014). Human infections due to *Pseudomonas chlororaphis* and *Pseudomonas oleovorans* harboring new bla(VIM-2)-borne integrons. *Infect. Genet. Evol.* 28, 276–277. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.012>.
- Faudry, E., Job, V., Dessen, A., Attree, I., and Forge, V. (2007). Type III secretion system translocator has a molten globule conformation both in its free and chaperone-bound forms. *FEBS J.* 274, 3601–3610. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05893.x>.
- Fauvarque, M.O., Bergeret, E., Chabert, J., Dacheux, D., Satre, M., and Attree, I. (2002). Role and activation of type III secretion system genes in *Pseudomonas aeruginosa*-induced *Drosophila* killing. *Microb. Pathogen.* 32, 287–295. <https://doi.org/10.1006/mpat.2002.0504>.
- Flury, P., Aellen, N., Ruffner, B., Pèchy-Tarr, M., Fataar, S., Metla, Z., Dominguez-Ferreras, A., Bloembergen, G., Frey, J., Goesmann, A., et al. (2016). Insect pathogenicity in plant-beneficial pseudomonads: phylogenetic distribution and comparative genomics. *ISME J.* 10, 2527–2542. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.5>.
- García, P.S., Jauffrit, F., Grangeasse, C., and Brochier-Armanet, C. (2019). GeneSpy, a user-friendly and flexible genomic context visualizer. *Bioinformatics* 35, 329–331. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty459>.
- Garrido-Sanz, D., Meier-Kolthoff, J.P., Göker, M., Martín, M., Rivilla, R., and Redondo-Nieto, M. (2016). Genomic and genetic diversity within the *Pseudomonas fluorescens* complex. *PLoS One* 11, e0150183. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150183>.
- Gomez-Valero, L., and Buchrieser, C. (2019). Intracellular parasitism, the driving force of evolution of *Legionella pneumophila* and the genus *Legionella*. *Genes Immun.* 20, 394–402. <https://doi.org/10.1038/s41435-019-0074-z>.
- Gomila, M., Peña, A., Mulet, M., Lalucat, J., and García-Valdés, E. (2015). Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Front. Microbiol.* 6, 214. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00214>.
- Guérin, J., Bigot, S., Schneider, R., Buchanan, S.K., and Jacob-Dubuisson, F. (2017). Two-partner secretion: combining efficiency and simplicity in the secretion of large proteins for bacteria-host and bacteria-bacteria interactions. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 148. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00148>.
- Huber, P. (2020). Targeting of the apical junctional complex by bacterial pathogens. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1862, 183237. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183237>.
- Jacob-Dubuisson, F., Fernandez, R., and Coutte, L. (2004). Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1694, 235–257. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.03.008>.
- Jacob-Dubuisson, F., Guérin, J., Baelen, S., and Clantin, B. (2013). Two-partner secretion: as simple as it sounds? *Res. Microbiol.* 164, 583–595. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.03.009>.
- Johnson, R.M., Nash, Z.M., Dedloff, M.R., Shook, J.C., and Cotter, P.A. (2021). DegP initiates regulated processing of filamentous hemagglutinin in *Bordetella bronchiseptica*. *mBio* 12, e0146521. <https://doi.org/10.1128/mBio.01465-21>.
- Kos, V.N., Déraspe, M., McLaughlin, R.E., Whiteaker, J.D., Roy, P.H., Alm, R.A., Corbeil, J., and Gardner, H. (2015). The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 427–436. <https://doi.org/10.1128/AAC.03954-14>.
- Keel, C. (2016). A look into the toolbox of multi-talents: insect pathogenicity determinants of plant-beneficial pseudomonads. *Environ. Microbiol.* 18, 3207–3209. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13462>.
- Koonin, E.V. (2016). Horizontal gene transfer: essentiality and evolvability in prokaryotes, and roles in evolutionary transitions. *F1000Research* 5, F1000. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8737.1>.
- Kupferschmied, P., Maurhofer, M., and Keel, C. (2013). Promise for plant pest control: root-associated pseudomonads with insecticidal activities. *Front. Plant Sci.* 4, 287. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00287>.
- Lalucat, J., Mulet, M., Gomila, M., and García-Valdés, E. (2020). Genomics in bacterial taxonomy: impact on the genus *Pseudomonas*. *Genes* 11, E139. <https://doi.org/10.3390/genes11020139>.
- Li, M.Z., and Elledge, S.J. (2007). Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat. Methods* 4, 251–256. <https://doi.org/10.1038/nmeth1010>.
- Liehl, P., Blight, M., Vodovar, N., Boccard, F., and Lemaître, B. (2006). Prevalence of local immune response against oral infection in a *Drosophila/Pseudomonas* infection model. *PLoS Pathog.* 2, e56. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020056>.
- Liu, J.R., Lin, Y.D., Chang, S.T., Zeng, Y.F., and Wang, S.L. (2010). Molecular cloning and characterization of an insecticidal toxin from *Pseudomonas taiwanensis*. *J. Agric. Food Chem.* 58, 12343–12349. <https://doi.org/10.1021/jf103604r>.
- Loewen, P.C., Villeneuve, J., Fernando, W.G., and de Kievit, T. (2014). Genome sequence of *Pseudomonas chlororaphis* strain PA23. *Genome Announc.* 2, e00689-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00689-14>.
- Maier, T., Clantin, B., Gruss, F., Dewitte, F., Delattre, A.S., Jacob-Dubuisson, F., Hiller, S., and Villeret, V. (2015). Conserved *Omp85* lid-lock structure and substrate recognition in *FhaC*. *Nat. Commun.* 6, 7452. <https://doi.org/10.1038/ncomms8452>.
- Manuel, J., Selin, C., Fernando, W.G., and de Kievit, T. (2012). Stringent response mutants of *Pseudomonas chlororaphis* PA23 exhibit enhanced antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro. *Microbiology* 158, 207–216. <https://doi.org/10.1099/mic.0.053082-0>.
- Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., de Strooper, B., Hartmann, D., and Saftig, P. (2005). ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 9182–9187. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500918102>.
- Mazar, J., and Cotter, P.A. (2007). New insight into the molecular mechanisms of two-partner secretion. *Trends Microbiol.* 15, 508–515. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.10.005>.
- Minh, B.Q., Schmidt, H.A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M.D., von Haeseler, A., and Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic Era. *Mol. Biol. Evol.* 37, 1530–1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>.
- Na, S.-I., Kim, Y.O., Yoon, S.-H., Ha, S.m., Baek, I., and Chun, J. (2018). UBCG: up-to-date bacterial core gene set and pipeline for phylogenomic tree reconstruction. *J. Microbiol.* 56, 280–285. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-8014-6>.
- Nash, Z.M., and Cotter, P.A. (2019a). *Bordetella* filamentous hemagglutinin, a model for the two-partner secretion pathway. *Microbiol. Spectr.* 7. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PSIB-0024-2018>.
- Nash, Z.M., and Cotter, P.A. (2019b). Regulated, sequential processing by multiple proteases is required for proper maturation and release of *Bordetella* filamentous hemagglutinin. *Mol. Microbiol.* 112, 820–836. <https://doi.org/10.1111/mmi.14318>.
- Notredame, C., Higgins, D.G., and Heringa, J. (2000). T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment 1. *J. Mol. Biol.* 302, 205–217. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>.
- Oberto, J. (2013). SyntTax: a web server linking synteny to prokaryotic taxonomy. *BMC Bioinformatics* 14, 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-4>.
- Opota, O., Vallet-Gély, I., Vincentelli, R., Kellenberger, C., Iacovache, I., Gonzalez, M.R., Roussel, A., van der Goot, F.G., and Lemaître, B. (2011). Monalysin, a novel β -pore-forming toxin from the *Drosophila* pathogen *Pseudomonas entomophila*, contributes to host intestinal damage and lethality. *PLoS Pathog.* 7, e1002259. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002259>.
- Organization, W.H. (2019). Guidelines for the Prevention and Control of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae, *Acinetobacter Baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Health Care Facilities (World Health Organization).

- Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H., and Velázquez, E. (2018). The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: an update. *Infect. Genet. Evol.* 57, 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.026>.
- Perez-Riverol, Y., Csordas, A., Bai, J., Bernal-Llinares, M., Hewapathirana, S., Kundu, D.J., Inuganti, A., Griss, J., Mayer, G., Eisenacher, M., et al. (2019). The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* 47, D442–D450. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1106>.
- Pukatzki, S., Kessin, R.H., and Mekalanos, J.J. (2002). The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 3159–3164. <https://doi.org/10.1073/pnas.052704399>.
- Reboud, E., Bouillot, S., Patot, S., Béganton, B., Attrée, I., and Huber, P. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* exlA and *Serratia marcescens* ShlA trigger cadherin cleavage by promoting calcium influx and ADAM10 activation. *PLoS Pathog.* 13, e1006579. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006579>.
- Reboud, E., Elsen, S., Bouillot, S., Golovkine, G., Basso, P., Jeannot, K., Attrée, I., and Huber, P. (2016). Phenotype and toxicity of the recently discovered exlA-positive *Pseudomonas aeruginosa* strains collected worldwide. *Environ. Microbiol.* 18, 3425–3439. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13262>.
- Robinson, O., Dylus, D., and Dessimoz, C. (2016). Phyl.io: interactive viewing and comparison of large phylogenetic trees on the web. *Mol. Biol. Evol.* 33, 2163–2166. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw080>.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., and Huelsenbeck, J.P. (2012). MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61, 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.
- Ruhe, Z.C., Low, D.A., and Hayes, C.S. (2020). Polymorphic toxins and their immunity proteins: diversity, evolution, and mechanisms of delivery. *Annu. Rev. Microbiol.* 74, 497–520. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115638>.
- Savchuk, S., and Dilantha Fernando, W.G. (2004). Effect of timing of application and population dynamics on the degree of biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by bacterial antagonists. *FEMS Microbiol. Ecol.* 49, 379–388. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.04.014>.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
- Schwanhauser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., and Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337–342. <https://doi.org/10.1038/nature10098>.
- Sentausa, E., Basso, P., Berry, A., Adrait, A., Bellement, G., Coute, Y., Lory, S., Elsen, S., and Attrée, I. (2020). Insertion sequences drive the emergence of a highly adapted human pathogen. *Microb. Genom.* 6. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000265>.
- Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A., Levy, S.B., and Jackson, R.W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 652–680. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>.
- Simons, J.L., and Vintiner, S.K. (2011). Effects of histological staining on the analysis of human DNA from archived slides. *J. Forensic Sci.* 56, S223–S228. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2010.01595.x>.
- Simons, K., and Gerl, M.J. (2010). Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 688–699. <https://doi.org/10.1038/nrm2977>.
- Sullivan, M.J., Petty, N.K., and Beatson, S.A. (2011). Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics* 27, 1009–1010. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr039>.
- Trouillon, J., Sentausa, E., Ragno, M., Robert-Genthon, M., Lory, S., Attrée, I., and Elsen, S. (2020). Species-specific recruitment of transcription factors dictates toxin expression. *Nucleic Acids Res.* 48, 2388–2400. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1232>.
- ur Rahman, S., Arenas, J., Öztürk, H., Dekker, N., and van Ulsen, P. (2014). The polypeptide transport-associated (POTRA) domains of TpsB transporters determine the system specificity of two-partner secretion systems. *J. Biol. Chem.* 289, 19799–19809. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.544627>.
- Vacheron, J., Péchy-Tarr, M., Brochet, S., Heiman, C.M., Stojiljkovic, M., Maurhofer, M., and Keel, C. (2019). T6SS contributes to gut microbiome invasion and killing of an herbivorous pest insect by plant-beneficial *Pseudomonas protegens*. *ISME J.* 13, 1318–1329. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0353-8>.
- Vallet-Gely, I., Novikov, A., Augusto, L., Liehl, P., Bolbach, G., Pechy-Tarr, M., Cosson, P., Keel, C., Caroff, M., and Lemaître, B. (2010a). Association of hemolytic activity of *Pseudomonas entomophila*, a versatile soil bacterium, with cyclic lipopeptide production. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 910–921. <https://doi.org/10.1128/aem.02112-09>.
- Vallet-Gely, I., Opota, O., Boniface, A., Novikov, A., and Lemaître, B. (2010b). A secondary metabolite acting as a signalling molecule controls *Pseudomonas entomophila* virulence. *Cell Microbiol.* 12, 1666–1679. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01501.x>.
- Vesga, P., Augustiny, E., Keel, C., Maurhofer, M., and Vacheron, J. (2021). Phylogenetically closely related pseudomonads isolated from arthropods exhibit differential insect-killing abilities and genetic variations in insecticidal factors. *Environ. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15623>.
- Vesga, P., Flury, P., Vacheron, J., Keel, C., Croll, D., and Maurhofer, M. (2020). Transcriptome plasticity underlying plant root colonization and insect invasion by *Pseudomonas protegens*. *ISME J.* 14, 2766–2782. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0729-9>.
- Vodovar, N., Vallenet, D., Cruveiller, S., Rouy, Z., Barbe, V., Acosta, C., Cattolico, L., Jubin, C., Lajus, A., Segurens, B., et al. (2006). Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nat. Biotechnol.* 24, 673–679. <https://doi.org/10.1038/nbt1212>.
- Vodovar, N., Vinals, M., Liehl, P., Basset, A., Degrouard, J., Spellman, P., Boccard, F., and Lemaître, B. (2005). *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 11414–11419. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502240102>.
- Weaver, T.M., Hocking, J.M., Bailey, L.J., Wawrzyn, G.T., Howard, D.R., Sikkink, L.A., Ramirez-Alvarado, M., and Thompson, J.R. (2009). Structural and functional studies of truncated hemolysin A from *Proteus mirabilis*. *J. Biol. Chem.* 284, 22297–22309. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.014431>.
- Wiehlmann, L., Cramer, N., and Tümmler, B. (2015). Habitat-associated skew of clone abundance in the *Pseudomonas aeruginosa* population. *Environ. Microbiol. Rep.* 7, 955–960. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12340>.
- Winsor, G.L., Griffiths, E.J., Lo, R., Dhillon, B.K., Shay, J.A., and Brinkman, F.S. (2016). Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res.* 44, D646–D653. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1227>.
- Yang, G., and Waterfield, N.R. (2013). The role of TcdB and TccC subunits in secretion of the *Photobacterium* Tcd toxin complex. *PLoS Pathog.* 9, e1003644. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003644>.
- Yeo, H.J., Yokoyama, T., Walkiewicz, K., Kim, Y., Grass, S., and Geme, J.W.S. (2007). The structure of the *Haemophilus influenzae* HMW1 pro-piece reveals a structural domain essential for bacterial two-partner secretion. *J. Biol. Chem.* 282, 31076–31084. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705750200>.
- Zambolin, S., Clantin, B., Chami, M., Hoos, S., Haouz, A., Villeret, V., and Delepelaire, P. (2016). Structural basis for haem piracy from host haemopexin by *Haemophilus influenzae*. *Nat. Commun.* 7, 11590. <https://doi.org/10.1038/ncomms11590>.
- Zhang, D., de Souza, R.F., Anantharaman, V., Iyer, L.M., and Aravind, L. (2012). Polymorphic toxin systems: comprehensive characterization of trafficking modes, processing, mechanisms of action, immunity and ecology using comparative genomics. *Biol. Direct* 7, 18. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-7-18>.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Anti-Flotillin-2 (mouse)	Abnova, Taiwan	Cat# H00002319-M03; RRID:AB_1674827
Anti-E-cadherin Cter	BD Transduction Laboratories	Cat# 610181; RRID:AB_397580
Anti-β-tubulin	Sigma	Cat# T0198; RRID:AB_477556
Anti-mouse-HRP	Sigma	Cat# A9044; RRID:AB_258431
Anti-rabbit-HRP	Sigma	Cat# A9169; RRID:AB_258434
Anti-ExIA-Cter	Biotem	Basso et al. 2017
Anti-ExIA-Nter	Biotem	Berry et al. 2018
Anti-ExIA (3 peptides)	Biotem	Elsen et al. 2014
Bacterial and virus strains		
PAO1	Reference strain, wild type	https://www.pseudomonas.com/strain
IHMA879472	IHMA ¹ collection, (Basso et al., 2017 ; Kos et al., 2015)	urinary infection, ExIA + strain
IHMA87ΔexlBA	Trouillon et al. (2020)	Deletion of exlBA operon
IHMA87DexlBA:: exlBAPa	This work	IHMA87 ΔexlBA with pSW196-exlBA ^{Pa} in attB site (TcR)
IHMA87DexlBA:: exlBAPa ^{Nter}	This work	IHMA87 ΔexlBA with pSW196-exlBA ^{Pa-Nter} in attB site (TcR)
IHMA87DexlBA:: exlBAPa ^{Nter} Pe ^{CTD}	This work	IHMA87 ΔexlBA with pSW196-exlBA ^{Pa-Nter} Pe ^{CTD} in attB site (TcR)
IHMA87DexlBA:: exlBAPa ^{Nter} Pp ^{CTD}	This work	IHMA87 ΔexlBA with pSW196-exlBA ^{Pa-Nter} Pp ^{CTD} in attB site (TcR)
PA23	T. de Kievit, Loewen et al. (2014)	Reference strain, wild type
PA23 ΔexlBA	Trouillon et al. (2020)	Partial deletion of exlBA
CIP103295T	Institute Pasteur Collection	<i>subsp. aureofaciens</i> , isolated from Maas River clay
CIP106718T	Institute Pasteur Collection	<i>subsp. aurantiaca</i>
CIP110232T	Institute Pasteur Collection	<i>subsp. piscium</i> , isolated from distal intestine of <i>Perca fluviatilis</i>
CIP63.22T	Institute Pasteur Collection	<i>subsp. chlororaphis</i> , plate contaminant
CIP75.23	Institute Pasteur Collection	Soil isolate
CIP76.23	Institute Pasteur Collection	Isolate from grated carrot
M11740	(Faccone et al., 2014)	Human clinical isolate, Argentina
Pc18-6031	CHU Besançon, France	Human clinical isolate, France
L48	B. Lemaitre, (Vodovar et al., 2006)	Entomopathogen, wild type
L48Dmnl::INTexlA	This work	Double mutant in <i>mnl</i> and <i>exlA</i> (GmR)
L48Dmnl	B. Lemaitre, Opota et al. (2011)	Deletion of a gene encoding Monalysin
L48::INTexlA	This work	Insertion of pINT in <i>exlA</i> gene locus PSEEN2177 (named <i>exlA</i> -mut) (Gm ^R)
L48DgacA	B. Lemaitre, Vallet-Gely et al. (2010a),2010b	Deletion of <i>gacA</i>
L48DgacA::INTexlA	This work	Double mutant in <i>gacA</i> and <i>exlA</i> (GmR)
L48ΔexlBA	This work	Partial deletion of <i>exlBA</i>
L48DexlBA + exlBA ^{Pe}	This work	L48 ΔexlBA with pSW196-exlBA ^{Pe} (TcR)

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
L48Dex/BA + ex/BA ^{Pe^{Nter}}	This work	L48 Δex/BA with pSW196-ex/BA ^{Pe^{Nter}} (TcR)
L48Dex/BA + ex/BA ^{Pe^{Nter}Pa^{CTD}}	This work	L48 Δex/BA with pSW196-ex/BA ^{Pe^{Nter} Pa^{CTD}} (TcR)
L48Dex/BA + ex/BA ^{Pe^{Nter}Pp^{CTD}}	This work	L48 Δex/BA with pSW196-ex/BA ^{Pe^{Nter} Pp^{CTD}} (TcR)
KT2440	E. Gueguen, Lyon	<i>P. putida</i> , reference strain
KT2440 + ex/BA ^{Pp}	This work	KT2440 with pSW196-ex/BA ^{Pp} (Tc ^R) expressing ex/BA ^{Pp}
163689	Collection of NRC-AR, ² Besançon, France	<i>P. asiatica</i> Human clinical isolate, France
164217	Collection of NRC-AR, ² Besançon, France	<i>P. plecoglossida</i> Human clinical isolate, France
174639	Collection of NRC-AR, ² Besançon, France	<i>P. putida</i> Human clinical isolate, France
174761	Collection of NRC-AR, ² Besançon, France	<i>P. monteilii</i> Human clinical isolate, France
185589	Collection of NRC-AR, ² Besançon, France	<i>P. monteilii</i> Human clinical isolate, France
185733	Collection of NRC-AR, ² Besançon, France	<i>P. putida</i> Human clinical isolate, France
185840	Collection of NRC-AR, ² Besançon, France	<i>P. monteilii</i> Human clinical isolate, France
185886	Collection of NRC-AR, ² Besançon, France	<i>P. mosselii</i> Human clinical isolate, France
186043	Collection of NRC-AR, ² Besançon, France	<i>P. putida</i> Human clinical isolate, France
TOP10	Invitrogen	Laboratory strain used for cloning

Biological samples

Fetal Calf serum	Thermo Scientific	Cat# 10270-106
------------------	-------------------	----------------

Chemicals, peptides, and recombinant proteins

NuPAGE LDS sample buffer 4x	Thermo Scientific	Cat# 2201423
Reducing Agent 10x	Thermo Scientific	Cat# 221429
4-20% NuPAGE Tris-Glycine	Thermo Scientific	Cat# NP0321BOX
Protease inhibitor cocktail	Roche	Cat# 11873580001
Triton X-100	Sigma	Cat# T8787-100mL
Sequencing Grade Modified Trypsin	Promega	Cat# V5111
LB Broth Miller Luria Bertani	BD Diagnostic	Cat# 244610
LB Agar Miller Luria Bertani	BD Diagnostic	Cat# 244510
Rifampycin	Sigma	Cat# R3501-1G
Tetracyclin	Sigma	Cat# T7660-25G
Gentamycin	Sigma	Cat# G1264-5G
Irgasan	Sigma	Cat# 72779-25G-F
DMEM	Life Technology	Cat# 10567014
Propidium iodide	Life Technology	Cat# P4864
Arabinose	Sigma	Cat# A3256-100G
PBS	Euromedex	Cat# ET330-A
EDTA	Sigma	Cat# ED2SS-50G
Sodium Orthovanadate	Sigma	Cat# 5086050001
Okadaic acid	Sigma	Cat# 495604-25UG
Acrylamide-Bisacrylamide	Euromedex	Cat# EU0074-B
PVDF membrane 0.2μm	Amersham Hybond	Cat# 10600021
R250 Coomassie blue	BioRad	Cat# 1610400
HEPES	Sigma	Cat# H3375
EGTA	Sigma	Cat# E4378
NaCl	Sigma	Cat# 71383

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Glucose	Sigma	Cat# G5767-500G
Saccharose	Sigma	Cat# S0389
NUPAGE 4-12% BisTris	Thermo Scientific	Cat# WG1402BOX
MOPS	Sigma	Cat# M1254-250G
PYG medium	Eurobio	Cat# PYG-500
TBS	Euromedex	Cat# ET220

Critical commercial assays

Cell Surface Biotinylation and Isolation kit	Thermo Fisher Scientific	Cat# A44390
Micro BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Cat# 23235

Deposited data

Proteomic data	This paper	Dataset identifier PXD029397 on www.proteomexchange.org
----------------	------------	--

Experimental models: Cell lines

Epithelial cells A549	ATCC	ATCC CCL-185
Macrophages cells J774A-1	ATCC	ATCC BIT67

Experimental models: Organisms/strains

<i>Drosophila melanogaster</i>		genotype w ¹¹¹⁸ in a Canton-S genetic background
<i>Galleria mellonella</i>	Sud-Est Appats	http://www.sudestappats.fr
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	ATCC	ATCC 1034

Software and algorithms

ImageJ	Schneider et al., 2012	https://imagej.nih.gov/ij/
Adobe Illustrator CS6	Adobe	https://www.adobe.com/ca/products/illustrator.html
SIAS tool	Reche et al., 2008 - Universidad Complutense de Madrid Facultad de Medicina Departamento de Immunología (Microbiología I)	http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html
SyntTaxtool	Oberto, 2013	http://archaea.u-psud.fr/SyntTax
Easyfig 2.2.2 software	Sullivan et al., 2011	https://mjsull.github.io/Easyfig/
UBCG pipeline	Na et al., 2018	https://www.ezbiocloud.net/tools/ubcg
Probcons software	Do et al., 2005	http://probcons.stanford.edu/download.html
T-coffee	Notredame et al., 2000	https://www.tcoffee.org/Projects/tcoffee/index.html#DOWNLOAD
IQ-TREE 2	Minh et al., 2020	http://www.iqtree.org/
Protest software	Darriba et al., 2011	https://github.com/ddarriba/protest3
Mr Bayes 3.2.6	Ronquist et al., 2012	https://nbisweden.github.io/MrBayes/download.html
FigTreev1.4.3	FigTree	http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/
Mascot	Matrix Science	https://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF
Xcalibur	Thermo Fisher Scientific	Xcalibur™ Software - OPTON-30965
Proline	Bouyssié et al., 2020	https://www.profiroteomics.fr/proline/
Sigma Plot	Jandel Scientific	https://systatsoftware.com/sigmaplot

¹International Health Management Association, USA.

²National Reference Center for Antibiotic Resistance.

RESOURCE AVAILABILITY

Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Ina Attrée, ina.attree@ibs.fr.

Materials availability

This study did not generate new unique reagents or insect lines.

Plasmids and bacterial strains generated in this study are available from the [lead contact](#).

Data and code availability

The scripts used in this study are available upon request to the [lead contact](#).

Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the [lead contact](#) upon request.

The mass spectrometry proteomics data have been deposited in the ProteomeXchange (www.proteomexchange.org) with the unique dataset identifier PXD029397 also reported in the [key resources table](#).

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Bacterial strains and culture cell conditions

P. chlororaphis PA23 (Loewen et al., 2014) was a gift from Terasa de Kievit, University of Manitoba, Canada. *P. aeruginosa* IHMA87 is an isolate from a urinary tract infection and was previously shown to secrete Exolysin (Elsen et al., 2014). *P. putida* KT2440 was obtained from the laboratory UMR5240, Lyon, France. *P. entomophila* L48 (Vodovar et al., 2005) and derivatives were obtained from Bruno Lemaitre's lab (EPFL, Switzerland). Bacteria were grown in liquid LB medium (Becton Dickinson) at 28-30°C (for *P. entomophila*, *P. putida* and *P. chlororaphis*) or 37°C (for *P. aeruginosa*) with 300 rpm agitation. After overnight incubation, strains were diluted in LB medium to reach optical density measured at 600_{nm} (OD₆₀₀) of 1.0 at 30°C or 37°C, respectively. When needed, arabinose (0-0.5%, as indicated) was added to the growing cultures in LB, and tetracycline 10 µg/mL was always added in LB and DMEM for *P. putida* and *P. entomophila* cultures to maintain the replication of pSW196.

Epithelial lung carcinoma cell line A549 (ATCC CCL-185) and J774 macrophages were grown in DMEM (Life Technologies) supplemented with 10% fetal calf serum (Lonza). For cytotoxicity test, cells were seeded at 1,25 × 10⁴ cells per well for A549 and 10⁵ cells per well for J744 on black µclear 96-well plates (Greiner) and used 48 h later to obtain confluent monolayers. One hour before infection, medium was replaced by DMEM without phenol red, supplemented with propidium iodide (PI, Sigma, 1 µM). For lipid raft experiments, epithelial cell line A549 was seeded in four 94-mm Petri dish at one or 2 × 10⁷ cells/dish and infected in 6 mL of fresh DMEM media. While for membrane purification only one 94-mm Petri dish was used. Cells were infected with bacterial cultures grown until OD₆₀₀ of 1 (for *P. aeruginosa*, *P. putida* and *P. chlororaphis*) or overnight culture (for *P. entomophila*) at a MOI of 10. Infections were performed in presence of 5% CO₂ at 37°C for *P. aeruginosa* or at 30°C for *P. entomophila*, *P. chlororaphis* and *P. putida* + pSW196-exlBA^{FP}. For *P. putida* 0.5% arabinose was added in the bacterial culture and 0.1% in the infection dish to ensure ExlA expression. For all experiments infections were monitored by microscopy and stopped when approximately 60-70% of the cells started to change the morphology and shrink (in the case of *P. aeruginosa* and *P. chlororaphis*), or when >60% cells were IP positive in a control plate for infection with *P. entomophila* and *P. putida*.

Acanthamoeba castellanii (ATCC 1034) was cultured at 30°C in flasks with 20 mL of PYG medium (2% proteose peptone, 0.1%, yeast extract, 0.1% sodium citrate dihydrate, 0.4 mM CaCl₂, 4 mM MgSO₄, 2.5 mM Na₂HPO₄, 2.5 mM KH₂PO₄, 0.05 mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, 0.1 M Glucose).

Drosophila and Galleria

Drosophila melanogaster flies (genotype *w¹¹¹⁸* in a Canton-S genetic background) were maintained at 25°C on standard yeast-containing fly medium. For oral infection we used 4- to 8-day old females, while acute infection was done on 7- to 10-day old female flies.

Galleria mellonella were purchased from Sud-Est Appats (73720 Queige, France) and held at room temperature until used within two days maximal. Twenty randomly selected larvae were transferred in Petri dish and used per group.

METHOD DETAILS

Genetic constructions

The plasmid used to inactivate the PSEEN2177 gene ($exIA^{Pe}$) was a gift from Isabelle Vallet-Galey (I2BC-CNRS, Paris, France) and was used to construct the $exIA^{Pe}$ mutant (named $exIA^{mut}$ in the main text). The strain was verified by PCR and sequencing for transposon insertion. For the *P. chlororaphis* PA23 $\Delta exIBA$ (RS20945/950) mutant construct, a 900 bp fragment containing a deletion was synthesized by Genewiz and subcloned in *EcoRI-HindIII* of pEXG2, leading to pEXG2-Mut-Pchloro_ $exIBA$. To obtain the deletion of the *P. entomophila* $exIBA$ operon, the pEXG2-Pe_ $\Delta exIBA$ was obtained by sequence and ligation-independent cloning (SLIC) (Li and Elledge, 2007) using primers described in Table S5. The plasmids were transferred into *P. chlororaphis* or *P. entomophila* by triparental mating using pRK600 as a helper plasmid. For allelic exchange, cointegration events were first selected on LB plates containing rifampicin (25 μ g/mL) and gentamicin (25 μ g/mL) at 28°C. Single colonies were then plated on NaCl-free LB agar plates containing 10% (wt/vol) sucrose to select for the loss of plasmid. The sucrose-resistant strains were checked for gentamicin sensitivity and mutant genotype by PCR. For heterologous expression of $exIBA$ operons of *P. entomophila* and *P. putida*, the operons were synthesized by Genewiz and cloned in pSW196 harboring arabinose-inducible promoter (Baynham et al., 2006). The *P. entomophila* operon $exIBA^{Pe}$ (PSEEN2177/PSEEN2176) was synthesized as an *EcoRI-SpeI* fragment with a putative RBS of $exIBA$ from *P. aeruginosa* PA7 (gatacatgaaggatgccgc). Additional *AvrII* (cctagg) restriction site was created around the codon for Leu¹²⁹⁴, just at the beginning of the C-terminal domain (starting from Ala¹²⁹⁶), without change of the amino acid sequence. This *AvrII* site will be further used for the construction of the C-terminal domain deletion mutant ($ExIA^{Pe-Nter}$) (by introducing the Ala1296Stop mutation) and the chimeric proteins. The *P. putida* operon (PP_1450/PP_1449) was synthesized as an *EcoRI-SacI* fragment with the putative RBS of $exIBA$ from *P. aeruginosa* PA7, this first construct pSW196- $exIBA^{Pp*}$ did not express ExIA after arabinose induction. In this construct the RBS was positioned in front of $exIB$ starting from TTG (Met¹) in agreement with annotation at <http://pseudomonas.com> (Winsor et al., 2016). As the second Met, just five amino acids apart, could also serve as a start codon, we deleted by site-directed mutagenesis the sequence encoding the first 5 residues (MRGAS). The resulting pSW196- $exIBA^{Pp}$ showed good expression and secretion of ExIA after arabinose induction. The operon sequences were verified by sequencing.

Protein chimeras were designed to exchange the CTD of $ExIA^{Pa}$ with the Pe^{CTD} and Pp^{CTD} , and the CTD of $ExIA^{Pe}$ was exchanged by the Pa^{CTD} and Pp^{CTD} . Briefly, the sequence of each CTD was amplified by PCR containing an additional 15-bp flanking region corresponding to the pSW196 vector cleaved with *AvrII* and *SpeI* (for the $exIA^{Pe}$ chimeras) or *SacI* and *SrgDI* (for the $exIA^{Pa}$ chimeras). Subsequently the PCR products were directly used as templates for SLIC to generate the four pSW196- $exIBA$ constructs (Table S1). Primers are listed in Table S5.

All the genetic constructs (pSW196) were introduced into *Pseudomonas* strains by triparental mating using pRK2013 or pRK600, as a helper plasmid. Transconjugants were selected on LB plates supplemented with 25 μ g/mL irgasan and 75 μ g/mL tetracycline (for *P. aeruginosa*), 25 μ g/mL rifampicin and 40 μ g/mL tetracycline (for *P. entomophila*) and 25 μ g/mL irgasan and 25 μ g/mL tetracycline (for *P. putida*).

Cytotoxicity assays and microscopy

Cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 10, unless otherwise specified. PI incorporation was followed by fluorescence measuring (excitation 544 nm/emission 590 nm) every 10 min with Fluoroskan Ascent FL2.5 Microplate Fluorometer (Thermo Corporation), over indicated time post-infection. Data were presented as arbitrary fluorescence units (AU) as a function of time. Cytotoxicity assays of strains carrying chimeric proteins were performed over 10 h at 30°C for *P. entomophila* in presence of 0.01% arabinose or 37°C for *P. aeruginosa* without arabinose. For comparison between strains, the data were presented as area under the curve (AUC) calculated according to the linear trapezoidal rule, expressed in arbitrary units (AU).

For microscopy, infections were done as described above and images were captured at the end of infection on a LEICA DMIRE2 microscope with an ORCA-05G camera and with an N PLAN x20 numerical aperture 0.40 objective in transmission light and TRITC channel.

E-cadherin cleavage

A549 epithelial cells were seeded on a 6-well plate in the same conditions as previously described. When about 70% of cells were considered as dead, culture medium was removed, cells were lysed with a lysis buffer (PBS 1x, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, Protease inhibitors (Roche), 1 mM orthovanadate and 50 nM okadaic acid) and scrapped. The suspension was centrifuged at 15,000 g during 15 min at 4°C and the supernatant was recovered. Protein concentrations of the lysates were determined with Micro BCA Protein Assay (Thermo Scientific™) using BSA as standard. Proteins (20 µg sample) were separated by a 10% acrylamide gel, then transferred on to a PVDF membrane and revealed with E-cadherin (BD transduction laboratories) or β-actin (Sigma) antibodies. Quantification of the bands was made with ImageJ software, the amount of E-cadherin full-length was normalized to the amount of β-actin and expressed as percentage referred to non-infected condition, considered as 100%.

Lipid raft isolation and western blotting

At the end bacterial infection, lipid raft fractions were purified as follows (Bertrand et al., 2020). Cells were washed twice with 10 mL PBS, then scraped into 400 µL of 50 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 1% Triton X-100 containing a protease inhibitor cocktail (PIC, Roche). Scraped cells were incubated on ice for 1h with frequent vortexing. Finally, cells debris were removed by centrifugation at 1 000 g for 10 min and solubilized materials were applied on the bottom of a centrifuge tube and a sucrose gradient was applied on the top (typically 4 mL of 40% of sucrose containing the soluble fraction, followed by 5 mL of 30% sucrose and 3 mL of 5% sucrose). Lipid rafts appear as a white cloudy bands below the 5% sucrose after ultracentrifugation at 40,000 rpm for 16 h at 4°C using swinging-bucket SW41 Ti rotors. Fractions of 1 mL were recovered from the top to the bottom of each tube and loaded on a gradient 4-12% Bis-Tris Gel (BioRad or Thermo Fisher Scientific). For Western Blot analysis, the proteins were transferred onto a PVDF membrane and incubated with different antibodies. A mixture of rabbit polyclonal anti-ExlA antibodies composed by antibodies against three synthetic peptides designed from the ExlA sequence (dilution 1:500) (Elsen et al., 2014), antibodies anti-ExlA-Cter and anti-ExlA-Nter both diluted 1:1 000¹⁰; for *P. entomophila* and *P. putida* experiments only the antibodies anti-ExlA-Nter were used. Mouse antibodies anti-Flotillin-2 (BD Biosciences) were used as lipid raft marker at a dilution of 1:10000 and E-cadherin Cter (36/E-Cadherin, BD Transduction Laboratories) (1:5000) were used as membrane marker. Secondary antibodies anti-mouse-HRP (SIGMA) and anti-rabbit-HRP (SIGMA) were diluted (1:10000) and (1: 50000), respectively.

Cytoplasmic membranes purifications

A549 cytoplasmic membranes were purified following the Pierce™ Cell Surface Protein Biotinylation and Isolation kit protocol (Thermo Fisher Scientific). When more than 70% of the cells showed shrinkage (for *P. aeruginosa* and *P. chlororaphis*) or were IP positive (for *P. entomophila* and *P. putida*), cells were washed with 20 mL PBS and then incubated for 30 min at 4°C in 10 mL of Sulfo-NHS-SS-Biotin solution (all provided in the kit). Labeling solution was then removed and cells were first washed with 20 mL TBS-ice cold twice, then scraped in 20 mL of TBS-ice cold and finally centrifuged 3 min at 500 g. Cells pellet were resuspended into 500 µL lysis buffer (from the kit) containing protease inhibitors (Roche) and incubated 30 min on ice. The cell lysates were centrifuged at 15,000 rpm for 15 min at 4°C, the clarified supernatants (containing solubilized membranes and soluble proteins) were incubated with 250 µL NeutrAvidin Agarose (from the kit) for 30 min at room temperature on a rocking platform. Resins were washed 4 times with 500 µL wash buffer (from the kit), then biotinylated membrane proteins captured on the resin were eluted after incubation for 30 min at room temperature with 200 µL of Elution Buffer containing 10 mM DTT. For immunoblotting, 20 µL of fractions from each step were mixed with NuPAGE LDS sample buffer 4x (Thermo Scientific) and Reducing Agent 10x (Thermo Scientific), heated at 70°C for 10 min and loaded on a 4-20% NuPAGE Tris-Glycine (Thermo Scientific) run in MOPS 1x buffer. Proteins were transferred onto PVDF membrane, blocked overnight at 4°C in 5% non-fat dairy milk before revelation with polyclonal rabbit anti-ExlA-Nter antibodies (dilution 1:1,000) (Basso et al., 2017; Berry et al., 2018). Monoclonal mouse E-cadherin-Cter (36/E-Cadherin, BD Transduction Laboratories) (1:5000) and monoclonal mouse anti-β-tubulin (SIGMA) (1:5000) antibodies were used to develop membrane or cytoplasm markers, respectively. Secondary antibodies anti-mouse-HRP (SIGMA) and anti-rabbit-HRP (SIGMA) were used at 1: 50000 dilution.

Amoeba growth by plaque formation assay

100 µL of overnight bacterial culture were pelleted by centrifugation at 4000 rpm for 5 min and resuspended in 1 mL of M63 medium. 100 µL of this resuspension at OD_{600nm} of 0.1 were spread on M63 Glucose

0.2% agar plates to form a bacterial lawn. The plates were dried 20 min. Amoeba's cells were collected by centrifugation, washed once with M63 medium, and different numbers of amoebae cell in 5 μ L M63 were deposited on the top of the agar plate. Plates were incubated at 30°C for 5 days. The least number of *Acanthamoeba castellanii* cells deposited above that was able to form plaque on the bacterial lawns was defined as the minimum number of cells required for plaque formation in this study.

Galleria mellonella infection

Infections of *Galleria* larvae were done as described (Sentausa et al., 2020) with some modifications. The bacterial dose of approx. 6×10^5 bacteria/injection was evaluated in preliminary experiment as such to obtain larval mortality within 40 h post-pricking. 10 μ L of bacterial in PBS solution were injected in the larvae using an insulin pen. Incubations were done at 30°C and larvae were counted every 45 min. The death was evaluated by the insusceptibility to touch with plastic tweezers. The dead larvae were removed from the dish. The experiment was repeated at least twice.

Drosophila infections

For oral infection flies were starved in an empty vial before their transfer to a contaminated vial containing the bacterial or uninfected solutions. *P. chlororaphis* PA23 (wild-type and the $\Delta exlBA$ mutant) and *P. entomophila* L48 wild-type, $\Delta gacA$, Δmnl and the corresponding *exlA* mutant were grown in LB at 28–30°C. Overnight bacterial cultures were pelleted and suspended into a sterile 1% sucrose solution and adjusted to an OD₆₀₀ of 100 corresponding to 1.4 and 6×10^{10} bacteria/mL for *Pe* and *Pch*, respectively. 200 μ L of bacterial suspension were added to a filter paper disk placed on the top of a standard fly-feeding medium in the infected vials. Flies were then maintained at 29°C and the survival was monitored over 2 weeks. Vials containing filter paper imbedded with 200 μ L 1% sucrose alone were used as negative control. Infection experiment was performed with 40–50 flies per conditions tested distributed as 10 flies per vial.

For acute infection, flies were pricked with a thin needle previously dipped into the bacterial cultures prepared from the exponential phase of growth, pelleted and suspended into a sterile PBS solution and adjusted to an OD₆₀₀ of 20. The flies were anesthetized using CO₂ and placed on a CO₂ pad. The needle was dipped into a drop of the diluted bacteria and the flies were pricked in the upper part of thorax (Fauvarque et al., 2002). A drop of PBS was used as a negative control. Flies were maintained at 29°C and the survival was monitored over 15 h. 50 flies were pricked per conditions tested and distributed by set of 10 flies per vial.

Evolutionary analyses

The amino acid identity between ExlA/B from different species/strains of *Pseudomonas* was calculated using both, the SIAS tool with default parameters (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>) and blastp comparison analyses. The synteny conservation of the genomic regions containing *exlA/B* was analyzed on selected strains using both the SyntTax webserver (Oberto, 2013) and EasyFig 2.2.2 (Sullivan et al., 2011). All completely sequenced *Pseudomonas* genomes (690) were downloaded from both NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) and the *Pseudomonas* genome database (<https://www.pseudomonas.com/>) (Table S6). We detected both *exlA* and *exlB* homologous in 191 genomes that were then selected for further analyses (Sheet 2, Table S6). First, a species tree of *Pseudomonas* species/strains containing *exlAB* was constructed using these 191 *Pseudomonas* genomes and two *Burkholderia cepacia* genomes that were selected as outgroups for constructing the phylogeny. The tree reconstruction was based on 92 concatenated housekeeping genes and was built with UBCG (Na et al., 2018), which uses MAFFT to create the multi-gene alignment and FastTree for computing the tree. Using the extracted ExlA and ExlB sequences from each genome, we carried out phylogenetic reconstruction of these two proteins. The sequence of each protein was aligned using PROBCONS (Do et al., 2005) and poorly aligned positions were filtered using T-coffee (v.11) (Notredame et al., 2000) to keep only positions with scores between 8 and 9. The resulting alignment was used for phylogenetic reconstruction with two methods: maximum likelihood and bayesian inference. Maximum likelihood phylogenetic trees were reconstructed using IQ-TREE 2 (v2.1.1) (Minh et al., 2020) with the amino acid substitution model selected with ProtTest (Darriba et al., 2011) based on the smallest Akaike Information Criterion. Branch supports were estimated by means of 1,000 ultrafast bootstrap approximation replicates. Likelihood trees were also re-done adding SHIBA proteins from *Serratia marcescens*. Bayesian analyses were conducted with MrBayes 3.2.6 (Ronquist et al., 2012). Two independent runs with 12 chains each were calculated simultaneously for 1 million

generations, sampling every 10 generations. The average standard deviation of split frequencies below 0.01 was used to ensure convergence of the runs. The probability values were generated after discarding the first 25% of the sampled trees. Phylogenetic trees were visualized using Figtree (v1.4.3, <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Statistics

All statistical analyses were performed using SigmaPlot software. For cytotoxicity on A549 with chimera proteins a one-way ANOVA followed by a Holm-Sidak test was performed. For survival experiments with *Galleria* and *Drosophila*, a log rank statistic method was used.

Mass spectrometry-based quantitative proteomic analysis of secretomes

Overnight cultures of *P. chlororaphis* or *P. entomophila* done in triplicates were centrifuged 10 min at 13,000 rpm at 4°C to separate bacterial cells from secretomes. Laemmli denaturing buffer was added to secretomes followed by a denaturation step by heating for 10 min at 100°C. Samples were analyzed by silver staining on SDS-PAGE (TGX precasted 8-16% acrylamide gels, BioRad). For mass spectrometry, the proteins solubilized in Laemmli buffer were stacked in the top of a 4-12% NuPAGE gel (Invitrogen). After staining with R-250 Coomassie Blue (Biorad), proteins were digested in-gel using trypsin (modified, sequencing purity, Promega), as previously described (Casabona et al., 2013). The resulting peptides were analyzed by online nanoliquid chromatography coupled to MS/MS (Ultimate 3000 RSLCnano and Q-Exactive HF, Thermo Fisher Scientific) using a 140-min gradient. For this purpose, the peptides were sampled on a precolumn (300 μm × 5 mm PepMap C18, Thermo Scientific) and separated in a 75 μm × 250 mm C18 column (Reposil-Pur 120C18-AQ, 1.9 μm, Dr. Maisch). The MS and MS/MS data were acquired by Xcalibur (Thermo Fisher Scientific). Peptides and proteins were identified by Mascot (version 2.6.0, Matrix Science) through concomitant searches against the NCBI database (*Pseudomonas chlororaphis* strain PA23 taxonomy, June 2020 download) or the Microscope (Medigue et al., 2019) database (*Pseudomonas entomophila* L48 taxonomy, January 2020 download), a homemade database containing the sequences of classical contaminant proteins found in proteomic analyses (human keratins, trypsin, etc.), and the corresponding reversed databases. Trypsin/P was chosen as the enzyme and two missed cleavages were allowed. Precursor and fragment mass error tolerances were set respectively at 10 and 20 ppm. Peptide modifications allowed during the search were: Carbamidomethyl (C, fixed), Acetyl (Protein N-term, variable) and Oxidation (M, variable). The Proline software (Bouyssie et al., 2020) was used for the compilation, grouping, and filtering of the results (conservation of rank 1 peptides, peptide length ≥ 6 amino acids, peptide score ≥ 25, allowing to reach a false discovery rate of peptide-spectrum-match identifications < 1% as calculated on peptide-spectrum-match scores by employing the reverse database strategy, and minimum of one specific peptide per identified protein group). Proline was then used to perform a compilation, grouping and MS1 label-free quantification of the identified protein groups based on razor and specific peptides. The results were manually curated to invalidate peptides belonging to deleted or mutated genes that were erroneously detected in the dataset. Intensity-based absolute quantification (iBAQ) (Schwanhausser et al., 2011), values were calculated from MS1 intensities of razor and specific peptides. The iBAQ values were normalized by the sum of iBAQ values in each sample, before averaging the values of the three replicates to generate the final iBAQ value of each sample type. MS data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository (Perez-Riverol et al., 2019) with the dataset identifier PXD029397.

III. Résultats complémentaires

Les tests *in vivo* d'infection des drosophiles montrent qu'ExIA a un rôle dans la virulence de *P. entomophila*. Cependant, l'effet d'ExIA n'est visible que lorsque l'on injecte directement les bactéries dans l'hémolymphe des drosophiles, et non lorsque l'on infecte les drosophiles par voie orale. Cela montre qu'ExIA n'a pas de rôle dans le passage de l'estomac dans le sang mais qu'elle joue un rôle dans la défense contre les cellules immunitaires.

Pour renforcer cette hypothèse, nous avons testé la cytotoxicité des souches de *P. entomophila* sur les macrophages de drosophile S2. Pour cela, les macrophages S2 ont été cultivés en milieu Schneider's Drosophila Medium complété en SVF à 10%, à 25°C avec 5% de CO₂. Les bactéries ont été cultivées en milieu LB complété d'arabinose à 0,05% afin d'induire la production des différentes protéines. Les macrophages de drosophiles étant trop petits pour être détectés au Fluoroskan, l'infection a été suivie par microscopie avec l'Incucyte S3 Live-cell Imaging System (Essen Bioscience). Les cellules ont été infectées à une MOI de 10 avec les différentes souches de *P. entomophila* cultivées en milieu LB à 30°C. L'infection a été réalisée en milieu spécifique aux macrophages S2 avec de l'IP pour marquer les cellules mortes. Les images ont ensuite été traitées sur le logiciel lié à l'Incucyte pour donner le nombre de cellules mortes en fonction du temps (**Figure 52**). L'expérience a été réalisée avec les souches de *P. entomophila* utilisées pour la publication *Pe* WT, *Pe*Δ*mnl* et *Pe*Δ*gacA* ainsi que les souches correspondantes où *exIA* a été mutée. Le gène *mnl* code pour la monlasysine, une toxine utilisée par *P. entomophila*. Le gène *gacA* code pour un des partenaires du système de régulation à deux composants GacS/GacA, qui régule la production de nombreux métabolites secondaires dont certains sont impliqués dans la virulence. Ces différentes souches ont été utilisées afin d'évaluer le rôle d'ExIA indépendamment des autres facteurs de virulence produits par *P. entomophila*. Dans les trois souches produisant la toxine ExIA-like, nous pouvons voir que les macrophages S2 de drosophiles sont tués rapidement par *P. entomophila*. En revanche, lorsque l'on mute le gène *exIA* dans les trois constructions les bactéries n'affectent pas les macrophages. Cela montre qu'ExIA est capable de tuer les macrophages de son hôte naturel, la drosophile.

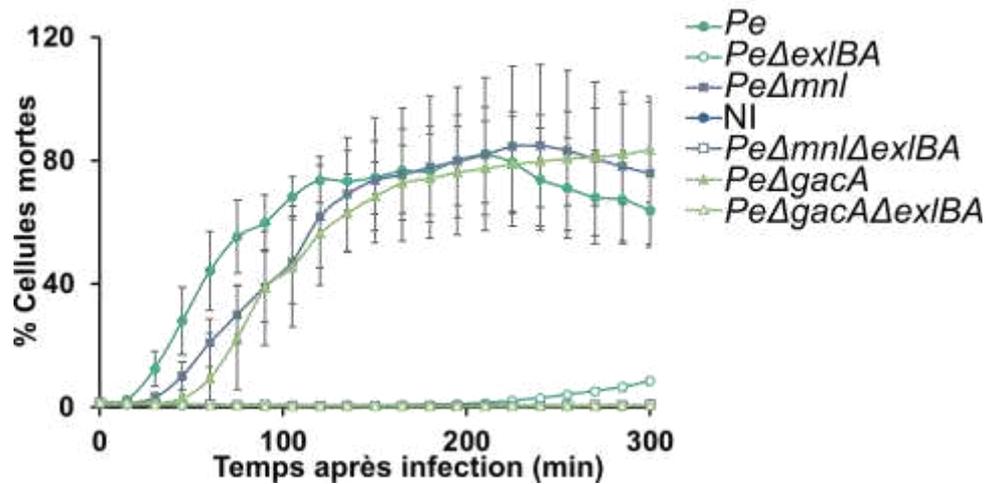


Figure 52. Cytotoxicité de *P. entomophila* sur les macrophages S2 de drosophiles.

Les macrophages S2 ont étéensemencés dans une plaque p96. Les cellules ont été infectées à une MOI de 10. De l'IP a été ajouté au milieu afin de marquer les noyaux des cellules mortes. L'infection a été suivie par le microscope IncuCyte ZOOM (Essen Bioscience). L'expérience a été réalisée en duplicat biologique, en six réplicats techniques lors des deux expériences indépendantes.

Cette expérience complémentaire renforce l'idée qu'ExlA est impliquée dans la défense contre le système immunitaire de son hôte.

Afin de comparer les différentes protéines ExlA-like des différentes bactéries *P. aeruginosa*, *P. entomophila* et *P. putida* nous avons produit les protéines à l'aide d'un plasmide pSW196 à expression inductible à l'arabinose dans le même background génétique. Pour cela, nous avons utilisé la souche IHMA $\Delta exIBA$ et la souche L48 $\Delta exIBA$ dans lesquelles nous avons introduit le plasmide pWS196 contenant les gènes *exIBA* des différentes espèces de *Pseudomonas*. La cytotoxicité des différentes souches a été évaluée sur les cellules épithéliales A549 avec le Fluoroskan. Les bactéries ont été cultivées en milieu LB contenant 0,05% d'arabinose afin d'induire l'expression des gènes *exIBA* et les bactéries ont été ajoutées aux cellules à une MOI de 10.

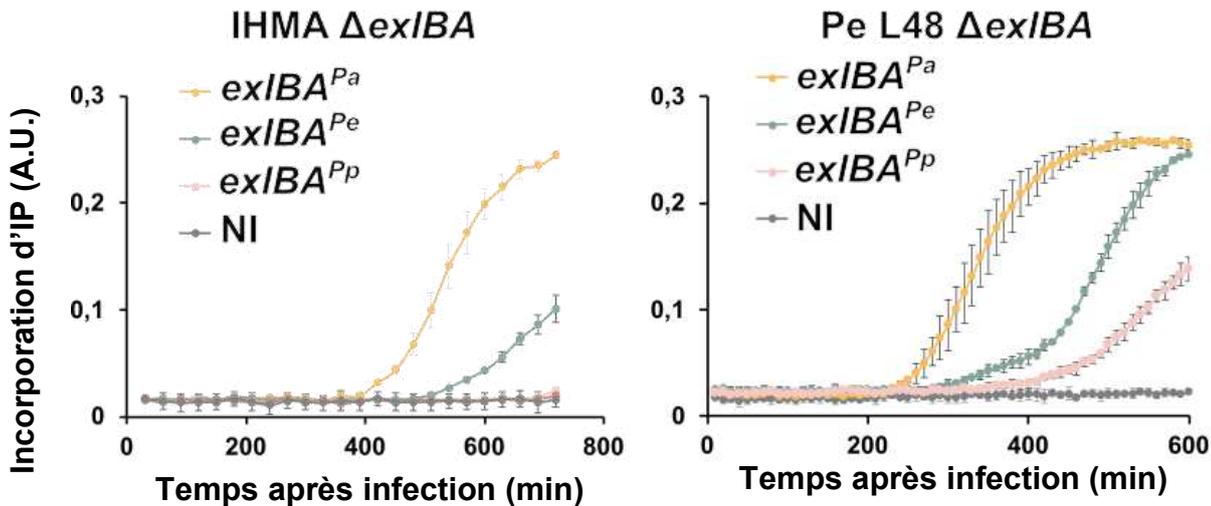


Figure 53. Comparaison des protéines ExIA-like dans différents backgrounds génétiques.

Les cellules A549 ont étéensemencées dans une plaque 96 puits. Les bactéries ont été cultivées en milieu LB jusqu'à atteindre une DO_{600} de 1 puis ajoutées sur les cellules à une MOI de 10. La cytotoxicité au cours du temps a été suivie par la mesure de la fluorescence avec le Fluoroskan. L'expérience a été réalisée en triplicats techniques lors de deux expériences indépendantes.

Dans les deux souches, la protéine ExIA de *P. aeruginosa* confère à la bactérie une cytotoxicité plus importante que les autres protéines. ExIA de *P. putida* confère la cytotoxicité la plus faible, voire inexistante (**Figure 53**). Cet ordre est cohérent avec ce qui a été observé avec les protéines chimériques : en modifiant uniquement la partie C-terminale de la protéine, nous avons observé le même ordre *P. aeruginosa* > *P. entomophila* > *P. putida*. Cela renforce l'idée que la fonction des protéines est contenue dans la partie C-terminale. Cependant, cela montre aussi que d'autres facteurs, présents et propres à chaque espèce sont nécessaires pour la cytotoxicité des bactéries. En effet, en comparant les mêmes protéines dans des espèces différentes, les profils de cytotoxicité sont différents.

IV. Conclusion

Ce travail a permis de montrer *in vivo* que ExIA-like de *P. entomophila* avait un rôle dans l'infection de son hôte naturel, la drosophile. Le rôle d'ExIA serait plutôt lié à la défense contre les cellules immunitaires puisque l'action de la protéine n'est visible que lorsque les bactéries sont injectées directement dans l'hémolymphe des drosophiles. De plus, les bactéries sécrétant ExIA sont toxiques envers les macrophages des drosophiles, et cette cytotoxicité est dépendante d'ExIA.

Nous avons également mis en évidence le rôle des différentes protéines homologues à ExIA. Nous avons montré que toutes les protéines homologues procuraient aux bactéries une cytotoxicité envers les cellules eucaryotes, cependant le mécanisme d'action est différent. En effet, les bactéries produisant les protéines homologues de *P. putida* et *P. entomophila* ne

provoquent pas le clivage de la E-cadhérine et l'arrondissement des cellules, ce qui est la conséquence indirecte de la formation d'un pore dans la membrane des cellules ; contrairement aux bactéries produisant ExlA de *P. aeruginosa* et de *P. chlororaphis*. Nous avons étudié le lien entre la fonction des protéines et la séquence de leur partie C-terminale en produisant des protéines chimériques avec les parties C-terminales échangées. Nous avons montré que la différence de mécanisme d'action est due à la partie C-terminale mais que la partie N-terminale est également importante. En effet, la partie C-terminale de la protéine ExlA associée à la partie N-terminale de la protéine ExlA de *P. entomophila* ne confère pas aux bactéries la capacité à former un pore, la partie C-terminale seule n'est pas suffisante pour l'activité de la protéine.

Discussion générale

Partie 1 : Rôle de PdtA dans la biologie de *Pseudomonas aeruginosa*

Partie 2: Etude de protéines ExlA-like chez différentes espèces de *Pseudomonas*

Ce travail a permis de mieux comprendre le phénotype des bactéries exprimant ces protéines et les mécanismes d'action de deux facteurs de virulence de *Pseudomonas*, tous les deux sécrétés par le système TPS.

Partie 1 : Rôle de PdtA dans la biologie de *Pseudomonas aeruginosa*

Tout d'abord nous avons mené une étude sur la protéine PdtA, qui appartient à la famille des adhésines de type High-Molecular Weight, comme HMW1 et HMW2 de *H. influenzae*, connues pour leurs propriétés adhésives et immunogènes. Quelques études avaient déjà été menées sur PdtA mais son rôle exact et sa structure restent inconnus. Nous avons examiné la synthèse de la PdtA à l'aide d'anticorps polyclonaux dans une cohorte de souches cliniques. Alors que les souches de référence de laboratoire (PAO1, PA7 et PA14) ne synthétisent pas la protéine, PdtA est détectée dans plusieurs souches cliniques, indépendamment de leur origine ou de leur appartenance phylogénique. Une expérience d'immunofluorescence a permis de visualiser PdtA exposée à la surface des bactéries. Nous avons aussi montré que PdtA joue un rôle dans l'auto-agrégation bactérienne en comparant une souche clinique et les souches mutantes $\Delta pdtB$ et $\Delta pdtA$. Nous avons également vu que la majorité des sérums de patients atteints de mucoviscidose ayant contracté une infection à *P. aeruginosa* contenait des anticorps anti-PdtA grâce à un ELISA mis en place au laboratoire.

Par rapport aux études déjà faites sur PdtA, notre travail confirme certains résultats déjà observés mais apporte également de nouvelles informations. En effet, nous avons confirmé par immunofluorescence que PdtA était exposée à la surface des bactéries, comme cela avait été montré par fractionnement par l'équipe de Faure (Faure et al., 2014). Nous pourrions poursuivre l'étude sur le clivage potentiel de la protéine au niveau de sa partie C-terminale par immunofluorescence également, en utilisant séquentiellement des anticorps dirigés contre la partie N-terminale et contre la partie C-terminale de la protéine.

Nous avons également confirmé que la plupart des sérums de patients infectés par *P. aeruginosa* ont développé des anticorps anti-PdtA, ce qui avait déjà été observé (Llamas et al., 2009). Cependant l'ELISA mis en place pour obtenir ce résultat pourra servir pour la suite du projet, et notamment dans la perspective de produire des anticorps thérapeutiques anti-PdtA.

En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction, les adhésines exposées à la surface des bactéries comme FHA de *B. pertussis*, HMW1 et HMW2 d'*H. influenzae* et CdrA de *P.*

aeruginosa sont des cibles thérapeutiques intéressantes, et cette étude suggère que PdtA pourrait l'être aussi. D'abord, la protéine est conservée dans la plupart des souches, quel que soit leur clade phylogénétique. En réalisant une recherche par blast sur l'ensemble des génomes complets de *P. aeruginosa* disponibles sur <https://www.pseudomonas.com/>, nous avons vu que 99% des souches possèdent les gènes *pdtBA* (579 sur 584). De plus, la protéine PdtA est produite lors des infections aiguës comme cela a été décrit dans la littérature (Llamas et al., 2009; Otero-Asman et al., 2020) ainsi que chroniques puisque la plupart des patients atteints de la mucoviscidose ayant contracté une infection à *P. aeruginosa* ont développé des anticorps anti-PdtA. Cela montre également que la protéine a des propriétés immunogènes. Finalement, nous avons confirmé que la protéine était exposée à la surface des bactéries et pourrait donc être ciblée par les anticorps thérapeutiques. Un criblage par ELISA de sérums de patients permettrait d'identifier les patients ayant des anticorps anti-PdtA avec un titre sérique élevé. Ensuite, les clones exprimant les anticorps de ces patients peuvent être isolés à partir des lymphocytes B mémoire, comme cela a été décrit précédemment, puis les surnageants de culture peuvent être criblés par immunofluorescence afin d'identifier ceux qui reconnaissent PdtA. Un criblage large par immunofluorescence peut facilement être mis en place. Une fois identifiés et isolés plusieurs anticorps dirigés contre PdtA pourront être testés dans un test fonctionnel, produits en culture cellulaire, et leur affinité pourra être améliorée par évolution dirigée.

Cependant, malgré la présence d'anticorps anti-PdtA, ces patients ont des infections chroniques à *P. aeruginosa* et les anticorps ne permettent pas d'éliminer les bactéries. L'objectif serait d'administrer les anticorps monoclonaux thérapeutiques dès que l'infection est détectée et avant que les bactéries ne s'organisent en biofilm. Une autre option serait l'administration en cocktail avec des agents anti-biofilm afin d'augmenter l'efficacité du traitement.

PdtA étant présente dans les souches de tous les clades, elle pourrait être utilisée comme diagnostic pour détecter une infection à *P. aeruginosa*, de n'importe quel clade. Les anticorps dont nous disposons pourraient servir à mettre au point un test de détection ambulatoire par immunofiltration ou immunochromatographie. Une autre technique serait d'utiliser l'ELISA mis en place pour détecter des anticorps anti-PdtA chez les patients, révélateurs d'une infection à *P. aeruginosa* et détectés dans la majorité des sérums de patients infectés.

Nous avons également obtenu des résultats nouveaux sur cette protéine, dont nous allons discuter.

I. Rôle de l'agrégation médiée par PdtA

Une question qui demeure sans réponse est le rôle de l'agrégation médiée par PdtA. En effet, nous avons vu que PdtA avait un rôle dans l'auto-agrégation des bactéries mais il reste à déterminer l'intérêt de ce phénotype pour les bactéries. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'agrégation peut avoir différents rôles, et nous allons discuter ces différentes possibilités.

Tout d'abord, la formation d'agrégats dans le milieu SCFM2 mimant la muqueuse des poumons des patients atteints de mucoviscidose est répandue (Azimi et al., 2021; Darch et al., 2017). Il serait intéressant d'évaluer la synthèse de PdtA des autres souches cliniques dans ce milieu, en reprenant les souches initialement criblées et en ajoutant d'autres souches pour un criblage plus large.

Ce travail a montré que PdtA jouait un rôle dans la formation d'agrégats, en milieu LB et également en milieu SCFM2. Cependant, d'autres facteurs sont probablement impliqués dans l'agrégation puisqu'il existe quelques agrégats dans la souche mutante délétée en PdtA. De plus, PdtA est produite lors de la phase exponentielle et joue donc un rôle précoce dans la formation de ces agrégats, tandis que d'autres facteurs comme CdrA par exemple qui est produite en phase stationnaire, permettent également la formation d'agrégats et l'établissement de biofilms (Borlee et al., 2010). Le lien entre les agrégats dépendant de PdtA et la formation de biofilm n'a pas pu être mis en évidence dans ce travail. Cependant, nous avons testé l'implication de PdtA uniquement dans un certain type de biofilm qui se forme à l'interface air-liquide. Nous pourrions tester l'implication de PdtA dans la formation de biofilm en utilisant un modèle micro-fluidique qui permet d'étudier la formation de biofilm. De plus, certains facteurs peuvent peut-être masquer l'effet de PdtA sur la formation de biofilm. Des expériences pourraient être réalisées en utilisant une souche n'exprimant pas les autres facteurs d'adhésion impliqués dans la formation de biofilm, comme CdrA ou les pili. De plus il a été montré que les propriétés physiques et biologiques des agrégats dépendaient de la phase de croissance (Melaugh et al., 2023). En effet, durant la phase exponentielle, les agrégats deviennent de plus en plus grands au cours de la croissance et l'agrégation serait due aux collisions entre les bactéries et à la croissance. Les interactions cellule-cellule se font par l'intermédiaire de Psl, lié aux bactéries. En phase stationnaire, il a été montré que l'ADN extracellulaire et Psl sont responsables de la formation d'agrégats, et que la formation des agrégats en phase exponentielle ne provient pas des agrégats préexistants de la phase stationnaire mais qu'ils se forment *de novo* à partir des bactéries planctoniques (Melaugh et al., 2023). Les mécanismes impliqués dans l'auto-agrégation ne sont donc pas les mêmes en

fonction de la phase de croissance. PdtA semble jouer un rôle dans la formation d'agrégats en phase exponentielle. Il serait donc intéressant d'étudier l'implication de Psl sur la formation des agrégats dans nos souches cliniques exprimant ou non PdtA dans cette phase de croissance.

Comme cela a été décrit chez d'autres bactéries, la formation d'agrégats peut favoriser la pathogénèse (Abdel-Nour et al., 2014; Travier et al., 2013). L'agrégation médiée par PdtA pourrait jouer un rôle dans la pathogénèse de *P. aeruginosa*, puisque la présence de PdtA augmente et accélère légèrement la cytotoxicité des souches. Dans notre modèle *in vitro*, une hypothèse possible est que les bactéries agrégées ont la capacité de délivrer de façon concentrée en un lieu donné plus de facteurs de virulence, ce qui peut accélérer la cytotoxicité. De plus, l'analyse transcriptomique que nous avons réalisée a montré que des gènes permettant notamment la résistance aux anti-microbiens étaient surexprimés chez les bactéries agrégées par le biais de PdtA, ce qui permet aux bactéries de persister chez l'hôte et favorise la colonisation. Nous pourrions tester la résistance aux antibiotiques des bactéries agrégées *versus* non agrégées afin de confirmer que la formation d'agrégats médiée par PdtA confère une protection contre les traitements antibiotiques. Il serait également intéressant d'étudier plus en détail l'implication du système CzcRS et de BswR dans la formation des agrégats puisque les gènes codant pour ces protéines sont surexprimés dans les bactéries agrégées par rapport aux bactéries planctoniques n'exprimant pas *pdtA*. Nous pourrions étudier l'implication des cibles du système CzcRS identifiées dans la littérature (Dieppois et al., 2012), notamment celles qui augmentent la résistance aux antibiotiques et qui augmentent la virulence afin de trouver des mécanismes corrélant la formation d'agrégats et la virulence de *P. aeruginosa*. Une analyse transcriptomique similaire comparant les bactéries non agrégées et agrégées par le biais de Ag43 chez *E. coli*, a été réalisée récemment. Cependant, ces auteurs ont obtenu beaucoup plus de gènes régulés différemment et ont notamment identifié de nombreux gènes liés aux réponses au stress induites par l'agrégation (Chekli et al., 2023). Ils ont également identifié des gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques, ce qui est en concordance avec ce qui est observé dans la littérature (Demirdjian et al., 2019; Staudinger et al., 2014). Notre étude n'a pas permis d'identifier beaucoup de cibles, les bactéries agrégées et non agrégées n'étaient peut-être pas séparées correctement. Cependant, il serait intéressant d'étudier l'implication des gènes homologues à ceux identifiés chez *E. coli* (Chekli et al., 2023) dans notre système.

Nous pourrions également tester la résistance des agrégats aux antibiotiques par rapport aux bactéries planctoniques, pour voir si la formation d'agrégats en phase de croissance

exponentielle, dépendante de PdtA, procure également une résistance aux antibiotiques, comme cela a été décrit dans la littérature pour les agrégats flottants et les biofilms.

II. Structure de PdtA

Des résultats préliminaires de microscopie électronique ont montré une protéine exposée à la surface des bactéries, en forme de L, qui pourrait correspondre en taille à PdtA. Cette forme ressemble à celle de l'auto-agglutinine Ag43 d'*E. coli*. En effet, cette protéine est exposée à la surface, a une forme de L, et les bactéries s'auto-agrègent par le biais d'interactions homotypiques entre deux protéines Ag43 en *trans* (**Figure 54**), et la forme de la protéine est importante pour l'interaction (Heras et al., 2014). En effet, les deux protéines Ag43 peuvent s'associer très étroitement en forme de « poignée de main », ce qui permet la formation d'agrégats robustes. PdtA pourrait s'associer de la même manière, provoquant la formation d'agrégats.

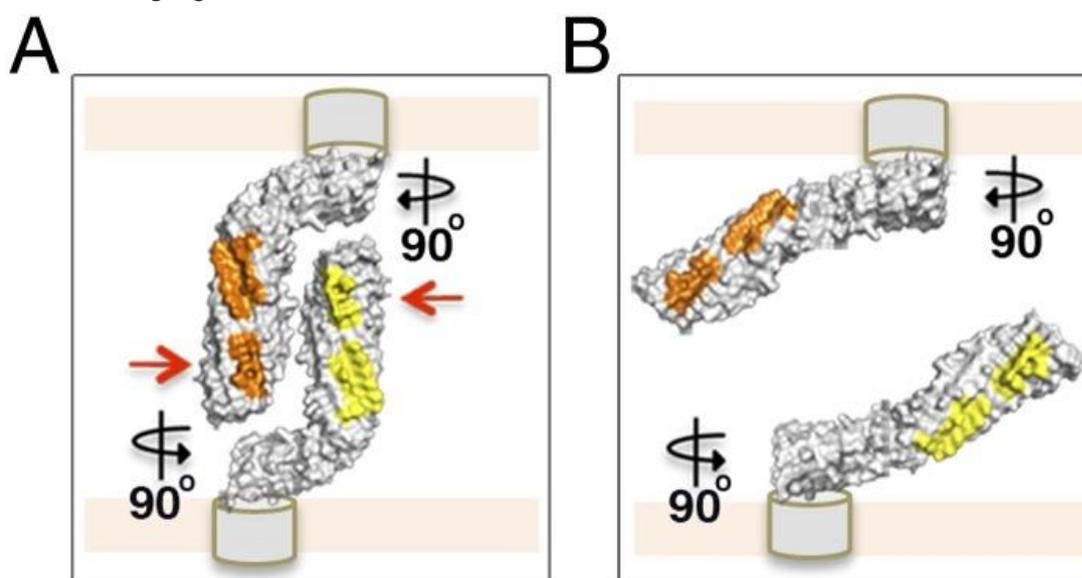


Figure 54. Mécanisme d'assemblage de deux protéines Ag43.

A. Interactions de deux protéines Ag43 en forme de L. **B.** Les zones d'interactions en orange et jaune ne sont plus accessibles si les protéines ne sont pas en forme de L. (Heras et al., 2014).

Des expériences d'immunomarquage pourront être réalisées avec nos anticorps polyclonaux et des anticorps secondaires anti-IgGs de lapin couplés à des billes d'or afin de vérifier que la protéine observée en microscopie électronique est bien PdtA. Un système où la protéine est surexprimée pourrait également être construit, malgré la difficulté liée à sa grande taille. La structure de la protéine PdtA par cryoEM devrait alors être facilement accessible, et il serait facile de modéliser l'interaction homotypique entre deux protéines situées sur des bactéries adjacentes. Cela permettrait de mieux comprendre comment les bactéries s'agrègent. En effet,

une limitation de l'étude de la structure en utilisant notre souche modèle est qu'il y a peu de protéines exportées à la surface, environ 2 signaux par bactéries d'après les images obtenues en immunofluorescence. Un système où PdtA et PdtB sont surexprimés pourrait permettre d'avoir plus facilement accès à la structure de la protéine, comme cela a été fait pour l'étude de CdrA (Melia et al, 2021).

III. Régulation de *pdtA* dans les souches cliniques

Concernant la régulation du gène *pdtA*, l'analyse des génomes des souches cliniques que nous avons séquencées a montré qu'il n'y avait pas de mutation dans la région promotrice ou dans les séquences codant pour *phoB* et *vrel* pouvant expliquer la production constitutive de PdtA chez certaines souches. Il serait intéressant d'étudier de façon globale les différentes souches exprimant ou non PdtA, par bioinformatique, afin d'identifier ce qui rend la synthèse de PdtA constitutive chez ces souches cliniques.

Partie II : Etude de protéines ExIA-like chez différentes espèces de *Pseudomonas*

Dans un deuxième projet, nous avons évalué la relation entre la structure et la fonction de différentes protéines homologues d'ExIA chez différentes espèces de *Pseudomonas*. En effet, il existe des protéines homologues à la toxine ExIA chez *Pseudomonas entomophila*, *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas chlororaphis*. Nous avons montré que les différentes protéines homologues à ExIA n'avaient pas toutes la même activité envers les cellules hôtes.

Nous avons vu que ces protéines induisaient une perméabilisation de la membrane mais sans modifier la forme des cellules, contrairement aux protéines ExIA de *P. aeruginosa*. De plus, ExIA de *P. entomophila* et de *P. putida* ne se lient pas aux mêmes domaines des membranes. En effet, ExIA de *P. chlororaphis* et de *P. aeruginosa* se lient aux radeaux lipidiques, des microdomaines dans la membrane très riches en cholestérol notamment, mais pas ExIA de *P. entomophila* ni de *P. putida*. Le site de liaison aux membranes sont donc différentes, ainsi que les mécanismes d'action. Cependant le mécanisme d'action employé par les protéines ExIA de *P. entomophila* et de *P. putida* pour infecter leur hôte n'a pas été identifié. Il serait intéressant d'aller plus loin et d'enquêter sur le mécanisme par lequel ces protéines perméabilisent la membrane des cellules eucaryotes.

De plus, cette étude conforte l'idée que la fonction de la protéine ExIA réside dans sa partie C-terminale, comme cela a déjà été montré (Basso et al., 2017; Bertrand et al., 2020). La partie C-terminale de ExIA de *P. chlororaphis* et de *P. aeruginosa* est identique à 64% et elles ont la même activité envers les cellules hôtes. En revanche, la partie C-terminale de ExIA de *P. entomophila* et de *P. putida* est plus courte et très divergente de celle de ExIA de *P. chlororaphis* et de ExIA de *P. aeruginosa* et ces deux types de protéines n'ont pas la même activité envers les cellules hôtes. Cependant, la partie N-terminale de la protéine est également importante car la partie C-terminale seule ne suffit pas à conférer la même activité que la protéine entière puisque la protéine chimérique ExIA de *P. entomophila* avec la partie C-terminale de ExIA de *P. aeruginosa* ne restaure pas le clivage de la E-cadhérine et ne se lie pas aux radeaux lipidiques. Il serait intéressant d'identifier les autres facteurs importants pour la cytotoxicité présents dans la partie N-terminale de la protéine ExIA de *P. aeruginosa*.

De plus, ce travail a montré que les protéines ExIA-like des bactéries environnementales sont impliquées dans la virulence chez l'insecte. En effet, nous avons montré que la protéine ExIA-like de *P. entomophila* était impliquée dans la virulence bactérienne en utilisant pour modèle *in vivo* l'hôte naturel de ce pathogène, la drosophile. Nous avons également montré que ExIA-

like de la bactérie environnementale *P. chlororaphis* contribue à la toxicité de la bactérie chez la larve *Galleria*, démontrant *in vivo* l'importance de ces protéines homologues dans la virulence bactérienne. Ces protéines n'avaient pas encore été caractérisées et ce travail montre pour la première fois leur rôle dans l'interaction hôte-pathogène. Cependant, la virulence de ces bactéries est sans doute multifactorielle, puisque l'effet de ExlA-Pe n'est visible que dans une souche délétée de *gacA*, qui régule de nombreux facteurs de virulence. De plus, notre étude suggère que ExlA-Pe serait plutôt impliquée dans la lutte contre les défenses immunitaires de son hôte, ce qui est en accord avec les résultats observés pour ExlA de *P. protegens* (Vesga et al, 2020). Nous pouvons donc spéculer que les protéines ExlA des bactéries environnementales sont des facteurs de virulence impliqués dans les défenses contre le système immunitaire des insectes. Il serait intéressant de réaliser une étude plus poussée en utilisant un plus grand nombre de protéines ExlA-like, étant donné que dans de nombreuses espèces de *Pseudomonas* il y a des protéines supposées homologues à ExlA. En effet, une étude génétique a permis d'identifier le locus correspondant à *exlBA* chez de nombreuses espèces de *Pseudomonas* environnementales mais leur fonction n'a pas été étudiée. Au vu des résultats obtenus avec *P. entomophila*, *P. putida* et *P. chlororaphis*, nous pouvons spéculer que ces protéines ont également une fonction de toxine. Cependant cette étude était restreinte à trois souches de référence des espèces *P. entomophila*, *P. putida* et *P. chlororaphis*, il serait intéressant d'agrandir l'étude à plus de souches de plus d'espèces afin de mieux connaître la diversité de fonction de ces protéines. Ce travail a permis d'identifier deux sous-groupes de protéines ExlA-like en considérant la séquence de la partie C-terminale et de la fonction envers les cellules hôtes. Une étude plus approfondie pourrait permettre de mieux définir ces sous-groupes.

Ce travail a également permis de mieux comprendre la fonction d'une protéine sécrétée par le système TPS chez des bactéries environnementales. Bien que les systèmes TPS soient très répandus chez les bactéries Gram-négatives, ils sont surtout étudiés chez les bactéries pathogènes. Cependant, ils sont retrouvés chez de nombreuses bactéries environnementales et ce travail apporte des informations sur leurs mécanismes d'action. Ces bactéries environnementales sont utilisées dans l'industrie, notamment pour lutter contre les parasites des plantes. Les protéines homologues à ExlA étant impliquées dans la virulence envers les insectes, elles pourraient être utilisées en les surexprimant dans ces bactéries comme bio-insecticide.

Dans l'ensemble, ce travail a permis de mieux comprendre le fonctionnement de deux facteurs de virulence chez *P. aeruginosa* et également chez des bactéries environnementales et ouvre

la voie pour poursuivre les recherches sur une potentielle cible thérapeutique de *P. aeruginosa*.

Matériel & Méthodes

Souches bactériennes et conditions de culture

L'ensemble des souches utilisées pour ce projet sont listées dans le **tableau 9**. Les souches cliniques nommées *PaG* numérotées de 1 à 46 ont été obtenues par le CHU de Grenoble. Ces souches ont été isolées de patients ayant une bactériémie à *P. aeruginosa* en 2019. Les souches ont été pré cultivées en milieu LB ou en milieu SCFM2 à 37°C avec une agitation de 300rpm, toute la nuit. Les antibiotiques ont été ajoutés au milieu si nécessaire, aux concentrations indiquées dans le **tableau 10**. Le lendemain, les cultures ont été diluées à une DO₆₀₀ de 0,05 et cultivées jusqu'à une DO₆₀₀ de 0,8-1.

Nom	Origine	Objectif
<i>E. coli</i>		
Top 10	Invitrogen	Clonage
BL21 DE3	Invitrogen	Expression de protéines
<i>P. aeruginosa</i>		
<i>PaG1</i>	CHU Grenoble	Etude de PdtA
<i>PaG2</i>	CHU Grenoble	Etude de PdtA
<i>PaG3</i>	CHU Grenoble	Etude de PdtA
<i>PaG4</i>	CHU Grenoble	Etude de PdtA
<i>PaG5</i>	CHU Grenoble	Etude de PdtA
<i>PaG6</i>	CHU Grenoble	Etude de PdtA
<i>PaG7</i>	CHU Grenoble	Etude de PdtA
<i>PaG8</i>	CHU Grenoble	Etude de PdtA
<i>PaG9</i>	CHU Grenoble	Etude de PdtA
<i>PaG10</i>	CHU Grenoble	Etude de PdtA
<i>PaG11</i>	CHU Grenoble	Etude de PdtA
<i>PaG12</i>	CHU Grenoble	Etude de PdtA
<i>PaG13</i>	CHU Grenoble	Etude de PdtA
<i>PaG14</i>	CHU Grenoble	Etude de PdtA
<i>PaG15</i>	CHU Grenoble	Etude de PdtA
<i>PaG16</i>	CHU Grenoble	Etude de PdtA
<i>PaG17</i>	CHU Grenoble	Etude de PdtA
<i>PaG18</i>	CHU Grenoble	Etude de PdtA

PaG19	CHU Grenoble	Etude de PdtA
PaG21	CHU Grenoble	Etude de PdtA
PaG22	CHU Grenoble	Etude de PdtA
PaG23	CHU Grenoble	Etude de PdtA
PaG24	CHU Grenoble	Etude de PdtA
PaG25	CHU Grenoble	Etude de PdtA
PaG26	CHU Grenoble	Etude de PdtA
PaG27	CHU Grenoble	Etude de PdtA
PaG28	CHU Grenoble	Etude de PdtA
PaG29	CHU Grenoble	Etude de PdtA
PaG30	CHU Grenoble	Etude de PdtA
PaG31	CHU Grenoble	Etude de PdtA
PaG32	CHU Grenoble	Etude de PdtA
PaG33	CHU Grenoble	Etude de PdtA
PaG34	CHU Grenoble	Etude de PdtA
PaG35	CHU Grenoble	Etude de PdtA
PaG36	CHU Grenoble	Etude de PdtA
PaG37	CHU Grenoble	Etude de PdtA
PaG38	CHU Grenoble	Etude de PdtA
PaG39	CHU Grenoble	Etude de PdtA
PaG41	CHU Grenoble	Etude de PdtA
PaG42	CHU Grenoble	Etude de PdtA
PaG43	CHU Grenoble	Etude de PdtA
PaG44	CHU Grenoble	Etude de PdtA
PaG45	CHU Grenoble	Etude de PdtA
PaG46	CHU Grenoble	Etude de PdtA
CHA	Isolat clinique de patient atteint de la mucoviscidose	Test de « swimming »
IHMA87	(P. Basso et al., 2017)	Test de « twitching »
IHMA87Δ<i>pilA</i>	(P. Basso et al., 2017)	Test de « twitching »

<i>PaG30ΔpdtA</i>	Ce travail	Délétion du gène <i>pdtA</i>
<i>PaG30ΔpdtB</i>	Ce travail	Délétion du gène <i>pdtB</i>
<i>PaG30ΔpdtB::pSW196pdtB</i>	Ce travail	Complémentation de PdtB par ajout de <i>pdtB</i> dans un plasmide à l'expression inductible par l'arabinose
<i>PaG30::miniCTX PX2gfp</i>	Ce travail	Observation microscopique des bactéries/agrégats
<i>PaG30::miniCTX PX2mCherry</i>	Ce travail	Observation microscopique des bactéries/agrégats
<i>PaG30ΔpdtA::miniCTX PX2gfp</i>	Ce travail	Observation microscopique des bactéries/agrégats
<i>PaG30ΔpdtA::miniCTX PX2mCherry</i>	Ce travail	Observation microscopique des bactéries/agrégats

Tableau 9. Liste des souches utilisées lors du projet.

	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Kan	25 µg/mL	-
Amp	50 µg/mL	-
Tet	10 µg/mL	75 µg/mL
Gm	50 µg/mL	200 µg/mL

Tableau 10. Liste des antibiotiques et des concentrations utilisées selon l'organisme.

Clonage des séquences correspondantes à PdtA^{NTD} et PdtA^{CTD}

Le système T7 est très répandu pour l'expression chez *E. coli* et nous avons choisi d'exprimer les domaines protéiques dans la souche de *E. coli* BL21 DE3, adaptée à la surproduction d'une protéine. Cette souche possède une copie chromosomique du gène de l'ARN polymérase T7, contrôlée par un promoteur *lac*. Les plasmides pET15b et pET30b possèdent le promoteur T7 et les gènes d'intérêts ont été clonés en aval de ce promoteur. Ainsi par ajout de l'inducteur, l'IPTG, l'ARN polymérase T7 est exprimée, ce qui assure la transcription du gène d'intérêt. Dans le but de purifier ces domaines protéiques, un HisTag a été ajouté en N-ter.

La séquence correspondant à PdtA^{NTD} (Leu⁴⁵¹-Ala¹⁰⁴⁶) a été clonée par ligation dans le plasmide pET30b en phase avec un HisTag en N-ter. La séquence nucléotidique a été

amplifiée par PCR avec la polymérase Q5 (NEB) avec les primers listés dans le **tableau 11**. Le plasmide pET30b a été extrait (Monarch Plasmid Miniprep Kit) d'une culture de *E. coli*. Le plasmide et le fragment préalablement digérés par NdeI et XhoI ont été ligués avec la Quick ligase (NEB) et le plasmide résultant a été transformé dans les cellules compétentes Top10 (Invitrogen). Les clones ayant intégré le plasmide ont été sélectionnés sur boîte LB contenant de la kanamycine (Kan) à une concentration de 25µg/mL.

La séquence correspondant à PdtA^{CTD} (Met³⁰⁶⁴-Leu⁴¹⁸⁰) été clonée par Sequence and Ligation Independent Cloning (SLIC) (Li and Elledge, 2007) dans le plasmide pET15b. La SLIC consiste à cloner un ou plusieurs fragments dans un vecteur sans utiliser de sites de restrictions, mais repose sur la présence de régions homologues aux régions flanquantes aux extrémités de chaque morceau d'ADN (**Figure 55**). La séquence nucléotidique étant longue, nous avons décidé de l'amplifier en deux fragments, plus faciles à manipuler. La SLIC permettant de cloner plusieurs fragments dans un plasmide nous avons opté pour cette technique de clonage. Les deux fragments ont été clonés en aval du HisTag présent dans le plasmide pET15b.

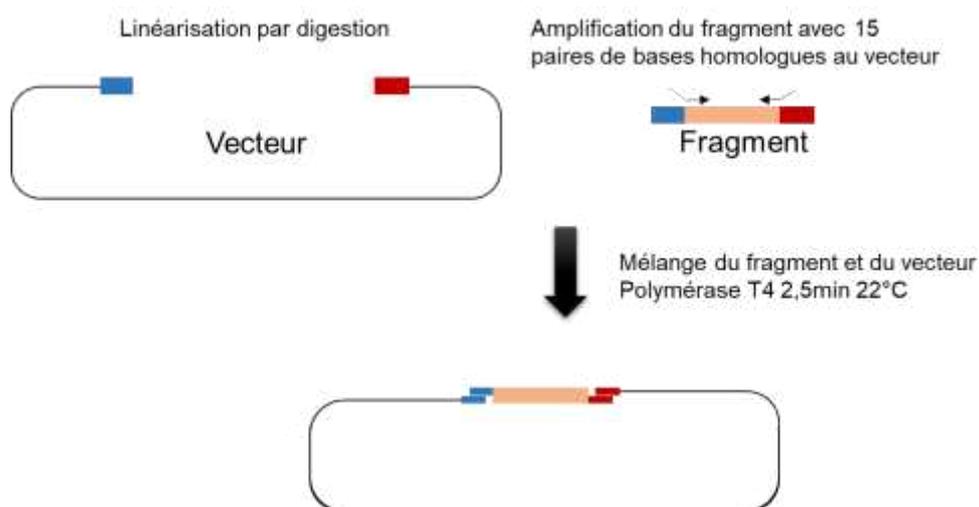


Figure 55. Schéma représentant le fonctionnement de la SLIC.

Adapté de (Jeong et al., 2012)

Les deux fragments ont été amplifiés avec la polymérase Q5 (NEB) avec les primers listés dans le **tableau 11**. Le plasmide a été extrait (Monarch Plasmid Miniprep Kit) puis digéré avec les enzymes NdeI (NEB) et BamHI (NEB). Le plasmide digéré a été incubé avec les deux fragments, en mettant trois fois plus d'inserts que de vecteur (ratio 1 :3 :3). L'incubation s'est faite en présence de la T4 polymérase (NEB), qui en absence de nucléotides a une activité d'exonucléase de 3' à 5'. Le mélange a été incubé à 22°C pendant 2min30 afin que la T4 polymérase hydrolyse les extrémités des fragments et du vecteur linéarisé. Le vecteur et les

fragments s'apparient puis le plasmide résultant a été transformé dans les cellules compétentes Top 10 (Invitrogen). Les clones ayant intégré le plasmide ont été sélectionnés sur boîte LB contenant de l'ampicilline (Amp) à une concentration de 50µg/mL.

Constructions génétiques

Toutes les constructions ont été réalisées par la méthode SLIC avec les primers listés dans le **tableau 11**.

- Délétion de *pdtB* et *pdtA* (*PaG30ΔpdtB* et *PaG30ΔpdtA*).

La délétion de *pdtB* et *pdtA* a été réalisée par double recombinaison homologue (Hmelo et al., 2015). Deux fragments comprenant la région à déléter ont été clonés dans le plasmide suicide pEXG2 par SLIC. Le plasmide suicide pEXG2 contenant les deux fragments a été introduit dans les souches de *P. aeruginosa* par conjugaison tri parentale avec le plasmide « helper » pRK600 puis les clones ayant intégré le plasmide ont été sélectionnés sur boîte PIA Gm 200. Les clones résistants à la gentamicine ont été ensemencés sur une boîte LB sans NaCl supplémentée de 10% de sucrose afin de sélectionner uniquement les clones ayant excisé le plasmide lors de la deuxième recombinaison homologue. En effet, le plasmide inséré lors de la première recombinaison homologue contient le gène *sacB*. SacB convertit le saccharose en métabolites toxiques pour la bactérie. Cela permet de sélectionner uniquement celles qui ont excisé le plasmide lors de la deuxième recombinaison homologue (**Figure 56**).

Une PCR avec des primers situés en amont et en aval de la séquence délétée dans le génome de *P. aeruginosa* a permis de sélectionner les clones présentant la délétion après excision du plasmide.

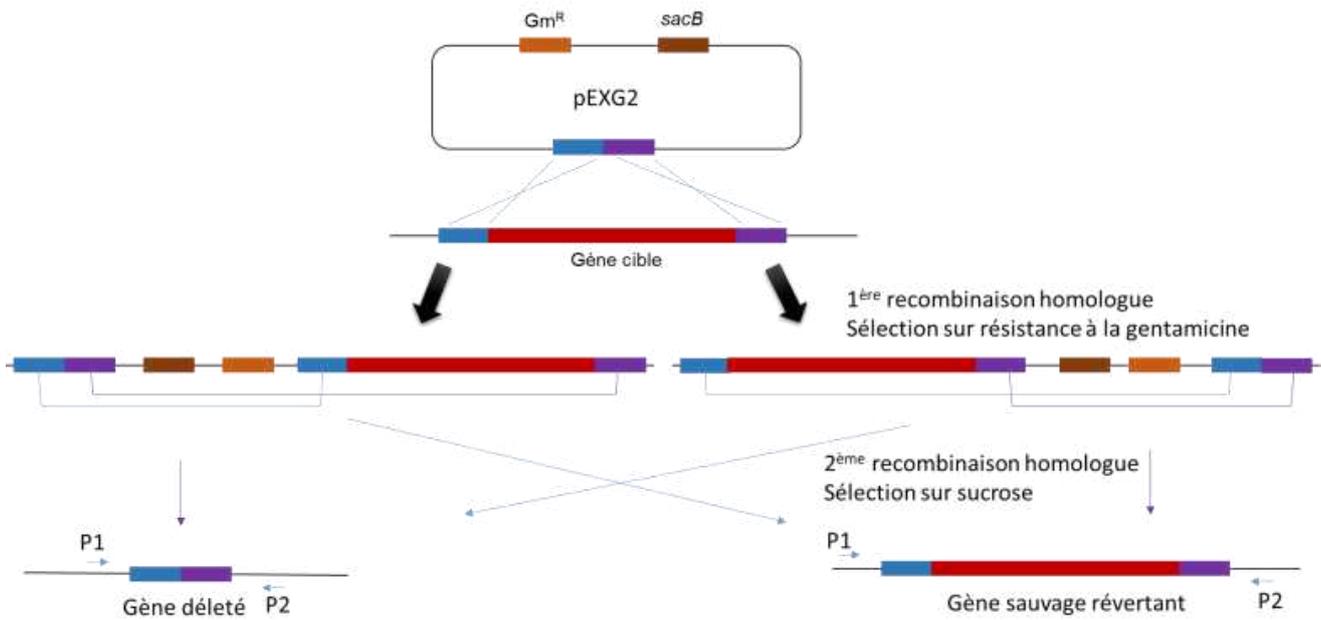


Figure 56. Principe de la délétion d'un gène par double recombinaison homologue. Les régions flanquantes ont été indiquées en bleu et violet. Les primers P1 et P2 indiqués permettent de déterminer si la souche obtenue possède le gène sauvage ou la délétion. Adapté de (Huang and Wilks, 2017).

➤ Complémentation de *pdtB*

Afin de s'assurer que le phénotype observé est bien dû à la délétion, la souche $\Delta pdtB$ a été complétement. Le gène *pdtB*, ainsi que 55 paires de bases en amont de la séquence codante afin de conserver son site RBS, ont été amplifiés avec la polymérase Q5 et les primers indiqués dans le **tableau 11**. Le produit de PCR a ensuite été cloné par SLIC dans le plasmide pSW196 digéré par EcoRI (NEB) et SpeI (NEB). Le plasmide résultant a été transformé dans les cellules compétentes Top 10 puis intégré dans le génome des souches délétées de *pdtB* par conjugaison tri parentale avec le plasmide « helper » pRK600. La sélection des clones ayant intégré le plasmide a été faite sur boîte LB complétement d'irgasan 10µg/mL et de 75µg/mL de tétracycline (Tc). L'irgasan est un antibiotique sélectif de *P. aeruginosa*, présent dans le milieu sélectif PIA.

Nom	Séquence 5' → 3'
PdtA451-6HisNdeI	ata CATATG caccatcaccatcaccatctgtcgcgggtggagatcga
PdtA1046stopXhoI	gtg CTCGAG ttaagccgcgacctgcggc
PdtACTDF1 NdeI	TGGTGCCGCGCGGCAGC CATATG atgcctgctggtacggcga
PdtACTDR1	caatgacggccgattcc
PdtACTDF2	ggaatccggccgtcattg
PdtACTDR2 BamHI	GGCTTTGTTAGCAGCC GGATCC ttacaggatcaggttgccgc
sF1deltapdtB	GGTCGACTCTAGAGGATCCCCcgttcgtgtcaattgtgcgc
sR1deltapdtB	gacctgcaggtagaccacccc
sF2deltapdtB	ggggtggtctacctgcaggtc
sR2deltapdtB	ACCGAATTCGAGCTCGAGCCCcgctgcacgctgaaatgcag
pSWpdtBF	CCCGTTTTTTTTGGGCTAGC GAATTC cccgttttttgggctagcgaattc
pSWpdtBR	CGGTGGCGGCCGCTCTAGA ACTAGT tcagaagctcgctgcacgc
sF1pEXG2mutpdtA	GGTCGACTCTAGAGGATCCCCtctcccgcgcgctttacg
sR1pEXG2mutpdtA	ACCGAATTCGAGCTCGAGCCCcgctgtcggcgggtctgc
Pa30deltapdtAF1	GGTACCGAATTCGAGCTCGAGCCCccaacgtctcggcagccat
Pa30deltapdtAR1	cttagagcggacggccgata
Pa30deltapdtAFLF2	tatcgccgctccgctctaag
Pa30deltapdtAFLR2	TGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCataccggtttcttgcgt

Tableau 11. Liste des primers.

Les séquences flanquantes au plasmide sont indiquées en majuscule. Les séquences des fragments homologues sont indiquées en rouge.

Nom	Objectif
pET15b-<i>pdta</i>^{CTD}	Suproduction du domaine PdtA ^{CTD}
pET30b-<i>pdta</i>^{NTD}	Suproduction du domaine PdtA ^{NTD}
pEXG2Δ<i>pdta</i>	Délétion de <i>pdta</i>
pEXG2Δ<i>pdtb</i>	Délétion de <i>pdtb</i>
pSW196-<i>pdtb</i>	Complémentation de <i>pdtb</i>
miniCTX PX2 <i>gfp</i>	Expression constitutive de GFP
miniCTX PX2 <i>mCherry</i>	Expression constitutive de mCherry

Tableau 12. Liste des plasmides.

Le nom des plasmides obtenus est indiqué ainsi que l'objectif de la construction.

Afin d'observer plus facilement les bactéries au microscope pour évaluer leur adhésion aux cellules eucaryotes et leur auto-agrégation, les souches *PaG30* et *PaG30Δpdta* exprimant constitutivement la GFP et la mCherry ont été construites.

Un plasmide intégratif miniCTX contenant la séquence codante pour la GFP ou mCherry sous le contrôle d'un promoteur constitutif pX2 (miniCTX PX*gfp* ou miniCTX PX2*mcherry*) a été intégré dans le génome des souches *PaG30*, *PaG30Δpdtb* et *PaG30Δpdta*, par conjugaison tri parentale en utilisant le plasmide « helper » prK600. Les clones ayant intégré le plasmide mini CTX ont été sélectionnés sur boîte PIA Tc 200 µg/mL.

Transformation dans BL21 DE3 et test d'expression

Les plasmides pET15b-*pdta*^{CTD} et pET30b-*pdta*^{NTD} ont été extraits des cellules de *E. coli* Top 10 (Invitrogen) et transformés dans les cellules compétentes BL21 DE3 (Invitrogen) adaptées à la surproduction des protéines. Les cellules possèdent le prophage lambda DE3, qui permet l'expression de l'ARN polymérase T7 contrôlé par un promoteur *lacUV5*. L'expression de l'ARN polymérase T7 peut donc être induite par ajout d'IPTG. Les bactéries ont été pré cultivées dans 2mL de LB contenant la concentration appropriée en Kan (pour pET30b) ou en Amp (pour pET15b), puis diluées à une DO₆₀₀ de 0,1 dans 30mL de LB avec l'antibiotique nécessaire. Lorsque les bactéries ont atteint une DO₆₀₀ de 0,6, l'IPTG est ajouté pour induire la production. Les bactéries ont été incubées après ajout de l'IPTG soit à 28°C soit à 37°C pendant 2 ou 4h. L'induction s'est faite avec soit 0,3mM soit 0,5mM d'IPTG. Une culture non induite a été utilisée comme contrôle négatif. Pour chaque condition, 1mL de culture a été centrifugé et le culot a été resuspendu dans 75µL d'eau ainsi que 25µL de tampon de charge concentré 4 fois. Les culots bactériens ont été déposés sur un gel d'acrylamide 12%, séparés par SDS-PAGE et colorés au bleu de Coomassie pour évaluer le niveau de production.

Induction de PdtA^{CTD} et PdtA^{NTD}

Les souches de *E. coli* contenant les plasmides pET15bPdtA^{CTD} et pET30bPdtA^{NTD} ont été inoculées dans 2mL de LB contenant de l'ampicilline 50µg/mL ou de la kanamycine 25µg/mL respectivement et incubées à 37°C et 300rpm toute la nuit. Le lendemain matin, les cultures ont été diluées à une DO₆₀₀ de 0,1 dans 2mL de LB avec l'antibiotique nécessaire et incubées dans les mêmes conditions. Quand les cultures ont atteint une DO₆₀₀ de 0,6, de l'IPTG a été ajouté afin d'avoir une concentration de 0,5mM dans la culture. Les cultures ont été incubées à 37°C pendant 4h après l'ajout de l'IPTG.

Test de solubilité des protéines produites

Les bactéries ont été cultivées et induites comme indiqué précédemment puis centrifugées pendant 15min à 6000rpm à 4°C (centrifugeuse eppendorf5424). Le culot a été repris dans 30mL de tampon de lyse (Tris 50mM, NaCl 100mM, glycérol 5%) avec 0,25mg/mL de lysozyme et 10µg/mL de DNase et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (PIC, Sigma) puis le mélange a été agité pendant 15min à température ambiante. Une sonication a été réalisée pendant 5min avec des pulsations de 10s et 10s de pause. Le culot et le lysat soluble ont été séparés par centrifugation à 6000rpm (centrifugeuse eppendorf 5424) pendant 15min. Les deux fractions ont été chargées sur un gel de polyacrylamide à 12% et séparées par SDS-PAGE et colorées avec du bleu de Coomassie.

Isolement des corps d'inclusion et solubilisation des fragments de protéines dans l'urée

Après 4h d'induction les cultures ont été centrifugées à 6000rpm pendant 15min et le culot a été resuspendu dans 15mL d'eau distillée puis congelé à -20°C. Le lendemain, 15mL de tampon de lyse a été ajouté (Tris 100mM, NaCl 400mM, glycérol 10%) ainsi que 0,25mg/mL de lysozyme, 10µg/mL de DNase et un cocktail d'inhibiteur de protéases (PIC, Sigma). Après sonication (5min, 10s de pulsation, 10s de pause) le culot et le surnageant soluble ont été séparés par centrifugation à 15 000 rpm (centrifugeuse Eppendorf 5810R) pendant 15min à 4°C. Le culot a été repris dans 1mL de tampon (Tris 50mM, NaCl 200mM, 5% glycérol, 1% Triton 100X) et érodé avec un piston. La solution a été complétée à 30mL de tampon et agitée 10min à 4°C. Après une centrifugation de 30min à 22 000g à 4°C, le culot a été lavé dans le même tampon puis centrifugé à nouveau pendant 30min à 22 000g à 4°C. Le culot a été solubilisé dans 700µL de tampon contenant 8M urée. Les extraits solubilisés ont été chargés

sur un gel de polyacrylamide à 12%, séparés par SDS-PAGE et le gel a été coloré au bleu de Coomassie.

Western blot

Les échantillons ont été chauffés à 100°C pendant 10min puis ont été chargés sur un gel de polyacrylamide à 12%. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE puis elles ont été transférées sur une membrane PVDF. Les sites non spécifiques ont été bloqués en incubant la membrane dans du PBS contenant 0,1% de Tween (PBSTween) et 5% de lait. Après trois lavages avec du PBSTween, la membrane a été incubée avec les anticorps primaires indiqués dans le **tableau 13** à la dilution indiquée. La membrane a été lavée à nouveau et incubée avec les anticorps secondaires anti IgG de lapin couplés à l'enzyme « horseradish peroxydase » (HRP) (Sigma) dilués au 20000^{ème}. La HRP a été révélée en incubant la membrane dans la solution Immobilion Crescendo Western HRP substrate (Merck). La HRP catalyse l'oxydation du substrat qui libère de la lumière. La chimiluminescence est mesurée avec le ChemiDoc (Biorad), montrant la présence de la HRP et donc de la protéine d'intérêt.

Anticorps	Hôte	Dilution	Origine
Anti-PdtA	Lapin	1/1000 ^{ème} (WB) 1/200 ^{ème} (IF) 1/4000 ^{ème} (ELISA)	Biotem
Anti-ExoU	Lapin	1/1000 ^{ème}	Sanofi
Anti-ExlA	Lapin	1/1000 ^{ème}	Biotem (Basso et al., 2017)
Anti-FliC	Lapin	1/1000 ^{ème}	Biotem
Anti-PilA	Lapin	1/1000 ^{ème}	Biotem
Sérum 1	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 2.1	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 2.2	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 3	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 4.1	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble

Sérum 4.2	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 5	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 6	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 7	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 8	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 9	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 10	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 11	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 12.1	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 12.2	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 13	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 14	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 15	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 16	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 17	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 18	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 193961	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble

Sérum 166342	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 173696	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 176449	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 177015	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 177519	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 177362	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 188041	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 180442	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 189821	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 198463	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 206325	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 207550	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 210424	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 221184	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Sérum 221341	Humain	1/50 ^{ème} (IF) 1/25 ^{ème} à 1/800 ^{ème} (ELISA)	CHU de Grenoble
Anti IgG lapin HRP	Chèvre	1/25 000 ^{ème}	Sigma
Anti IgG lapin Alexa488	Âne	1/1000 ^{ème}	Invitrogen (Molecular Probe)
Anti IgG humain HRP	Chèvre	1/25 000 ^{ème}	Sigma

Anti IgG humain Alexa488	Chèvre	1/1000 ^{ème}	Invitrogen (Molecular Probe)
---------------------------------	--------	-----------------------	---------------------------------

Tableau 13. Liste des anticorps utilisés et la concentration utilisée en fonction du type d'expérience.

Dot blot

Les bactéries ont été cultivées jusqu'à atteindre une DO_{600} de 0,8 à 1. Les cultures ont été centrifugées à 10 000rpm pendant 5min (minispin Eppendorf). Le culot a été resuspendu dans 120 μ L de tampon de lyse B-PER (Thermo Fisher) avec 0,1mg/mL de DNase, 0,1mg/mL de lysozyme et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (PIC, Sigma). La solution a été laissée 20min à température ambiante. Après une centrifugation à 12 000 rpm pendant 5min, 3 μ L de surnageant ont été déposés sur une membrane de nitrocellulose ainsi que 2 μ L de l'extrait de PdtA^{CTD} solubilisé dans l'urée et dilué 20 fois comme contrôle positif. La membrane a été incubée avec le No Stain Protein Labeling (Invitrogen) afin de marquer les protéines totales puis saturée avec du PBSTween contenant 5% de lait. Après trois lavages avec du PBSTween, la membrane a été incubée avec les anticorps anti-PdtA dilués au 1000^{ème} puis les anticorps secondaires anti-IgG de lapin couplés à HRP dilués au 25 000^{ème}. La présence de la HRP a été révélée comme indiqué précédemment (I.1 ; b).

Séquençage des souches cliniques

L'ADN génomique des souches cliniques de *P. aeruginosa* a été extrait. Les bactéries ont été cultivées en milieu LB jusqu'à atteindre une DO_{600} de 1. Les bactéries ont été lysées puis les protéines ont été éliminées par extraction au phénol-chloroforme. L'ADN extrait a été précipité avec de l'éthanol puis resuspendu dans 100 μ L d'eau. Les échantillons ont été confiés à Genewiz qui a réalisé le séquençage génomique.

Arbre phylogénétique

L'arbre phylogénétique a été réalisé avec les outils disponibles sur PATRIC (Bioinformatics Resource Centers) ((Wattam et al., 2017), <https://www.bv-brc.org/>). 200 génomes de *P. aeruginosa* ont été inclus, dont les 10 souches cliniques que nous avons fait séquencer ainsi que les souches de référence PAO1, PA14 et PA7. Les autres génomes proviennent de la base de données de PATRIC et ont été choisis arbitrairement. L'arbre a été annoté sur iTol ((Letunic and Bork, 2021), <https://itol.embl.de/>).

Induction du SST3

Pour vérifier la présence des toxines spécifiques à chaque clade, un western blot a été réalisé avec des anticorps anti-ExoU et anti-ExlA indiqués dans le **tableau 13**. Les souches ont été cultivées en LB à 37°C et 300rpm toute la nuit. Pour induire le système de sécrétion de type III, 5mM d'EGTA et 20mM de MgCl₂ ont été ajoutés à 2mL de LB. Les bactéries ont été diluées dans ce milieu à une DO₆₀₀ de 0,05. A une DO₆₀₀ de 1, 300µL de culture a été centrifugé à 12 000 rpm (minispin Eppendorf) pendant 5min et le surnageant a été chargé sur un gel à 12% de polyacrylamide. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et un western blot a été réalisé avec les anticorps anti-ExoU. Pour tester la sécrétion d'ExlA, les souches ont été pré-cultivées de la même manière et diluées à une DO₆₀₀ de 0,05 dans 2mL de LB le lendemain matin. Lorsque les bactéries ont atteint une DO₆₀₀ de 1, 1mL de culture a été centrifugé pendant 5min à 12 000 rpm (mini spin eppendorf) et le surnageant a été analysé par western blot en utilisant les anticorps dirigés contre ExlA.

Une PCR avec des primers spécifiques a été réalisée afin de détecter la présence du gène *exoS*. Les bactéries ont été pré cultivées dans 2mL de LB et incubées à 37°C et 300rpm toute la nuit. Cette culture a été utilisée comme matrice pour la PCR. 2.5µL de culture ont été ajoutés au Master Mix GoTaq (Promega) ainsi que les primers spécifiques à *exoS*. La PCR a été réalisée dans un thermocycleur (Biorad) avec le programme adapté et les échantillons ont été analysés sur un gel d'agarose à 1% contenant du Sybersafe (Invitrogen).

Test de cytotoxicité

La cytotoxicité des bactéries a été évaluée par la mesure de l'incorporation d'iodure de propidium (IP) dans les cellules mortes.

Les cellules eucaryotes A549 et J774 ont été cultivées dans du DMEM (Gibco) contenant 10% de SVF (Gibco). Deux jours avant l'expérience, 25 000 cellules pour les A549 et 50 000 cellules pour les J774 ont étéensemencées dans une plaque 96 puits à fond noir (Thermo Fisher) pour avoir des cellules confluentes le jour de l'expérience. Les bactéries ont été inoculées dans du LB et cultivées toute la nuit à 37°C. Après dilution à une DO₆₀₀ de 0,1 elles ont été cultivées à nouveau jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 1. Une heure avant d'ajouter les bactéries, le milieu des cellules a été changé par du DMEM sans rouge de phénol contenant 10% de SFV ainsi que de l'iodure de propidium (IP) dilué au 1000^{ème}. Les bactéries ont ensuite été ajoutées sur les cellules à la multiplicité d'infection ou Multiplicity of Infection (MOI) indiquée. La cytotoxicité a été suivie par mesure de la fluorescence de l'IP avec le Fluoroskan

Ascent FL2.5 Microplate Fluorometer (Thermo Corporation) (excitation 544nm/ émission 590nm).

Test de swimming et de twitching

Les milieux adaptés aux tests de swimming et twitching ont été préparés comme indiqué dans le **tableau 14**.

Swimming	Twitching
10g/l Tryptone (Difco)	10g/l Tryptone (Difco)
0,3% Agarose (Bacto Agar Difco)	1% Agarose (Bacto Agar Difco)
5g/L NaCl	10g/L NaCl
	5g/L Yeast Extract (Difco)

Tableau 14. Composition des milieux pour les tests de « swimming » et de « twitching ».

Les bactéries ont étéensemencées la veille sur boîte LB et incubées à 37°C. Pour le swimming, une colonie isolée a étéensemencée au milieu de la gélose et les bactéries ont été incubées à 37°C pendant 24h. Pour le twitching, une colonie isolée a étéensemencée au fond de la boîte, entre la gélose et le plastique. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 48h. La gélose a été retirée puis le fond de la boîte a été coloré avec du bleu de Coomassie pendant 10min avant d'être rincé à l'eau distillée pour marquer la zone de twitching.

Production de PdtA au cours de la croissance de *P. aeruginosa*

Les souches ont été inoculées dans 2mL de LB et incubées à 37°C et 300rpm toute la nuit. Le lendemain, elles ont été diluées à une DO_{600} de 0,01 dans 30mL de LB et incubées à 37°C et 300rpm. La mesure de la densité optique a été prise tout au long de la croissance, avec des points plus rapprochés pendant la phase exponentielle (environ toutes les 20min). L'expérience a été arrêtée lorsqu'un plateau a été atteint. Des prélèvements ont été faits lors de ces mesures et mis à -20°C immédiatement. A la fin de la croissance, les prélèvements ont été centrifugés à 12 000 rpm pendant 5min et les culots ont été resuspendus dans un volume d'eau adapté afin de normaliser le nombre de bactéries en fonction de la densité optique, pour avoir une quantité de protéines équivalente dans tous les prélèvements. 3µL de chaque prélèvement normalisé a été déposé sur une membrane de nitrocellulose ainsi que l'extrait de PdtA^{CTD} comme contrôle positif. Les protéines totales ont été marquées avec No Stain labelling protein (Invitrogen) et un dot blot a été réalisé avec les anticorps anti-PdtA.

Analyses bioinformatiques

Les séquences protéiques de Pila ont été obtenues sur la base de données de *Pseudomonas* (The pseudomonas genome database, Winsor et al 2011)

Les séquences correspondantes aux régions promotrices de *pdtA*, de *vrel* et de *phoB* ont été identifiées dans les différentes souches, puis un alignement des séquences a été réalisé sur Galaxy (<https://usegalaxy.eu/>) avec l'outil MAFFT. Les SNP ont été détectés et une matrice a été construite avec les outils Find SNP sites et SNP distance matrix. Un arbre phylogénétique a été construit à partir de cet alignement sur Galaxy avec l'outil FASTTREE et annoté sur iTol (<https://itol.embl.de/>).

Les séquences de *pdtA* dans les différentes souches cliniques ont été identifiées par blast sur Galaxy et un alignement multiple a été obtenu avec l'outil MAFFT. Un arbre phylogénétique a été construit à partir de cet alignement sur Galaxy avec l'outil FASTTREE et annoté sur iTol.

Microscopie électronique

Les bactéries ont été cultivées en milieu LB jusqu'à une DO_{600} de 0,8, puis 1mL de culture a été fixé avec 0,5% de PFA à 4°C pendant 20min en suspension. Les bactéries ont été lavées trois fois avec du PBS et resuspendues dans 50µL de PBS.

Les échantillons ont ensuite été confiés à la plateforme de microscopie électronique. 10 µL ont été ajoutés à une grille de décharge lumineuse recouverte d'un film de support en carbone pendant 3 minutes et la grille a été colorée avec 50 µL d'acétate d'uranyle pendant 2 minutes. L'excès de solution a été absorbé par un papier filtre et la grille a été séchée à l'air. Les images ont été prises dans des conditions de faible dose ($<10 e^{-}/\text{Å}^2$) avec des valeurs de défocalisation entre 1,2 et 2,5 µm sur un microscope électronique Tecnai 12 LaB6 à une tension d'accélération de 120 kV en utilisant la caméra CCD Gatan Orius 1000.

Déplétion des sérums de patients

Les sérums de patients ayant contracté une infection chronique à *P. aeruginosa* ont plusieurs anticorps dirigés contre différentes protéines de *P. aeruginosa*. Afin d'éliminer tous les anticorps qui reconnaissent des protéines de la souche PaG30 autres que PdtA, les sérums de patients ont été déplétés sur la souche PaG30Δ*pdtA*. Pour cela la souche PaG30Δ*pdtA* a été cultivée en milieu LB jusqu'à une DO_{600} de 0,8. L'extrait bactérien a été préparé comme décrit précédemment (1.2) et a été chargé sur un gel de polyacrylamide 12% et séparé par SDS-PAGE. Après un transfert sur une membrane PVDF, les sites non spécifiques ont été

bloqués dans une solution de PBSTween contenant 5% de lait. Après trois lavages dans une solution de PBSTween, les sérums de patients dilués au 50^{ème} dans une solution de PBS contenant 0,5% de BSA ont été ajoutés et la membrane a été incubée pendant 1h afin de fixer tous les anticorps autres que ceux reconnaissant PdtA sur la membrane. La déplétion a été réalisée ainsi trois fois. L'efficacité de la déplétion a été vérifiée en réalisant une expérience d'immunofluorescence sur la souche *PaG30ΔpdtA* utilisée comme contrôle négatif.

Immunofluorescence

Les bactéries ont été cultivées comme indiqué précédemment en milieu LB jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 0,8 puis elles ont été fixées en suspension avec 0,5% de paraformaldéhyde (PFA) à 4°C toute la nuit. Le lendemain, elles ont été lavées avec du PBS puis les sites non spécifiques ont été saturés en suspension dans une solution de BSA à 0,5% diluée dans du PBS. Les anticorps primaires anti-PdtA dilués à 1/200^{ème}, ou 50µL de sérum de patient déplété (dilué au 1/200^{ème} dans la solution de PBS/BSA 0,5%), ont été ajoutés et laissés pendant 30min à température ambiante. Après trois lavages avec du PBS, les anticorps secondaires anti-IgG lapin ou anti-IgG humains couplés au fluorophore Alexa 488 (Invitrogen) à 1/1000^{ème} ont été ajoutés, ainsi que du Hoechst Vital (Sigma) dilués à 1/1000^{ème} pour marquer l'ADN bactérien. Les bactéries ont été lavées à nouveau dans du PBS et resuspendues dans 50µL de PBS contenant 0,5% de BSA. Un montage sur Labteck avec un bloc d'agarose à 1% a été réalisé et les bactéries ont été observées avec le microscope confocal spinning disk M4D (S-M4D ; Olympus GATACA et Andor) avec l'objectif 100X. Les acquisitions ont été faites avec Metamorph et le montage d'images avec Imaris.

Test d'adhésion aux cellules eucaryotes

Les cellules A549 ont été cultivées en milieu DMEM (Gibco) contenant 10% de SVF (Gibco). Les bactéries ont été cultivées dans du LB jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 1. Avant l'infection, les cellules ont été décollées avec de la trypsine puis centrifugées à 500g pendant 5min. Elles ont été resuspendues en milieu DMEM 10%SVF et comptées. 500 000 cellules ont été mises dans un tube Eppendorf et infectées à une MOI de 10 (5 000 000 bactéries). La suspension cellulaire a été agitée à 37°C, en présence de 5% de CO₂, pendant 1h. La suspension a été filtrée par centrifugation à travers un puit transwell de 3µm, qui laisse passer les bactéries mesurant 1 à 2µm mais pas les cellules eucaryotes. L'inoculum utilisé pour l'infection et la solution après filtration ont été dilués en série dans une plaque 96 puits, avec un facteur de dilution de 10 jusqu'à une dilution de 10⁻⁷. 10µL de chaque dilution ont été déposés en triplicats sur une boîte LB et les bactéries ont été incubées à 37°C toute la nuit. Le nombre de Colony

Forming Units (CFU) a été mesuré le lendemain. Le nombre de colonies formées à chaque dilution a été compté, et la moyenne donne le nombre de bactéries présentes dans les 10 μ L déposés sur la boîte.

Pour la visualisation par microscopie, 150 000 cellules A549 ont étéensemencées dans un Labtek 2 puits. Les bactéries ont été cultivées en milieu LB jusqu'à une DO₆₀₀ de 1. Les cellules ont été infectées avec 1 500 000 bactéries, ce qui correspond à une MOI de 10 et incubées à 37°C et 5% de CO₂ pendant 4h. Le milieu a été retiré et les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS afin d'éliminer les bactéries non adhérentes. Des images ont été prises avant et après lavages avec le microscope optique droit à fluorescence Zeiss Axioplan avec l'objectif 60X.

Préparation du milieu SCFM2

Le milieu SCFM2 qui mime la muqueuse des poumons des patients atteints de la mucoviscidose a été préparé d'après le protocole décrit par Turner et al ((Turner et al., 2015).

Une base tamponnée a été préparée en ajoutant les sels et le tampon MOPS, puis les acides aminés aux concentrations indiquées dans le **tableau 15**. Le pH a été ajusté à 6,8. L'ADN de sperme de saumon a été ajouté (1,2g pour 2L de volume final). Le DOPC a été ajouté au fond d'un bécher et laissé évaporer pour tapisser le bécher. La base tamponnée contenant l'ADN a été ajoutée au bécher contenant le DOPC. L'acide lactique, le N-acétylglucosamine, le chlorure de calcium, le chlorure de magnésium et le sulfate de fer ont été ajoutés. La solution a été filtrée à 0,22 μ m puis conservée à -20°C.

Nom	Concentration finale (mM)
NaH ₂ PO ₄	1,3
Na ₂ HPO ₄	1,25
KNO ₃	0,348
K ₂ SO ₄	0,271
NH ₄ Cl	2,281
KCl	14,943
NaCl	51,848
MOPS	10
Ser	1,446
Glu * HCl	1,549

Pro	1,661
Gly	1,203
Ala	1,78
Val	1,117
Met	0,633
Ile	1,121
Leu	1,609
Orn * HCl	0,676
Lys * HCl	2,128
Arg * HCl	0,306
Asp	0,827
Trp	0,013
Tyr	0,802
Thr	1,072
Cys * HCl	0,16
Phe	0,53
His * HCl * H ₂ O	0,519
ADN de sperme de saumon	0,6 g/L
Dextrose (D-glucose)	3
Acide lactique L	9,3
CaCl ₂ * 2H ₂ O	1,754
MgCl ₂ * 6H ₂ O	0,606
N-acétylglucosamine	0,3
FeSO ₄ * 7H ₂ O	0,0036
1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC)	100 µg/mL

Tableau 15. Liste des produits utilisés pour le milieu SCFM2 et leur concentration. Les noms complets des acides aminés sont indiqués dans le tableau 1 (liste des abréviations).

Visualisation microscopique des agrégats

Les souches *PaG30gfp*, *PaG30mcherry* et *PaG30Δpdtamcherry* ont été cultivées dans 2mL de LB ou de milieu SCFM2 à 37°C et 300rpm toute la nuit. Le lendemain, les bactéries ont été diluées à une DO₆₀₀ de 0,05 et incubées à nouveau jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 0,8. 5µL de culture ont été placés entre lame et lamelle et les différents échantillons ont été observés

au microscope confocal M4D (S-M4D ; Olympus GATACA et Andor). Les acquisitions ont été réalisées avec le logiciel Metamorph et les traitements d'image avec Imaris.

Quantification des agrégats

Les bactéries ont été pré cultivées dans 2mL de LB ou de milieu SCFM2 puis diluées à une DO_{600} de 0,05 et incubées à 37°C avec une agitation de 300rpm dans 2mL de milieu LB ou SCFM2. A une DO_{600} de 1, 1mL de la culture a été filtré à travers un transwell de 3 μ m, qui ne laisse passer que les bactéries planctoniques, sans les agrégats, plus grands que 3 μ m. L'autre partie de la culture a été soumise à un vortex pendant 30s afin de séparer les agrégats pour quantifier le nombre de bactéries initiales. Les mesures de CFUs du surnageant et celles de la culture initiale ont été réalisées en triplicats comme décrit précédemment (III.2). Le ratio entre le nombre de bactéries présentes après la filtration sur celui du nombre de bactéries présentes initialement dans la culture permet de calculer le pourcentage de bactéries agrégées. Les graphiques ont été réalisés sur GraphPad. Une analyse de la variance (ANOVA) ainsi qu'une comparaison deux à deux a été réalisée pour comparer le pourcentage d'agrégats dans les différentes souches cultivées en LB. Un test non apparié de Student a été réalisé pour comparer le nombre d'agrégats dans la souche sauvage et dans la souche $\Delta pdtA$ cultivée en milieu SCFM2.

Dynamic Light Scattering (DSL)

Afin de confirmer le phénotype d'auto-agrégation et de connaître la taille des agrégats, les cultures des souches *PaG30* et *PaG30 $\Delta pdtA$* ont été analysées par DLS. La diffusion de la lumière dépend de la taille et de la forme des macromolécules rencontrées, ainsi que de la température et de la viscosité du milieu. La température est fixée à 25°C pendant les mesures et la viscosité du milieu est connue. Les bactéries ont été cultivées de la même manière que pour la quantification des agrégats par CFUs. A une DO_{600} de 1, 40 μ L de culture a été transféré dans une microcuvette UV puis analysé par DLS par le Dynapro Nanostar. Les mesures ont été prises avec le logiciel DYNAMICS, qui analyse les données. Les courbes ont été tracées par le logiciel.

Quantification du biofilm à la surface air-liquide

Après une pré culture des souches à 37°C et 300 rpm dans 2mL de LB, les cultures ont été diluées à une DO_{600} de 0,05 ou 0,1 et cultivées dans 1mL de LB ou de SCFM2 respectivement, dans une plaque 24 puits en 5 ou 6 répliques. Les bactéries ont été incubées à 37°C sans agitation pendant 24h. La culture a été délicatement retirée et le fond de la boîte a été coloré

par cristal violet 0,01% pendant 10min à température ambiante pour marquer le biofilm éventuel. Le colorant a été retiré et 1mL d'eau stérile a été ajouté délicatement puis retiré pour laver les parois. Le colorant a ensuite été dissout dans 1mL d'acide acétique à 30% et l'absorbance à 550nm a été mesurée avec un spectrophotomètre. Les graphiques ont été réalisés sur GraphPad. Un test non apparié de Student a été réalisé sur GraphPad.

RNAseq

Les bactéries ont été cultivées en milieu LB ou SCFM2 jusqu'à atteindre une DO_{600} de 1. Les bactéries agrégées ont été séparées des bactéries non agrégées dans la souche sauvage en les filtrant avec un filtre de $3\mu\text{m}$ (transwell, Greiner). L'ARN a été extrait au phénol chloroforme puis l'ARN ribosomique a été déplété avec le kit RiboMinus Bacteria 2.0 (Invitrogen). Une librairie a été construite avec le kit Colibri (Invitrogen). Les échantillons ont été séquencés par MGX Montpellier avec Illumina.

Les données ont été analysées sur Galaxy (<https://usegalaxy.eu/>). Les données ont d'abord été traitées avec l'outil Trimmomatic, puis les « reads » ont été alignés sur le génome de *PaG30* avec l'outil Bowtie2. Le nombre de chaque « reads » a été calculé grâce à htseq-count puis les gènes exprimés différemment entre deux conditions ont été identifiés et répertoriés dans un tableau avec l'outil DESeq2. Les volcano plots ont été construits sur Graphpad à partir des données obtenues avec DESeq2.

Dosage de protéines par BCA

Une gamme étalon avec des concentrations en BSA allant de 0 à 100mg a été réalisée. La gamme et les échantillons ont été dosés avec le kit Micro BCA Protein Assay (Thermofisher) en triplicats et l'absorbance à 560nm a été mesurée avec un spectrophotomètre (Safas). Les concentrations en protéines totales des échantillons ont été déterminées grâce à la courbe étalon.

ELISA

Une plaque 96 puits à haute adsorption de protéine (Nunc Maxisorp) a été recouverte des antigènes PdtA^{CTD}, PdtA^{NTD} ou Pbp2 à différentes concentrations, diluées en tampon carbonate pH 9.6 (0,795g de Na_2CO_3 , 1,465g de NaHCO_3 et 500mL d'eau ajusté à un pH de 9,6). La plus haute concentration testée est de $10\mu\text{g/mL}$. Les protéines ont été ensuite diluées en série avec un facteur de dilution de 4 jusqu'à une dilution de 128. La plaque a été laissée à 4°C toute la nuit pour que les protéines s'adsorbent à la paroi des puits. Le lendemain, les puits

ont été lavés par 4 cycles de lavages réalisés par le laveur de plaque ThermoScientific Wellwash avec du PBSTween 0,05%. Une saturation avec une solution de PBS contenant 1% de BSA a été réalisée pendant 2h à température ambiante, avec une agitation de 500rpm. Les puits ont été lavés avec PBSTween 0,05%, 4 fois, puis l'anticorps primaire anti-PdtA dilué à 1/4000^{ème} dans une solution de PBS/BSA 1% a été ajouté et laissé incubé pendant 1h30 à température ambiante avec une agitation de 500rpm. 4 cycles de lavages ont été réalisés. Les anticorps secondaires anti-IgG de lapin couplés à la HRP dilués à 1/5000^{ème} dans une solution de PBS/BSA 1% ont été incubés à température ambiante avec une agitation de 500rpm pendant 1h30. 4 cycles de lavages ont été réalisés, puis un substrat révélateur de la HRP, le 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) a été ajouté et incubé pendant 13min dans le noir avec une agitation de 500rpm. Une solution STOP reagent (Sigma Aldrich) a été ajoutée pour arrêter la réaction et l'absorbance des puits a été mesurée à 490nm au spectrophotomètre (Safas MP96).

Pour le criblage des sérums de patients, une plaque p96 Nunc Maxisorp a été recouverte de 10µg/mL de protéines PdtA^{NTD} ou PdtA^{CTD} et l'ELISA a été réalisé comme décrit ci-dessus, en utilisant comme anticorps les sérums des patients dilués à 1/25^{ème} dans une solution de PBS/BSA 1%, et comme anticorps secondaires des anticorps anti-IgG humaines couplés à la HRP dilués à 1/5000^{ème} dans une solution de PBS/BSA 1%.

Pour contrôler la spécificité des anticorps, un ELISA a été réalisé en utilisant PdtA^{CTD} et Pbp2 comme contrôle négatif avec les sérums de patients ayant contracté une infection à *P. aeruginosa*. Un sérum de patient non infecté a également été utilisé comme contrôle négatif. Afin de mettre en évidence un effet-dose, les sérums ont été dilués en série avec un facteur de dilution de 2, de 1/25^{ème} à 1/800^{ème}.

Bibliographie

- Abdelhamid, A.G., Yousef, A.E., 2023. Combating Bacterial Biofilms: Current and Emerging Antibiofilm Strategies for Treating Persistent Infections. *Antibiotics* 12, 1005. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12061005>
- Abdel-Nour, M., Duncan, C., Prashar, A., Rao, C., Ginevra, C., Jarraud, S., Low, D.E., Ensminger, A.W., Terebiznik, M.R., Guyard, C., 2014. The Legionella pneumophila collagen-like protein mediates sedimentation, autoaggregation, and pathogen-phagocyte interactions. *Appl Environ Microbiol* 80, 1441–1454. <https://doi.org/10.1128/AEM.03254-13>
- Adams, David.W., Stutzmann, S., Stoudmann, C., Blokesch, M., 2019. DNA-uptake pili of *Vibrio cholerae* are required for chitin colonization and capable of kin recognition via sequence-specific self-interaction. *Nat Microbiol* 4, 1545–1557. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0479-5>
- Ageorges, V., Schiavone, M., Jubelin, G., Caccia, N., Ruiz, P., Chafsey, I., Bailly, X., Dague, E., Leroy, S., Paxman, J., Heras, B., Chaucheyras-Durand, F., Rossiter, A.E., Henderson, I.R., Desvaux, M., 2019. Differential homotypic and heterotypic interactions of antigen 43 (Ag43) variants in autotransporter-mediated bacterial autoaggregation. *Sci Rep* 9, 11100. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47608-4>
- Alhede, M., Kragh, K.N., Qvortrup, K., Allesen-Holm, M., van Gennip, M., Christensen, L.D., Jensen, P.Ø., Nielsen, A.K., Parsek, M., Wozniak, D., Molin, S., Tolker-Nielsen, T., Høiby, N., Givskov, M., Bjarnsholt, T., 2011. Phenotypes of Non-Attached *Pseudomonas aeruginosa* Aggregates Resemble Surface Attached Biofilm. *PLoS ONE* 6, e27943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027943>
- Alhede, M., Lorenz, M., Fritz, B.G., Jensen, P.Ø., Ring, H.C., Bay, L., Bjarnsholt, T., 2020. Bacterial aggregate size determines phagocytosis efficiency of polymorphonuclear leukocytes. *Med Microbiol Immunol* 209, 669–680. <https://doi.org/10.1007/s00430-020-00691-1>
- Allen, J.P., Hauser, A.R., 2019. Diversity of Contact-Dependent Growth Inhibition Systems of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 201. <https://doi.org/10.1128/JB.00776-18>
- Allen, P., Borick, Joseph, Borick, Jamie, 2020. Acute and Chronic Infection Management in CF, in: Lewis, MD, FAAFP, D. (Ed.), *Cystic Fibrosis in Primary Care*. Springer International Publishing, Cham, pp. 69–87. https://doi.org/10.1007/978-3-030-25909-9_8
- Allsopp, L.P., Wood, T.E., Howard, S.A., Maggiorelli, F., Nolan, L.M., Wettstadt, S., Filloux, A., 2017. RsmA and AmrZ orchestrate the assembly of all three type VI secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, 7707–7712. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700286114>
- Andersen, J.B., Hultqvist, L.D., Jansen, C.U. *et al.* Identification of small molecules that interfere with c-di-GMP signaling and induce dispersal of *Pseudomonas*

aeruginosa biofilms. *npj Biofilms Microbiomes* 7, 59 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00225-4>

Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 399, 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

Aoki, S.K., Malinverni, J.C., Jacoby, K., Thomas, B., Pamma, R., Trinh, B.N., Remers, S., Webb, J., Braaten, B.A., Silhavy, T.J., Low, D.A., 2008. Contact-dependent growth inhibition requires the essential outer membrane protein BamA (YaeT) as the receptor and the inner membrane transport protein AcrB. *Mol Microbiol* 70, 323–340. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06404.x>

Aoki, S.K., Pamma, R., Hernday, A.D., Bickham, J.E., Braaten, B.A., Low, D.A., 2005. Contact-Dependent Inhibition of Growth in *Escherichia coli*. *Science* 309, 1245–1248. <https://doi.org/10.1126/science.1115109>

Arenas, J., Nijland, R., Rodriguez, F.J., Bosma, T.N.P., Tommassen, J., 2013. Involvement of three meningococcal surface-exposed proteins, the heparin-binding protein NhbA, the α -peptide of IgA protease and the autotransporter protease NalP, in initiation of biofilm formation: NalP regulates biofilm formation. *Molecular Microbiology* 87, 254–268. <https://doi.org/10.1111/mmi.12097>

Asma, S.T., Imre, K., Morar, A., Herman, V., Acaroz, U., Mukhtar, H., Arslan-Acaroz, D., Shah, S.R.A., Gerlach, R., 2022. An Overview of Biofilm Formation–Combating Strategies and Mechanisms of Action of Antibiofilm Agents. *Life* 12, 1110. <https://doi.org/10.3390/life12081110>

Augustine, N., Kumar, P., Thomas, S., 2010. Inhibition of *Vibrio cholerae* biofilm by AiiA enzyme produced from *Bacillus* spp. *Arch Microbiol* 192, 1019–1022. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0633-1>

Azimi, S., Thomas, J., Cleland, S.E., Curtis, J.E., Goldberg, J.B., Diggle, S.P., 2021. O-Specific Antigen-Dependent Surface Hydrophobicity Mediates Aggregate Assembly Type in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 12, e00860-21. <https://doi.org/10.1128/mBio.00860-21>

Baek, M., DiMaio, F., Anishchenko, I., Dauparas, J., Ovchinnikov, S., Lee, G.R., Wang, J., Cong, Q., Kinch, L.N., Schaeffer, R.D., Millán, C., Park, H., Adams, C., Glassman, C.R., DeGiovanni, A., Pereira, J.H., Rodrigues, A.V., van Dijk, A.A., Ebrecht, A.C., Opperman, D.J., Sagmeister, T., Buhlheller, C., Pavkov-Keller, T., Rathinaswamy, M.K., Dalwadi, U., Yip, C.K., Burke, J.E., Garcia, K.C., Grishin, N.V., Adams, P.D., Read, R.J., Baker, D., 2021. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science* 373, 871–876. <https://doi.org/10.1126/science.abj8754>

- Ball, G., Durand, É., Lazdunski, A., Filloux, A., 2002. A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*: A second type II secretion system in *P. aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 43, 475–485. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02759.x>
- Basso, Pauline, Ragno, M., Elsen, S., Reboud, E., Golovkine, G., Bouillot, S., Huber, P., Lory, S., Faudry, E., Attrée, I., 2017. *Pseudomonas aeruginosa* Pore-Forming Exolysin and Type IV Pili Cooperate To Induce Host Cell Lysis. *mBio* 8, e02250-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.02250-16>
- Basso, P., Ragno, M., Elsen, S., Reboud, E., Golovkine, G., Bouillot, S., Huber, P., Lory, S., Faudry, E., Attree, I., 2017. *Pseudomonas aeruginosa* Pore-Forming Exolysin and Type IV Pili Cooperate To Induce Host Cell Lysis. *mBio* 8. <https://doi.org/10.1128/mBio.02250-16>
- Baud, C., Hodak, H., Willery, E., Drobecq, H., Loch, C., Jamin, M., Jacob-Dubuisson, F., 2009. Role of DegP for two-partner secretion in *Bordetella*. *Mol Microbiol* 74, 315–329. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06860.x>
- Bay, L., Kragh, K.N., Eickhardt, S.R., Poulsen, S.S., Gjerdrum, L.M.R., Ghathian, K., Calum, H., Ågren, M.S., Bjarnsholt, T., 2018. Bacterial Aggregates Establish at the Edges of Acute Epidermal Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 7, 105–113. <https://doi.org/10.1089/wound.2017.0770>
- Béchon, N., Jiménez-Fernández, A., Witwinowski, J., Bierque, E., Taib, N., Cokelaer, T., Ma, L., Ghigo, J.-M., Gribaldo, S., Beloin, C., 2020. Autotransporters Drive Biofilm Formation and Autoaggregation in the Diderm Firmicute *Veillonella parvula*. *J Bacteriol* 202, e00461-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00461-20>
- Berg, H.C., 2003. The Rotary Motor of Bacterial Flagella. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 19–54. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161737>
- Bernal-Bayard, J., Thiebaud, J., Brossaud, M., Beaussart, A., Caillet, C., Waldvogel, Y., Travier, L., Létoffé, S., Fontaine, T., Rokbi, B., Talaga, P., Beloin, C., Mistretta, N., Duval, J.F.L., Ghigo, J.-M., 2023. Bacterial capsular polysaccharides with antibiofilm activity share common biophysical and electrokinetic properties. *Nat Commun* 14, 2553. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37925-8>
- Berry, A., Han, K., Trouillon, J., Robert-Genthon, M., Ragno, M., Lory, S., Attrée, I., Elsen, S., 2018. cAMP and Vfr Control Exolysin Expression and Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* Taxonomic Outliers. *J Bacteriol* 200. <https://doi.org/10.1128/JB.00135-18>
- Bertrand, Q., Job, V., Maillard, A.P., Imbert, L., Teulon, J.M., Favier, A., Pellequer, J.L., Huber, P., Attree, I., Dessen, A., 2020. Exolysin (ExlA) from *Pseudomonas aeruginosa* Punctures Holes into Target Membranes Using a Molten Globule Domain. *Journal of molecular biology* 432, 4466–4480. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.05.025>

- Bible, A. N., Stephens, B. B., Ortega, D. R., Xie, Z., & Alexandre, G. (2008). Function of a chemotaxis-like signal transduction pathway in modulating motility, cell clumping, and cell length in the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense*. *Journal of bacteriology*, *190*(19), 6365–6375. <https://doi.org/10.1128/JB.00734-08>
- Bible, A., Russell, M. H., & Alexandre, G. (2012). The *Azospirillum brasilense* Che1 chemotaxis pathway controls swimming velocity, which affects transient cell-to-cell clumping. *Journal of bacteriology*, *194*(13), 3343–3355. <https://doi.org/10.1128/JB.00310-12>
- Bieber, D., Ramer, S.W., Wu, C.-Y., Murray, W.J., Tobe, T., Fernandez, R., Schoolnik, G.K., 1998. Type IV Pili, Transient Bacterial Aggregates, and Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* *280*, 2114–2118. <https://doi.org/10.1126/science.280.5372.2114>
- Bleves, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G.P.F., Filloux, A., Voulhoux, R., 2010. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *International Journal of Medical Microbiology* *300*, 534–543. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.08.005>
- Boddey, J.A., Flegg, C.P., Day, C.J., Beacham, I.R., Peak, I.R., 2006. Temperature-Regulated Microcolony Formation by *Burkholderia pseudomallei* Requires *pilA* and Enhances Association with Cultured Human Cells. *Infect Immun* *74*, 5374–5381. <https://doi.org/10.1128/IAI.00569-06>
- Borlee, B.R., Goldman, A.D., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D.J., Parsek, M.R., 2010. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Molecular Microbiology* *75*, 827–842. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06991.x>
- Breidenstein, E.B.M., de la Fuente-Núñez, C., Hancock, R.E.W., 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiology* *19*, 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>
- Brillard, J., Duchaud, E., Boemare, N., Kunst, F., Givaudan, A., 2002. The PhIA Hemolysin from the Entomopathogenic Bacterium *Photorhabdus luminescens* Belongs to the Two-Partner Secretion Family of Hemolysins. *J Bacteriol* *184*, 3871–3878. <https://doi.org/10.1128/JB.184.14.3871-3878.2002>
- Burdman, S., Bahar, O., Parker, J.K., De La Fuente, L., 2011. Involvement of Type IV Pili in Pathogenicity of Plant Pathogenic Bacteria. *Genes* *2*, 706–735. <https://doi.org/10.3390/genes2040706>
- Buscher, A.Z., Grass, S., Heuser, J., Roth, R., St. Geme, J.W., 2006. Surface anchoring of a bacterial adhesin secreted by the two-partner secretion pathway. *Mol Microbiol* *61*, 470–483. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05236.x>
- Cadoret, F., Ball, G., Douzi, B., Voulhoux, R., 2014. Txc, a New Type II Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PA7, Is Regulated by the TtsS/TtsR Two-Component

- System and Directs Specific Secretion of the CbpE Chitin-Binding Protein. *J Bacteriol* 196, 2376–2386. <https://doi.org/10.1128/JB.01563-14>
- Cai, Y.-M., 2020. Non-surface Attached Bacterial Aggregates: A Ubiquitous Third Lifestyle. *Front. Microbiol.* 11, 557035. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.557035>
- Chan, S.H., Ismail, M.H., Tan, C.H., Rice, S.A., McDougald, D., 2021. Microbial predation accelerates granulation and modulates microbial community composition. *BMC Microbiol* 21, 91. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02156-8>
- Chauhan, A., Sakamoto, C., Ghigo, J. M., & Beloin, C. (2013). Did I pick the right colony? Pitfalls in the study of regulation of the phase variable antigen 43 adhesin. *PloS one*, 8(9), e73568. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073568>
- Chekli, Y., Stevick, R.J., Kornobis, E., Briolat, V., Ghigo, J.-M., Beloin, C., 2023. Escherichia coli Aggregates Mediated by Native or Synthetic Adhesins Exhibit Both Core and Adhesin-Specific Transcriptional Responses. *Microbiol Spectr* e0069023. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00690-23>
- Chen, L., Zou, Y., Kronfl, A.A., Wu, Y., 2020. Type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with biofilm formation but not environmental adaptation. *Microbiologyopen* 9, e991. <https://doi.org/10.1002/mbo3.991>
- Cheung, J.C., Chiaw, P.K., Pasyk, S., Bear, C.E., 2008. Molecular basis for the ATPase activity of CFTR. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 476, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.03.033>
- Chmiel, J.F., Davis, P.B., 2003. State of the Art: Why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection? *Respir Res* 4, 8. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-4-8>
- Clantin, B., Delattre, A.-S., Rucktooa, P., Saint, N., Méli, A.C., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., Villeret, V., 2007. Structure of the membrane protein FhaC: a member of the Omp85-TpsB transporter superfamily. *Science* 317, 957–961. <https://doi.org/10.1126/science.1143860>
- Cole, S.J., Records, A.R., Orr, M.W., Linden, S.B., Lee, V.T., 2014. Catheter-associated urinary tract infection by *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by exopolysaccharide-independent biofilms. *Infect Immun* 82, 2048–2058. <https://doi.org/10.1128/IAI.01652-14>
- Colvin, K.M., Gordon, V.D., Murakami, K., Borlee, B.R., Wozniak, D.J., Wong, G.C.L., Parsek, M.R., 2011. The Pel Polysaccharide Can Serve a Structural and Protective Role in the Biofilm Matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* 7, e1001264. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001264>
- Colvin, K.M., Irie, Y., Tart, C.S., Urbano, R., Whitney, J.C., Ryder, C., Howell, P.L., Wozniak, D.J., Parsek, M.R., 2012. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas*

- aeruginosa structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ Microbiol* 14, 1913–1928. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02657.x>
- Cooley, R.B., Smith, T.J., Leung, W., Tierney, V., Borlee, B.R., O'Toole, G.A., Sondermann, H., 2016. Cyclic Di-GMP-Regulated Periplasmic Proteolysis of a *Pseudomonas aeruginosa* Type Vb Secretion System Substrate. *J Bacteriol* 198, 66–76. <https://doi.org/10.1128/JB.00369-15>
- Cornforth, D.M., Diggle, F.L., Melvin, J.A., Bomberger, J.M., Whiteley, M., 2020. Quantitative Framework for Model Evaluation in Microbiology Research Using *Pseudomonas aeruginosa* and Cystic Fibrosis Infection as a Test Case. *mBio* 11, e03042-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.03042-19>
- Crull, M.R., Somayaji, R., Ramos, K.J., Caldwell, E., Mayer-Hamblett, N., Aitken, M.L., Nichols, D.P., Rowhani-Rahbar, A., Goss, C.H., 2018. Changing Rates of Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis: A Population-Based Cohort Study. *Clinical Infectious Diseases* 67, 1089–1095. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy215>
- Dacheux, D., Goure, J., Chabert, J., Usson, Y., Attree, I., 2001. Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages: New insights into the mechanism of *P. aeruginosa*-induced oncosis. *Molecular Microbiology* 40, 76–85. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02368.x>
- Dambrauskiene, A., Adukauskiene, D., Jeroch, J., Vitkauskiene, A., 2009. [*Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: associations with a source of infection and antibiotic resistance]. *Medicina (Kaunas)* 45, 1–7.
- Darch, S.E., Kragh, K.N., Abbott, E.A., Bjarnsholt, T., Bull, J.J., Whiteley, M., 2017. Phage Inhibit Pathogen Dissemination by Targeting Bacterial Migrants in a Chronic Infection Model. *mBio* 8, e00240-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00240-17>
- de Freitas, S.B., Wozeak, D.R., Neto, A.S., Cardoso, T.L., Hartwig, D.D., 2021. A hypothetical adhesin protein induces anti-biofilm antibodies against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microb Pathog* 159, 105112. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105112>
- de Kievit, T.R., 2009. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology* 11, 279–288. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01792.x>
- Demirdjian, S., Sanchez, H., Hopkins, D., Berwin, B., 2019. Motility-Independent Formation of Antibiotic-Tolerant *Pseudomonas aeruginosa* Aggregates. *Appl Environ Microbiol* 85, e00844-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00844-19>
- Di Venanzio, G., Stepanenko, T.M., García Vescovi, E., 2014. *Serratia marcescens* ShIA pore-forming toxin is responsible for early induction of autophagy in host cells and is transcriptionally regulated by RcsB. *Infect Immun* 82, 3542–3554. <https://doi.org/10.1128/IAI.01682-14>

- Dieppoiss, G., Ducret, V., Caille, O., Perron, K., 2012. The Transcriptional Regulator CzcR Modulates Antibiotic Resistance and Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* 7, e38148. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038148>
- Dogsa, I., Kostanjšek, R., Stopar, D., 2023. eDNA Provides a Scaffold for Autoaggregation of *B. subtilis* in Bacterioplankton Suspension. *Microorganisms* 11, 332. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020332>
- Donelli, G., Francolini, I., Piozzi, A., Rosa, R.D., Marconi, W., 2002. New Polymer-Antibiotic Systems to Inhibit Bacterial Biofilm Formation: A Suitable Approach to Prevent Central Venous Catheter-Associated Infections. *Journal of Chemotherapy* 14, 501–507. <https://doi.org/10.1179/joc.2002.14.5.501>
- Dong, Y., Li, S., Zhao, D., Liu, J., Ma, S., Geng, J., Lu, C., Liu, Y., 2020. lolR, a negative regulator of the myo-inositol metabolic pathway, inhibits cell autoaggregation and biofilm formation by downregulating RpmA in *Aeromonas hydrophila*. *npj Biofilms Microbiomes* 6, 22. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-0132-3>
- Dötsch, A., Eckweiler, D., Schniederjans, M., Zimmermann, A., Jensen, V., Scharfe, M., Geffers, R., Häussler, S., 2012. The *Pseudomonas aeruginosa* Transcriptome in Planktonic Cultures and Static Biofilms Using RNA Sequencing. *PLoS ONE* 7, e31092. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031092>
- Doyle, M. T., & Bernstein, H. D. (2021). BamA forms a translocation channel for polypeptide export across the bacterial outer membrane. *Molecular cell*, 81(9), 2000–2012.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.02.023>
- Doyle, M. T., & Bernstein, H. D. (2022). Function of the Omp85 Superfamily of Outer Membrane Protein Assembly Factors and Polypeptide Transporters. *Annual review of microbiology*, 76, 259–279. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-033021-023719>
- Durda-Masny, M., Goździk-Spychalska, J., John, A., Czaiński, W., Stróżewska, W., Pawłowska, N., Wlizio, J., Batura-Gabryel, H., Szwed, A., 2021. The determinants of survival among adults with cystic fibrosis—a cohort study. *J Physiol Anthropol* 40, 19. <https://doi.org/10.1186/s40101-021-00269-7>
- Duvernoy, M.-C., Mora, T., Ardré, M., Croquette, V., Bensimon, D., Quilliet, C., Ghigo, J.-M., Balland, M., Beloin, C., Lecuyer, S., Desprat, N., 2018. Asymmetric adhesion of rod-shaped bacteria controls microcolony morphogenesis. *Nat Commun* 9, 1120. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03446-y>
- Ecevit, I.Z., McCrea, K.W., Pettigrew, M.M., Sen, A., Marrs, C.F., Gilsdorf, J.R., 2004. Prevalence of the hifBC, hmw1A, hmw2A, hmwC, and hia Genes in *Haemophilus influenzae* Isolates. *J Clin Microbiol* 42, 3065–3072. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3065-3072.2004>

- Elsen, S., Huber, P., Bouillot, S., Coute, Y., Fournier, P., Dubois, Y., Timsit, J.F., Maurin, M., Attree, I., 2014. A type III secretion negative clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* employs a two-partner secreted exolysin to induce hemorrhagic pneumonia. *Cell host & microbe* 15, 164–76. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.003>
- Eltahir, Y., 2001. YadA, the multifaceted adhesin. *International Journal of Medical Microbiology* 291, 209–218. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00119>
- Fan, E., Fiedler, S., Jacob-Dubuisson, F., & Müller, M. (2012). Two-partner secretion of gram-negative bacteria: a single β -barrel protein enables transport across the outer membrane. *The Journal of biological chemistry*, 287(4), 2591–2599. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.293068>
- Fan, E., Chauhan, N., Udatha, D.B.R.K.G., Leo, J.C., Linke, D., 2016. Type V Secretion Systems in Bacteria. *Microbiol Spectr* 4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0009-2015>
- Fan, K., Cao, Q., Lan, L., 2021. Genome-Wide Mapping Reveals Complex Regulatory Activities of BfmR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microorganisms* 9, 485. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030485>
- Fan, Z., Pan, X., Wang, D., Chen, R., Fu, T., Yang, B., Jin, Y., Bai, F., Cheng, Z., Wu, W., 2021. *Pseudomonas aeruginosa* Polynucleotide Phosphorylase Controls Tolerance to Aminoglycoside Antibiotics by Regulating the MexXY Multidrug Efflux Pump. *Antimicrob Agents Chemother* 65, e01846-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.01846-20>
- Farrell, A., Quilty, B., 2002. Substrate-dependent autoaggregation of *Pseudomonas putida* CP1 during the degradation of mono-chlorophenols and phenol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 28, 316–324. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000249>
- Farshadzadeh, Z., Khosravi, A.D., Alavi, S.M., Parhizgari, N., Hoveizavi, H., 2014. Spread of extended-spectrum β -lactamase genes of bla OXA-10, bla PER-1 and bla CTX-M in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. *Burns* 40, 1575–1580. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2014.02.008>
- Faudry, E., Vernier, G., Neumann, E., Forge, V., Attree, I., 2006. Synergistic Pore Formation by Type III Toxin Translocators of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 45, 8117–8123. <https://doi.org/10.1021/bi060452+>
- Faure, L.M., Garvis, S., de Bentzmann, S., Bigot, S., 2014. Characterization of a novel two-partner secretion system implicated in the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading)* 160, 1940–1952. <https://doi.org/10.1099/mic.0.079616-0>
- Faure, L.M., Llamas, M.A., Bastiaansen, K.C., de Bentzmann, S., Bigot, S., 2013. Phosphate starvation relayed by PhoB activates the expression of the *Pseudomonas aeruginosa* σ vrel ECF factor and its target genes. *Microbiology* 159, 1315–1327. <https://doi.org/10.1099/mic.0.067645-0>

- Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H., Prince, A., 1998. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun* 66, 43–51. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.1.43-51.1998>
- Fexby, S., Bjarnsholt, T., Jensen, P.Ø., Roos, V., Høiby, N., Givskov, M., Klemm, P., 2007. Biological Trojan horse: Antigen 43 provides specific bacterial uptake and survival in human neutrophils. *Infect Immun* 75, 30–34. <https://doi.org/10.1128/IAI.01117-06>
- Fleming, D., Niese, B., Redman, W., Vanderpool, E., Gordon, V., Rumbaugh, K.P., 2022. Contribution of *Pseudomonas aeruginosa* Exopolysaccharides Pel and Psl to Wound Infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12, 835754. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.835754>
- Flores-Vargas, G., Bergsveinson, J., Lawrence, J.R., Korber, D.R., 2021. Environmental Biofilms as Reservoirs for Antimicrobial Resistance. *Front. Microbiol.* 12, 766242. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.766242>
- Formosa-Dague, C., Feuillie, C., Beaussart, A., Derclaye, S., Kucharíková, S., Lasa, I., Van Dijck, P., Dufrêne, Y.F., 2016. Sticky Matrix: Adhesion Mechanism of the Staphylococcal Polysaccharide Intercellular Adhesin. *ACS Nano* 10, 3443–3452. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b07515>
- Fournier, C., Smith, A., Delepelaire, P., 2011. Haem release from haemopexin by HxuA allows *Haemophilus influenzae* to escape host nutritional immunity: HxuA releases haem from haemopexin. *Molecular Microbiology* 80, 133–148. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07562.x>
- Freschi, L., Vincent, A.T., Jeukens, J., Emond-Rheault, J.-G., Kukavica-Ibrulj, I., Dupont, M.-J., Charette, S.J., Boyle, B., Levesque, R.C., 2019. The *Pseudomonas aeruginosa* Pan-Genome Provides New Insights on Its Population Structure, Horizontal Gene Transfer, and Pathogenicity. *Genome Biol Evol* 11, 109–120. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy259>
- Friedman, L., Kolter, R., 2003. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms: Matrix formation in *P. aeruginosa* PA14 biofilms. *Molecular Microbiology* 51, 675–690. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03877.x>
- Fujitani, S., Sun, H.-Y., Yu, V.L., Weingarten, J.A., 2011. Pneumonia Due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* 139, 909–919. <https://doi.org/10.1378/chest.10-0166>
- Galán-Vásquez, E., Luna, B., Martínez-Antonio, A., 2011. The Regulatory Network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Inform Exp* 1, 3. <https://doi.org/10.1186/2042-5783-1-3>
- Gallego, M., Pomares, X., Espasa, M., Castañer, E., Solé, M., Suárez, D., Monsó, E., Montón, C., 2014. *Pseudomonas aeruginosa* isolates in severe chronic obstructive pulmonary

- disease: characterization and risk factors. *BMC Pulm Med* 14, 103. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-14-103>
- Garcia, E.C., Anderson, M.S., Hagar, J.A., Cotter, P.A., 2013. *B. urkholderia* BcpA mediates biofilm formation independently of interbacterial contact-dependent growth inhibition: CDI system protein-mediated biofilm. *Molecular Microbiology* 89, 1213–1225. <https://doi.org/10.1111/mmi.12339>
- Gentle, I.E., Burri, L., Lithgow, T., 2005. Molecular architecture and function of the Omp85 family of proteins: The Omp85 protein family. *Molecular Microbiology* 58, 1216–1225. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04906.x>
- Ghafoor, A., Hay, I.D., Rehm, B.H.A., 2011. Role of Exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Architecture. *Appl Environ Microbiol* 77, 5238–5246. <https://doi.org/10.1128/AEM.00637-11>
- Girard, L., Lood, C., Höfte, M., Vandamme, P., Rokni-Zadeh, H., van Noort, V., Lavigne, R., De Mot, R., 2021. The Ever-Expanding *Pseudomonas* Genus: Description of 43 New Species and Partition of the *Pseudomonas putida* Group. *Microorganisms* 9, 1766. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081766>
- Goldufsky, J., Wood, S.J., Jayaraman, V., Majdobe, O., Chen, L., Qin, S., Zhang, C., DiPietro, L.A., Shafikhani, S.H., 2015. *Pseudomonas aeruginosa* uses T3SS to inhibit diabetic wound healing: *P. aeruginosa* inhibits wound healing. *Wound Rep and Reg* 23, 557–564. <https://doi.org/10.1111/wrr.12310>
- Gomila, M., Peñ̃a, A., Mulet, M., Lalucat, J., Garc̃a-Vald̃s, E., 2015. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00214>
- Goodman, A.L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R.S., Lory, S., 2004. A Signaling Network Reciprocally Regulates Genes Associated with Acute Infection and Chronic Persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Developmental Cell* 7, 745–754. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.08.020>
- Green, M., Apel, A., Stapleton, F., 2008. Risk Factors and Causative Organisms in Microbial Keratitis. *Cornea* 27, 22–27. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e318156caf2>
- Guérin, J., Bigot, S., Schneider, R., Buchanan, S.K., Jacob-Dubuisson, F., 2017. Two-Partner Secretion: Combining Efficiency and Simplicity in the Secretion of Large Proteins for Bacteria-Host and Bacteria-Bacteria Interactions. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 148. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00148>
- Guerry, P., 2007. *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends in Microbiology* 15, 456–461. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.09.006>

- Ha, D.-G., O'Toole, G.A., 2015. c-di-GMP and its Effects on Biofilm Formation and Dispersion: a *Pseudomonas Aeruginosa* Review. *Microbiol Spectr* 3, 3.2.27. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0003-2014>
- Hahn, M.W., Moore, E.R.B., Höfle, M.G., 2000. Role of Microcolony Formation in the Protistan Grazing Defense of the Aquatic Bacterium *Pseudomonas* sp. MWH1. *Microb Ecol* 39, 175–185. <https://doi.org/10.1007/s002480000026>
- Harrington, N.E., Littler, J.L., Harrison, F., 2022. Transcriptome Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infection in an *Ex Vivo* Pig Model of the Cystic Fibrosis Lung. *Appl Environ Microbiol* 88, e01789-21. <https://doi.org/10.1128/aem.01789-21>
- Hassan, K.A., Liu, Q., Henderson, P.J.F., Paulsen, I.T., 2015. Homologs of the *Acinetobacter baumannii* Acel Transporter Represent a New Family of Bacterial Multidrug Efflux Systems. *mBio* 6, e01982-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01982-14>
- Hauser, A.R., 2009. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* 7, 654–665. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2199>
- Hebert, W., DiGiandomenico, A., Zegans, M., 2020. Multifunctional Monoclonal Antibody Targeting *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis in Mice. *Vaccines (Basel)* 8, 638. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040638>
- Hendrixson, D.R., St. Geme, J.W., 1998. The Haemophilus influenzae Hap Serine Protease Promotes Adherence and Microcolony Formation, Potentiated by a Soluble Host Protein. *Molecular Cell* 2, 841–850. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80298-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80298-1)
- Hentzer, M., Teitzel, G.M., Balzer, G.J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M., Parsek, M.R., 2001. Alginate Overproduction Affects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Structure and Function. *J Bacteriol* 183, 5395–5401. <https://doi.org/10.1128/JB.183.18.5395-5401.2001>
- Heras, B., Totsika, M., Peters, K.M., Paxman, J.J., Gee, C.L., Jarrott, R.J., Perugini, M.A., Whitten, A.E., Schembri, M.A., 2014. The antigen 43 structure reveals a molecular Velcro-like mechanism of autotransporter-mediated bacterial clumping. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 457–462. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311592111>
- Hertle, R., Hilger, M., Weingardt-Kocher, S., Walev, I., 1999. Cytotoxic action of *Serratia marcescens* hemolysin on human epithelial cells. *Infect Immun* 67, 817–825. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.2.817-825.1999>
- Hill, D.B., Long, R.F., Kissner, W.J., Atieh, E., Garbarine, I.C., Markovetz, M.R., Fontana, N.C., Christy, M., Habibpour, M., Tarran, R., Forest, M.G., Boucher, R.C., Button, B., 2018. Pathological mucus and impaired mucus clearance in cystic fibrosis patients result from increased concentration, not altered pH. *Eur Respir J* 52, 1801297. <https://doi.org/10.1183/13993003.01297-2018>

- Hilliam, Y., Kaye, S., Winstanley, C., 2020. *Pseudomonas aeruginosa* and microbial keratitis. *Journal of Medical Microbiology* 69, 3–13. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001110>
- Hiramatsu, Y., Saito, M., Otsuka, N., Suzuki, E., Watanabe, M., Shibayama, K., Kamachi, K., 2016. BipA Is Associated with Preventing Autoagglutination and Promoting Biofilm Formation in *Bordetella holmesii*. *PLoS ONE* 11, e0159999. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159999>
- Hirono, I., Tange, N., Aoki, T., 1997. Iron-regulated haemolysin gene from *Edwardsiella tarda*. *Molecular Microbiology* 24, 851–856. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3971760.x>
- Hmelo, L.R., Borlee, B.R., Almblad, H., Love, M.E., Randall, T.E., Tseng, B.S., Lin, C., Irie, Y., Storek, K.M., Yang, J.J., Siehnel, R.J., Howell, P.L., Singh, P.K., Tolker-Nielsen, T., Parsek, M.R., Schweizer, H.P., Harrison, J.J., 2015. Precision-engineering the *Pseudomonas aeruginosa* genome with two-step allelic exchange. *Nat Protoc* 10, 1820–1841. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.115>
- Hong, D.J., Bae, I.K., Jang, I.-H., Jeong, S.H., Kang, H.-K., Lee, K., 2015. Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother* 47, 81. <https://doi.org/10.3947/ic.2015.47.2.81>
- Hou, L., Debru, A., Chen, Q., Bao, Q., Li, K., 2019. AmrZ Regulates Swarming Motility Through Cyclic di-GMP-Dependent Motility Inhibition and Controlling Pel Polysaccharide Production in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Front. Microbiol.* 10, 1847. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01847>
- Huang, W., Wilks, A., 2017. A rapid seamless method for gene knockout in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol* 17, 199. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1112-5>
- Iadanza, M. G., Schiffrin, B., White, P., Watson, M. A., Horne, J. E., Higgins, A. J., Calabrese, A. N., Brockwell, D. J., Tuma, R., Kalli, A. C., Radford, S. E., & Ranson, N. A. (2020). Distortion of the bilayer and dynamics of the BAM complex in lipid nanodiscs. *Communications biology*, 3(1), 766. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01419-w>
- Imbert, P.R., Louche, A., Luizet, J., Grandjean, T., Bigot, S., Wood, T.E., Gagné, S., Blanco, A., Wunderley, L., Terradot, L., Woodman, P., Garvis, S., Filloux, A., Guery, B., Salcedo, S.P., 2017. A *Pseudomonas aeruginosa* TIR effector mediates immune evasion by targeting UBAP 1 and TLR adaptors. *The EMBO Journal* 36, 1869–1887. <https://doi.org/10.15252/embj.201695343>
- Ioannou, P., Alexakis, K., Maraki, S., Kofteridis, D.P., 2023. *Pseudomonas* Bacteremia in a Tertiary Hospital and Factors Associated with Mortality. *Antibiotics* 12, 670. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040670>

- Ishikawa, M., Nakatani, H., Hori, K., 2012. AtaA, a new member of the trimeric autotransporter adhesins from *Acinetobacter* sp. Tol 5 mediating high adhesiveness to various abiotic surfaces. *PLoS One* 7, e48830. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048830>
- Jacob-Dubuisson, F., Guérin, J., Baelen, S., Clantin, B., 2013. Two-partner secretion: as simple as it sounds? *Res Microbiol* 164, 583–595. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.03.009>
- Jagmann, N., Henke, S.F., Philipp, B., 2015. Cells of *Escherichia coli* are protected against severe chemical stress by co-habiting cell aggregates formed by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 8285–8294. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6726-7>
- Jeong, J.-Y., Yim, H.-S., Ryu, J.-Y., Lee, H.S., Lee, J.-H., Seen, D.-S., Kang, S.G., 2012. One-Step Sequence- and Ligation-Independent Cloning as a Rapid and Versatile Cloning Method for Functional Genomics Studies. *Appl Environ Microbiol* 78, 5440–5443. <https://doi.org/10.1128/AEM.00844-12>
- Jiang, F., Waterfield, N.R., Yang, J., Yang, G., Jin, Q., 2014. A *Pseudomonas aeruginosa* Type VI Secretion Phospholipase D Effector Targets Both Prokaryotic and Eukaryotic Cells. *Cell Host & Microbe* 15, 600–610. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.04.010>
- Job, V., Gomez-Valero, L., Renier, A., Rusniok, C., Bouillot, S., Chenal-Francisque, V., Gueguen, E., Adrait, A., Robert-Genthon, M., Jeannot, K., Panchev, P., Elsen, S., Fauvarque, M.-O., Couté, Y., Buchrieser, C., Attrée, I., 2022. Genomic erosion and horizontal gene transfer shape functional differences of the ExIA toxin in *Pseudomonas* spp. *iScience* 25, 104596. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104596>
- Julio, S.M., Inatsuka, C.S., Mazar, J., Dieterich, C., Relman, D.A., Cotter, P.A., 2009. Natural-host animal models indicate functional interchangeability between the filamentous haemagglutinins of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica* and reveal a role for the mature C-terminal domain, but not the RGD motif, during infection. *Molecular Microbiology* 71, 1574–1590. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06623.x>
- Kadry, N.A., Porsch, E.A., Shen, H., St. Geme, J.W., 2021. Immunization with HMW1 and HMW2 adhesins protects against colonization by heterologous strains of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 118, e2019923118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2019923118>
- Kajava, A.V., Steven, A.C., 2006. The turn of the screw: variations of the abundant beta-solenoid motif in passenger domains of Type V secretory proteins. *J Struct Biol* 155, 306–315. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.01.015>
- Kaundal, S., Uttam, M., Thakur, K.G., 2016. Dual Role of a Biosynthetic Enzyme, CysK, in Contact Dependent Growth Inhibition in Bacteria. *PLoS ONE* 11, e0159844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159844>

- Kay, E., Humair, B., Déneraud, V., Riedel, K., Spahr, S., Eberl, L., Valverde, C., Haas, D., 2006. Two GacA-Dependent Small RNAs Modulate the Quorum-Sensing Response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188, 6026–6033. <https://doi.org/10.1128/JB.00409-06>
- Kharadi, R. R., & Sundin, G. W. (2019). Physiological and Microscopic Characterization of Cyclic-di-GMP-Mediated Autoaggregation in *Erwinia amylovora*. *Frontiers in microbiology*, 10, 468. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00468>
- Kida, Y., Higashimoto, Y., Inoue, H., Shimizu, T., Kuwano, K., 2008. A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF- κ B through protease-activated receptors. *Cell Microbiol* 10, 1491–1504. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01142.x>
- Kida, Y., Shimizu, T., Kuwano, K., 2011. Cooperation between LepA and PlcH Contributes to the *In Vivo* Virulence and Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in Mice. *Infect Immun* 79, 211–219. <https://doi.org/10.1128/IAI.01053-10>
- Kirn, T.J., Lafferty, M.J., Sandoe, C.M., Taylor, R.K., 2000. Delineation of pilin domains required for bacterial association into microcolonies and intestinal colonization by *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 35, 896–910. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01764.x>
- Kisiela, D.I., Avagyan, H., Friend, D., Jalan, A., Gupta, S., Interlandi, G., Liu, Y., Tchesnokova, V., Rodriguez, V.B., Sumida, J.P., Strong, R.K., Wu, X.-R., Thomas, W.E., Sokurenko, E.V., 2015. Inhibition and Reversal of Microbial Attachment by an Antibody with Parasteric Activity against the FimH Adhesin of Uropathogenic *E. coli*. *PLoS Pathog* 11, e1004857. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004857>
- Klebensberger, J., Rui, O., Fritz, E., Schink, B., Philipp, B., 2006. Cell aggregation of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 as an energy-dependent stress response during growth with sodium dodecyl sulfate. *Arch Microbiol* 185, 417–427. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0111-y>
- Klemm, P., Vejborg, R.M., Sherlock, O., 2006. Self-associating autotransporters, SAATs: Functional and structural similarities. *International Journal of Medical Microbiology* 296, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.10.002>
- Köhler, T., Curty, L.K., Barja, F., van Delden, C., Pechère, J.C., 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* 182, 5990–5996. <https://doi.org/10.1128/JB.182.21.5990-5996.2000>
- Kragh, K.N., Hutchison, J.B., Melaugh, G., Rodesney, C., Roberts, A.E.L., Irie, Y., Jensen, P.Ø., Diggle, S.P., Allen, R.J., Gordon, V., Bjarnsholt, T., 2016. Role of Multicellular Aggregates in Biofilm Formation. *mBio* 7, e00237-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00237-16>

- Kragh, K.N., Tolker-Nielsen, T., Lichtenberg, M., 2023. The non-attached biofilm aggregate. *Commun Biol* 6, 898. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05281-4>
- Kuchma, S.L., Brothers, K.M., Merritt, J.H., Liberati, N.T., Ausubel, F.M., O'Toole, G.A., 2007. BifA, a Cyclic-Di-GMP Phosphodiesterase, Inversely Regulates Biofilm Formation and Swarming Motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* 189, 8165–8178. <https://doi.org/10.1128/JB.00586-07>
- Kundracik, E., Trichka, J., Díaz Aponte, J., Roistacher, A., Rietsch, A., 2022. PopB-PcrV Interactions Are Essential for Pore Formation in the *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System Translocon. *mBio* 13, e02381-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.02381-22>
- Kung, V.L., Ozer, E.A., Hauser, A.R., 2010. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* 74, 621–641. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00027-10>
- Laganenka, L., Colin, R., & Sourjik, V. (2016). Chemotaxis towards autoinducer 2 mediates autoaggregation in *Escherichia coli*. *Nature communications*, 7, 12984. <https://doi.org/10.1038/ncomms12984>
- Lamas Ferreira, J.L., Álvarez Otero, J., González González, L., Novoa Lamazares, L., Arca Blanco, A., Bermúdez Sanjurjo, J.R., Rodríguez Conde, I., Fernández Soneira, M., de la Fuente Aguado, J., 2017. *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infections in hospitalized patients: Mortality and prognostic factors. *PLoS ONE* 12, e0178178. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178178>
- Lambert, L.C., 2014. Pertussis vaccine trials in the 1990s. *J Infect Dis* 209 Suppl 1, S4-9. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit592>
- Lehr, U., Schütz, M., Oberhettinger, P., Ruiz-Perez, F., Donald, J.W., Palmer, T., Linke, D., Henderson, I.R., and Autenrieth, I.B. (2010). C-terminal amino acid residues of the trimeric autotransporter adhesin YadA of *Yersinia enterocolitica* are decisive for its recognition and assembly by BamA: YadA is recognized and assembled by the BAM complex. *Mol. Microbiol.* 78, 932–946.
- Letunic, I., Bork, P., 2021. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research* 49, W293–W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Li, D., Liang, X., Wu, C., 2020. Characteristics of Nitrogen Removal and Extracellular Polymeric Substances of a Novel Salt-Tolerant Denitrifying Bacterium, *Pseudomonas* sp. DN-23. *Front Microbiol* 11, 335. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00335>
- Li, M.Z., Elledge, S.J., 2007. Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat Methods* 4, 251–256. <https://doi.org/10.1038/nmeth1010>

- Llamas, M.A., Mooij, M.J., Sparrius, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Ratledge, C., Bitter, W., 2007. Characterization of five novel *Pseudomonas aeruginosa* cell-surface signalling systems: Cell-surface signalling in *P. aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 67, 458–472. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06061.x>
- Llamas, M.A., van der Sar, A., Chu, B.C.H., Sparrius, M., Vogel, H.J., Bitter, W., 2009. A Novel extracytoplasmic function (ECF) sigma factor regulates virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* 5, e1000572. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000572>
- Locht, C., Berlin, P., Menozzi, F.D., Renault†, G., 1993. The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesin produced by virulent *Bordetella* spp. *Mol Microbiol* 9, 653–660. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01725.x>
- Loeschcke, A., Thies, S., 2015. *Pseudomonas putida*—a versatile host for the production of natural products. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 6197–6214. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6745-4>
- Lombardi, C., Tolchard, J., Bouillot, S., Signor, L., Gebus, C., Liebl, D., Fenel, D., Teulon, J.-M., Brock, J., Habenstein, B., Pellequer, J.-L., Faudry, E., Loquet, A., Attrée, I., Dessen, A., Job, V., 2019. Structural and Functional Characterization of the Type Three Secretion System (T3SS) Needle of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 10, 573. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00573>
- Lorusso, A.B., Carrara, J.A., Barroso, C.D.N., Tuon, F.F., Faoro, H., 2022. Role of Efflux Pumps on Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *IJMS* 23, 15779. <https://doi.org/10.3390/ijms232415779>
- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K., Wozniak, D.J., 2009. Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. *PLoS Pathog* 5, e1000354. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000354>
- Manner, C., Dias Teixeira, R., Saha, D., Kaczmarczyk, A., Zemp, R., Wyss, F., Jaeger, T., Laventie, B.-J., Boyer, S., Malone, J.G., Qvortrup, K., Andersen, J.B., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., Hiller, S., Drescher, K., Jenal, U., 2023. A genetic switch controls *Pseudomonas aeruginosa* surface colonization. *Nat Microbiol* 8, 1520–1533. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01403-0>
- Manos, J., 2021. Current and Emerging Therapies to Combat Cystic Fibrosis Lung Infections. *Microorganisms* 9, 1874. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091874>
- Mansoor, T., Musani, M.A., Khalid, G., Kamal, M., 2009. *Pseudomonas aeruginosa* in chronic suppurative otitis media: sensitivity spectrum against various antibiotics in Karachi. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 21, 120–123.
- Marko, V.A., Kilmury, S.L.N., MacNeil, L.T., Burrows, L.L., 2018. *Pseudomonas aeruginosa* type IV minor pilins and PilY1 regulate virulence by modulating FimS-AlgR activity. *PLoS Pathog* 14, e1007074. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007074>

- Mazar, J., Cotter, P.A., 2007. New insight into the molecular mechanisms of two-partner secretion. *Trends in Microbiology* 15, 508–515. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.10.005>
- Mazar, J., Cotter, P.A., 2006. Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. *Molecular Microbiology* 62, 641–654. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05392.x>
- Melaugh, G., Martinez, V.A., Baker, P., Hill, P.J., Howell, P.L., Wozniak, D.J., Allen, R.J., 2023. Distinct types of multicellular aggregates in *Pseudomonas aeruginosa* liquid cultures. *npj Biofilms Microbiomes* 9, 52. <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00412-5>
- Melia, C.E., Bolla, J.R., Katharios-Lanwermyer, S., Mihaylov, D.B., Hoffmann, P.C., Huo, J., Wozny, M.R., Elfari, L.M., Böhning, J., Morgan, A.N., Hitchman, C.J., Owens, R.J., Robinson, C.V., O'Toole, G.A., Bharat, T.A.M., 2021. Architecture of cell–cell junctions in situ reveals a mechanism for bacterial biofilm inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 118, e2109940118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2109940118>
- Meng, G., Spahich, N., Kenjale, R., Waksman, G., St Geme, J.W., 2011. Crystal structure of the *Haemophilus influenzae* Hap adhesin reveals an intercellular oligomerization mechanism for bacterial aggregation. *EMBO J* 30, 3864–3874. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.279>
- Meng, G., Surana, N. K., St Geme, J. W., 3rd, & Waksman, G. (2006). Structure of the outer membrane translocator domain of the *Haemophilus influenzae* Hia trimeric autotransporter. *The EMBO journal*, 25(11), 2297–2304. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601132>
- Mercy, C., Ize, B., Salcedo, S.P., de Bentzmann, S., Bigot, S., 2016. Functional Characterization of *Pseudomonas* Contact Dependent Growth Inhibition (CDI) Systems. *PLoS ONE* 11, e0147435. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147435>
- Mercy, C., Ize, B., Salcedo, S. P., de Bentzmann, S., & Bigot, S. (2016). Functional Characterization of *Pseudomonas* Contact Dependent Growth Inhibition (CDI) Systems. *PloS one*, 11(1), e0147435. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147435>
- Meuskens, I., Saragliadis, A., Leo, J.C., Linke, D., 2019. Type V Secretion Systems: An Overview of Passenger Domain Functions. *Front Microbiol* 10, 1163. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01163>
- Mikkelsen, H., Sivaneson, M., Filloux, A., 2011. Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*: Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology* 13, 1666–1681. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02495.x>

- Miranda, S.W., Asfahl, K.L., Dandekar, A.A., Greenberg, E.P., 2022. *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing. *Adv Exp Med Biol* 1386, 95–115. https://doi.org/10.1007/978-3-031-08491-1_4
- Mission Spares. Surveillance de l'antibiorésistance en établissement de santé. Données 2018. Partie 2 : résistance bactérienne aux antibiotiques www.santepubliquefrance.fr
- Morita, Y., Tomida, J., Kawamura, Y., 2012. Primary mechanisms mediating aminoglycoside resistance in the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate PA7. *Microbiology* 158, 1071–1083. <https://doi.org/10.1099/mic.0.054320-0>
- Moser, C., Pedersen, H.T., Lerche, C.J., Kolpen, M., Line, L., Thomsen, K., Høiby, N., Jensen, P.Ø., 2017. Biofilms and host response - helpful or harmful. *APMIS* 125, 320–338. <https://doi.org/10.1111/apm.12674>
- Mougous, J.D., Cuff, M.E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C.A., Goodman, A.L., Joachimiak, G., Ordoñez, C.L., Lory, S., Walz, T., Joachimiak, A., Mekalanos, J.J., 2006. A Virulence Locus of *Pseudomonas aeruginosa* Encodes a Protein Secretion Apparatus. *Science* 312, 1526–1530. <https://doi.org/10.1126/science.1128393>
- Mukherjee, S., Moustafa, D., Smith, C.D., Goldberg, J.B., Bassler, B.L., 2017. The RhIR quorum-sensing receptor controls *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and biofilm development independently of its canonical homoserine lactone autoinducer. *PLoS Pathog* 13, e1006504. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006504>
- Nash, Z.M., Cotter, P.A., 2019. Bordetella Filamentous Hemagglutinin, a Model for the Two-Partner Secretion Pathway. *Microbiol Spectr* 7. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PSIB-0024-2018>
- Neil, R.B., Apicella, M.A., 2009. Role of HrpA in biofilm formation of *Neisseria meningitidis* and regulation of the hrpBAS transcripts. *Infect Immun* 77, 2285–2293. <https://doi.org/10.1128/IAI.01502-08>
- Nithya, C., Begum, M.F., Pandian, S.K., 2010. Marine bacterial isolates inhibit biofilm formation and disrupt mature biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Microbiol Biotechnol* 88, 341–358. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2777-y>
- Noel, G.J., Barenkamp, S.J., St. Geme, J.W., Haining, W.N., Mosser, D.M., 1994. High-Molecular-Weight Surface-Exposed Proteins of *Haemophilus Influenzae* Mediate Binding to Macrophages. *Journal of Infectious Diseases* 169, 425–429. <https://doi.org/10.1093/infdis/169.2.425>
- Norell, D., Heuck, A., Tran-Thi, T. A., Götzke, H., Jacob-Dubuisson, F., Clausen, T., Daley, D. O., Braun, V., Müller, M., & Fan, E. (2014). Versatile in vitro system to study translocation and functional integration of bacterial outer membrane proteins. *Nature communications*, 5, 5396. <https://doi.org/10.1038/ncomms6396>

- Novotny, L.A., Jurcisek, J.A., Ward, M.O., Jordan, Z.B., Goodman, S.D., Bakaletz, L.O., 2015. Antibodies against the majority subunit of type IV pili disperse nontypeable *H aemophilus influenzae* biofilms in a LuxS-dependent manner and confer therapeutic resolution of experimental otitis media: Dispersal of NTHI biofilms depends on Tfp and LuxS. *Molecular Microbiology* 96, 276–292. <https://doi.org/10.1111/mmi.12934>
- Organization, W.H., 2019. Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in health care facilities. World Health Organization.
- Otero-Asman, J.R., Quesada, J.M., Jim, K.K., Ocampo-Sosa, A., Civantos, C., Bitter, W., Llamas, M.A., 2020. The extracytoplasmic function sigma factor σ Vrel is active during infection and contributes to phosphate starvation-induced virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep* 10, 3139. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60197-x>
- O'Toole, G.A., Kolter, R., 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology* 30, 295–304. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x>
- Palmer, K.L., Munson, R.S., 1995. Cloning and characterization of the genes encoding the haemolysin of *Haemophilus ducreyi*. *Mol Microbiol* 18, 821–830. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.18050821.x>
- Park, Y.-S., Dutta, S., Ann, M., Raaijmakers, J.M., Park, K., 2015. Promotion of plant growth by *Pseudomonas fluorescens* strain SS101 via novel volatile organic compounds. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 461, 361–365. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.039>
- Pastor, A., Chabert, J., Louwagie, M., Garin, J., Attree, I., 2005. PscF is a major component of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion needle. *FEMS Microbiology Letters* 253, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.028>
- Pearson, M.M., Lafontaine, E.R., Wagner, N.J., St Geme, J.W., Hansen, E.J., 2002. A hag mutant of *Moraxella catarrhalis* strain O35E is deficient in hemagglutination, autoagglutination, and immunoglobulin D-binding activities. *Infect Immun* 70, 4523–4533. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.4523-4533.2002>
- Petrova, O.E., Schurr, J.R., Schurr, M.J., Sauer, K., 2011. The novel *Pseudomonas aeruginosa* two-component regulator BfmR controls bacteriophage-mediated lysis and DNA release during biofilm development through PhdA: BfmR and eDNA. *Molecular Microbiology* 81, 767–783. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07733.x>
- Pinto, A.C., Melo-Barbosa, H.P., Miyoshi, A., Silva, A., Azevedo, V., 2011. Review Application of RNA-seq to reveal the transcript profile in bacteria. *Genet. Mol. Res.* 10, 1707–1718. <https://doi.org/10.4238/vol10-3gmr1554>

- Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K., & Meyer, T. F. (1987). Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature*, 325(6103), 458–462. <https://doi.org/10.1038/325458a0>.
- Pont, S., Janet-Maitre, M., Faudry, E., Cretin, F., Attrée, I., 2022. Molecular Mechanisms Involved in *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia, in: Filloux, A., Ramos, J.-L. (Eds.), *Pseudomonas Aeruginosa*, Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing, Cham, pp. 325–345. https://doi.org/10.1007/978-3-031-08491-1_12
- Poon, W.C.K., 2002. The physics of a model colloid polymer mixture. *J. Phys.: Condens. Matter* 14, R859–R880. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/14/33/201>
- Pu, M., Rowe-Magnus, D.A., 2018. A Tad pilus promotes the establishment and resistance of *Vibrio vulnificus* biofilms to mechanical clearance. *NPJ Biofilms Microbiomes* 4, 10. <https://doi.org/10.1038/s41522-018-0052-7>
- Rattanachak, N., Weawsiangsang, S., Daowtak, K., Thongsri, Y., Ross, S., Ross, G., Nilsri, N., Baldock, R.A., Pongcharoen, S., Jongjitvimol, T., Jongjitwimol, J., 2022. High-Throughput Transcriptomic Profiling Reveals the Inhibitory Effect of Hydroquinone on Virulence Factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics* 11, 1436. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101436>
- Reboud, E., Bouillot, S., Patot, S., Beganton, B., Attree, I., Huber, P., 2017. *Pseudomonas aeruginosa* ExlA and *Serratia marcescens* ShlA trigger cadherin cleavage by promoting calcium influx and ADAM10 activation. *PLoS pathogens* 13, e1006579. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006579>
- Rehm, B.H.A., Grabert, E., Hein, J., Winkler, U.K., 1994. Antibody response of rabbits and cystic fibrosis patients to an alginate-specific outer membrane protein of a mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis* 16, 43–51. <https://doi.org/10.1006/mpat.1994.1004>
- Reichhardt, C., Jacobs, H.M., Matwchuk, M., Wong, C., Wozniak, D.J., Parsek, M.R., 2020. The Versatile *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix Protein CdrA Promotes Aggregation through Different Extracellular Exopolysaccharide Interactions. *J Bacteriol* 202, e00216-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00216-20>
- Reichhardt, C., Wong, C., Passos da Silva, D., Wozniak, D.J., Parsek, M.R., 2018. CdrA Interactions within the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix Safeguard It from Proteolysis and Promote Cellular Packing. *mBio* 9, e01376-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01376-18>
- Rempe, K.A., Porsch, E.A., Wilson, J.M., St Geme, J.W., 2016. The HMW1 and HMW2 Adhesins Enhance the Ability of Nontypeable *Haemophilus influenzae* To Colonize the Upper Respiratory Tract of Rhesus Macaques. *Infect Immun* 84, 2771–2778. <https://doi.org/10.1128/IAI.00153-16>

- Restrepo, M.I., Babu, B.L., Reyes, L.F., Chalmers, J.D., Soni, N.J., Sibila, O., Faverio, P., Cilloniz, C., Rodriguez-Cintron, W., Aliberti, S., 2018. Burden and risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* community-acquired pneumonia: a multinational point prevalence study of hospitalised patients. *Eur Respir J* 52, 1701190. <https://doi.org/10.1183/13993003.01190-2017>
- Rich, D.P., Anderson, M.P., Gregory, R.J., Cheng, S.H., Paul, S., Jefferson, D.M., McCann, J.D., Klinger, K.W., Smith, A.E., Welsh, M.J., 1990. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature* 347, 358–363. <https://doi.org/10.1038/347358a0>
- Roussin, M., Rabarioelina, S., Cluzeau, L., Cayron, J., Lesterlin, C., Salcedo, S.P., Bigot, S., 2019. Identification of a Contact-Dependent Growth Inhibition (CDI) System That Reduces Biofilm Formation and Host Cell Adhesion of *Acinetobacter baumannii* DSM30011 Strain. *Front. Microbiol.* 10, 2450. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02450>
- Roy, K., Hilliard, G.M., Hamilton, D.J., Luo, J., Ostmann, M.M., Fleckenstein, J.M., 2009. Enterotoxigenic *Escherichia coli* EtpA mediates adhesion between flagella and host cells. *Nature* 457, 594–598. <https://doi.org/10.1038/nature07568>
- Roy, P.H., Tetu, S.G., Larouche, A., Elbourne, L., Tremblay, S., Ren, Q., Dodson, R., Harkins, D., Shay, R., Watkins, K., Mahamoud, Y., Paulsen, I.T., 2010. Complete Genome Sequence of the Multiresistant Taxonomic Outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PLoS ONE* 5, e8842. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008842>
- Rudra, B., Duncan, L., Shah, A.J., Shah, H.N., Gupta, R.S., 2022. Phylogenomic and comparative genomic studies robustly demarcate two distinct clades of *Pseudomonas aeruginosa* strains: proposal to transfer the strains from an outlier clade to a novel species *Pseudomonas paraaeruginosa* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 72. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005542>
- Ruhe, Z.C., Subramanian, P., Song, K., Nguyen, J.Y., Stevens, T.A., Low, D.A., Jensen, G.J., Hayes, C.S., 2018. Programmed Secretion Arrest and Receptor-Triggered Toxin Export during Antibacterial Contact-Dependent Growth Inhibition. *Cell* 175, 921-933.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.033>
- Ruhe, Z.C., Townsley, L., Wallace, A.B., King, A., Van der Woude, M.W., Low, D.A., Yildiz, F.H., Hayes, C.S., 2015. CDIA promotes receptor-independent intercellular adhesion. *Molecular Microbiology* 98, 175–192. <https://doi.org/10.1111/mmi.13114>
- Rumbaugh, K.P., Sauer, K., 2020. Biofilm dispersion. *Nat Rev Microbiol* 18, 571–586. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0>

- Russell, A.B., Hood, R.D., Bui, N.K., LeRoux, M., Vollmer, W., Mougous, J.D., 2011. Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature* 475, 343–347. <https://doi.org/10.1038/nature10244>
- Ryan Kaler, K.M., Nix, J.C., Schubot, F.D., 2021. RetS inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by disrupting the canonical histidine kinase dimerization interface of GacS. *J Biol Chem* 297, 101193. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101193>
- Rybtke, M., Berthelsen, J., Yang, L., Høiby, N., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., 2015. The LapG protein plays a role in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by controlling the presence of the CdrA adhesin on the cell surface. *Microbiologyopen* 4, 917–930. <https://doi.org/10.1002/mbo3.301>
- Ryu, S.Y., Baek, W.-K., Kim, H.A., 2017. Association of biofilm production with colonization among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Korean J Intern Med* 32, 345–351. <https://doi.org/10.3904/kjim.2015.287>
- Sakuragi, Y., Kolter, R., 2007. Quorum-Sensing Regulation of the Biofilm Matrix Genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189, 5383–5386. <https://doi.org/10.1128/JB.00137-07>
- Sana, T.G., Berni, B., Bleves, S., 2016. The T6SSs of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 and Their Effectors: Beyond Bacterial-Cell Targeting. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00061>
- Santé publique France, Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements antiinfectieux en établissements de santé, mai-juin 2017
- Scales, B.S., Dickson, R.P., LiPuma, J.J., Huffnagle, G.B., 2014. Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. *Clin Microbiol Rev* 27, 927–948. <https://doi.org/10.1128/CMR.00044-14>
- Scheller, E.V., Cotter, P.A., 2015. *Bordetella* filamentous hemagglutinin and fimbriae: critical adhesins with unrealized vaccine potential. *Pathogens and Disease* 73, ftv079. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv079>
- Schembri, M.A., Dalsgaard, D., Klemm, P., 2004. Capsule Shields the Function of Short Bacterial Adhesins. *J Bacteriol* 186, 1249–1257. <https://doi.org/10.1128/JB.186.5.1249-1257.2004>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

- Schmitt, C., Turner, D., Boesl, M., Abele, M., Frosch, M., Kurzai, O., 2007. A Functional Two-Partner Secretion System Contributes to Adhesion of *Neisseria meningitidis* to Epithelial Cells. *J Bacteriol* 189, 7968–7976. <https://doi.org/10.1128/JB.00851-07>
- Secor, P.R., Michaels, L.A., Bublitz, D.C., Jennings, L.K., Singh, P.K., 2022. The Depletion Mechanism Actuates Bacterial Aggregation by Exopolysaccharides and Determines Species Distribution & Composition in Bacterial Aggregates. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12, 869736. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.869736>
- Sentausa, E., Basso, P., Berry, A., Adrait, A., Bellement, G., Couté, Y., Lory, S., Elsen, S., Attrée, I., 2020. Insertion sequences drive the emergence of a highly adapted human pathogen. *Microbial Genomics* 6. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000265>
- Serra, D.O., Conover, M.S., Arnal, L., Sloan, G.P., Rodriguez, M.E., Yantorno, O.M., Deora, R., 2011. FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PLoS One* 6, e28811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028811>
- Shaver, C.M., Hauser, A.R., 2004. Relative Contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to Virulence in the Lung. *Infect Immun* 72, 6969–6977. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.6969-6977.2004>
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimitz, M., Römling, U., 2004. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility: Cyclic di-GMP turnover by GGDEF and EAL domains. *Molecular Microbiology* 53, 1123–1134. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04206.x>
- Singh, M., Sykes, E.M.E., Li, Y., Kumar, A., 2020. MexXY RND pump of *Pseudomonas aeruginosa* PA7 effluxes bi-anionic β -lactams carbenicillin and sulbenicillin when it partners with the outer membrane factor OprA but not with OprM. *Microbiology* 166, 1095–1106. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000971>
- Skerker, J.M., Berg, H.C., 2001. Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6901–6904. <https://doi.org/10.1073/pnas.121171698>
- Sorroche, F.G., Spesia, M.B., Zorreguieta, Á., Giordano, W., 2012. A Positive Correlation between Bacterial Autoaggregation and Biofilm Formation in Native *Sinorhizobium meliloti* Isolates from Argentina. *Appl Environ Microbiol* 78, 4092–4101. <https://doi.org/10.1128/AEM.07826-11>
- Speare, L., Smith, S., Salvato, F., Kleiner, M., Septer, A.N., 2020. Environmental Viscosity Modulates Interbacterial Killing during Habitat Transition. *mBio* 11, e03060-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.03060-19>
- St Geme, J.W., Falkow, S., Barenkamp, S.J., 1993. High-molecular-weight proteins of nontypable *Haemophilus influenzae* mediate attachment to human epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 2875–2879. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.7.2875>

- Staudinger, B.J., Muller, J.F., Halldórsson, S., Boles, B., Angermeyer, A., Nguyen, D., Rosen, H., Baldursson, Ó., Gottfreðsson, M., Guðmundsson, G.H., Singh, P.K., 2014. Conditions Associated with the Cystic Fibrosis Defect Promote Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *Am J Respir Crit Care Med* 189, 812–824. <https://doi.org/10.1164/rccm.201312-2142OC>
- Stubenrauch, C. J., & Lithgow, T. (2019). The TAM: A Translocation and Assembly Module of the β -Barrel Assembly Machinery in Bacterial Outer Membranes. *EcoSal Plus*, 8(2), 10.1128/ecosalplus.ESP-0036-2018. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0036-2018>
- Subedi, D., Vijay, A.K., Kohli, G.S., Rice, S.A., Willcox, M., 2018. Comparative genomics of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different geographic sites. *Sci Rep* 8, 15668. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34020-7>
- Swihart, K.G., Welch, R.A., 1990. Cytotoxic activity of the *Proteus* hemolysin HpmA. *Infect Immun* 58, 1861–1869. <https://doi.org/10.1128/iai.58.6.1861-1869.1990>
- Talà, L., Fineberg, A., Kukura, P., Persat, A., 2019. *Pseudomonas aeruginosa* orchestrates twitching motility by sequential control of type IV pili movements. *Nat Microbiol* 4, 774–780. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0378-9>
- Travier, L., Guadagnini, S., Gouin, E., Dufour, A., Chenal-Francisque, V., Cossart, P., Olivo-Marin, J.-C., Ghigo, J.-M., Disson, O., Lecuit, M., 2013. ActA promotes *Listeria monocytogenes* aggregation, intestinal colonization and carriage. *PLoS Pathog* 9, e1003131. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003131>
- Trouillon, J., Attrée, I., Elsen, S., 2023. The regulation of bacterial two-partner secretion systems. *Molecular Microbiology* mmi.15112. <https://doi.org/10.1111/mmi.15112>
- Trouillon, J., Sentausa, E., Ragno, M., Robert-Genthon, M., Lory, S., Attrée, I., Elsen, S., 2020. Species-specific recruitment of transcription factors dictates toxin expression. *Nucleic Acids Research* 48, 2388–2400. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1232>
- Tsirigotaki, A., De Geyter, J., Šoštarić, N., Economou, A., Karamanou, S., 2017. Protein export through the bacterial Sec pathway. *Nat Rev Microbiol* 15, 21–36. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.161>
- Tuon, F.F., Dantas, L.R., Suss, P.H., Tasca Ribeiro, V.S., 2022. Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review. *Pathogens* 11, 300. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030300>
- Turner, K.H., Wessel, A.K., Palmer, G.C., Murray, J.L., Whiteley, M., 2015. Essential genome of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 4110–4115. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419677112>
- Ulett, G. C., Valle, J., Beloin, C., Sherlock, O., Ghigo, J. M., & Schembri, M. A. (2007). Functional analysis of antigen 43 in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in long-

term persistence in the urinary tract. *Infection and immunity*, 75(7), 3233–3244.
<https://doi.org/10.1128/IAI.01952-06>

Valentini, M., Gonzalez, D., Mavridou, D.A., Filloux, A., 2018. Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Opinion in Microbiology* 41, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.11.006>

Valle, J., Da Re, S., Henry, N., Fontaine, T., Balestrino, D., Latour-Lambert, P., Ghigo, J.-M., 2006. Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12558–12563. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605399103>

Valot, B., Guyeux, C., Rolland, J.Y., Mazouzi, K., Bertrand, X., Hocquet, D., 2015. What It Takes to Be a *Pseudomonas aeruginosa*? The Core Genome of the Opportunistic Pathogen Updated. *PLoS ONE* 10, e0126468.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126468>

van der Woude, M. W., & Henderson, I. R. (2008). Regulation and function of Ag43 (flu). *Annual review of microbiology*, 62, 153–169.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162938>

Ventre, I., Goodman, A.L., Vallet-Gely, I., Vasseur, P., Soscia, C., Molin, S., Bleves, S., Lazdunski, A., Lory, S., Filloux, A., 2006. Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 171–176. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507407103>

Vesga, P., Flury, P., Vacheron, J., Keel, C., Croll, D., & Maurhofer, M. (2020). Transcriptome plasticity underlying plant root colonization and insect invasion by *Pseudomonas protegens*. *The ISME journal*, 14(11), 2766–2782. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0729-9>

Vestby, L.K., Grønseth, T., Simm, R., Nesse, L.L., 2020. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics (Basel)* 9, 59.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9020059>

Vetrivel, A., Ramasamy, M., Vetrivel, P., Natchimuthu, S., Arunachalam, S., Kim, G.-S., Murugesan, R., 2021. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Its Control. *Biologics* 1, 312–336. <https://doi.org/10.3390/biologics1030019>

Waite, R.D., Papakonstantinou, A., Littler, E., Curtis, M.A., 2005. Transcriptome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* growth: comparison of gene expression in planktonic cultures and developing and mature biofilms. *J Bacteriol* 187, 6571–6576.
<https://doi.org/10.1128/JB.187.18.6571-6576.2005>

Walker, G., Hertle, R., Braun, V., 2004. Activation of *Serratia marcescens* hemolysin through a conformational change. *Infect Immun* 72, 611–614.
<https://doi.org/10.1128/IAI.72.1.611-614.2004>

- Wang, C., Ye, F., Kumar, V., Gao, Y.-G., Zhang, L.-H., 2014. BswR controls bacterial motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through modulation of the small RNA *rsmZ*. *Nucleic Acids Research* 42, 4563–4576. <https://doi.org/10.1093/nar/gku106>
- Wattam, A.R., Davis, J.J., Assaf, R., Boisvert, S., Brettin, T., Bun, C., Conrad, N., Dietrich, E.M., Disz, T., Gabbard, J.L., Gerdes, S., Henry, C.S., Kenyon, R.W., Machi, D., Mao, C., Nordberg, E.K., Olsen, G.J., Murphy-Olson, D.E., Olson, R., Overbeek, R., Parrello, B., Pusch, G.D., Shukla, M., Vonstein, V., Warren, A., Xia, F., Yoo, H., Stevens, R.L., 2017. Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center. *Nucleic Acids Res* 45, D535–D542. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1017>
- Webb, J.S., Nikolakakis, K.C., Willett, J.L.E., Aoki, S.K., Hayes, C.S., Low, D.A., 2013. Delivery of CdiA Nuclease Toxins into Target Cells during Contact-Dependent Growth Inhibition. *PLoS ONE* 8, e57609. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057609>
- Webster, S.S., Mathelié-Guinlet, M., Verissimo, A.F., Schultz, D., Viljoen, A., Lee, C.K., Schmidt, W.C., Wong, G.C.L., Dufrêne, Y.F., O'Toole, G.A., 2022. Force-Induced Changes of PilY1 Drive Surface Sensing by *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 13, e03754-21. <https://doi.org/10.1128/mbio.03754-21>
- Wettstadt, S., Wood, T.E., Fecht, S., Filloux, A., 2019. Delivery of the *Pseudomonas aeruginosa* Phospholipase Effectors PldA and PldB in a VgrG- and H2-T6SS-Dependent Manner. *Front. Microbiol.* 10, 1718. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01718>
- WHO Regional Office for Europe/European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 – 2020 data. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2022
- Willett, J.L.E., Ruhe, Z.C., Goulding, C.W., Low, D.A., Hayes, C.S., 2015. Contact-Dependent Growth Inhibition (CDI) and CdiB/CdiA Two-Partner Secretion Proteins. *Journal of Molecular Biology* 427, 3754–3765. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.010>
- Wilpiseski, R.L., Aufrecht, J.A., Retterer, S.T., Sullivan, M.B., Graham, D.E., Pierce, E.M., Zablocki, O.D., Palumbo, A.V., Elias, D.A., 2019. Soil Aggregate Microbial Communities: Towards Understanding Microbiome Interactions at Biologically Relevant Scales. *Appl Environ Microbiol* 85, e00324-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00324-19>
- Wine, J.J., Hansson, G.C., König, P., Joo, N.S., Ermund, A., Pieper, M., 2018. Progress in understanding mucus abnormalities in cystic fibrosis airways. *Journal of Cystic Fibrosis* 17, S35–S39. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.09.003>
- Winter, L.E., Barenkamp, S.J., 2016. Naturally Acquired HMW1- and HMW2-Specific Serum Antibodies in Adults and Children Mediate Opsonophagocytic Killing of Nontypeable

Haemophilus influenzae. Clin Vaccine Immunol 23, 37–46.
<https://doi.org/10.1128/CVI.00502-15>

Winter, L.E., Barenkamp, S.J., 2014. Antibodies to the HMW1/HMW2 and Hia adhesins of nontypeable *haemophilus influenzae* mediate broad-based opsonophagocytic killing of homologous and heterologous strains. Clin Vaccine Immunol 21, 613–621.
<https://doi.org/10.1128/CVI.00772-13>

Wood, G.E., Dutro, S.M., Totten, P.A., 1999. Target Cell Range of *Haemophilus ducreyi* Hemolysin and Its Involvement in Invasion of Human Epithelial Cells. Infect Immun 67, 3740–3749. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.8.3740-3749.1999>

Wu, D.C., Chan, W.W., Metelitsa, A.I., Fiorillo, L., Lin, A.N., 2011. Pseudomonas Skin Infection: Clinical Features, Epidemiology, and Management. American Journal of Clinical Dermatology 12, 157–169. <https://doi.org/10.2165/11539770-000000000-00000>

Wu, X., Monchy, S., Taghavi, S., Zhu, W., Ramos, J., van der Lelie, D., 2011. Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. FEMS microbiology reviews 35, 299–323. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00249.x>

Xiao, L., Zhou, L., Sun, C., Feng, X., Du, C., Gao, Y., Ji, Q., Yang, S., Wang, Y., Han, W., Pr, L., Lei, L., 2012. Apa is a trimeric autotransporter adhesin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* responsible for autoagglutination and host cell adherence. J. Basic Microbiol. 52, 598–607. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100365>

Yen, M.-R., Peabody, C.R., Partovi, S.M., Zhai, Y., Tseng, Y.-H., Saier, M.H., 2002. Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1562, 6–31. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00359-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00359-0)

Yin, W., Wang, Y., Liu, L., He, J., 2019. Biofilms: The Microbial “Protective Clothing” in Extreme Environments. IJMS 20, 3423. <https://doi.org/10.3390/ijms20143423>

Zafar, F., Shahid, M., Fatima, H., Riaz, M., Anjum, F., Mushtaq, Z., Zia, S., Jahangir, M.M., Aslam, M.A., 2022. Antibiofilm and Quorum Sensing Inhibition (QSI) Potential of *Lagerstroemia speciosa* Leaves Extract. Dose Response 20, 15593258221132080. <https://doi.org/10.1177/15593258221132080>

Zan, J., Liu, Y., Fuqua, C., & Hill, R. T. (2014). Acyl-homoserine lactone quorum sensing in the *Roseobacter* clade. *International journal of molecular sciences*, 15(1), 654–669. <https://doi.org/10.3390/ijms15010654>

Zhang, D., de Souza, R.F., Anantharaman, V., Iyer, L.M., Aravind, L., 2012. Polymorphic toxin systems: Comprehensive characterization of trafficking modes, processing,

mechanisms of action, immunity and ecology using comparative genomics. *Biol Direct* 7, 18. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-7-18>

Zhang, P., Chomel, B.B., Schau, M.K., Goo, J.S., Droz, S., Kelminson, K.L., George, S.S., Lerche, N.W., Koehler, J.E., 2004. A family of variably expressed outer-membrane proteins (Vomp) mediates adhesion and autoaggregation in *Bartonella quintana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 13630–13635. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405284101>

Annexes

Annexe 1 : Liste des communications

- Participation et présentation flash de ma thèse au séminaire GRAL en juin 2021
- Participation et présentation d'un poster lors de la journée scientifique de l'IBS en juin 2022
- Participation et présentation d'un poster lors de la journée des doctorants organisée par l'EDCSV en juin 2022
- Participation et présentation d'un poster lors de la journée GRAL en juillet 2022
- Participation et présentation d'un poster au séminaire SFM en octobre 2022
- Participation et présentation orale à un mini colloque Pseudomonas en octobre 2022
- Participation et présentation orale de ma thèse au séminaire Bacto-Gre en février 2023
- Participation et présentation d'un poster au séminaire 48h GRAL en mars 2023

Annexe 2 : Poster présenté à la journée de l'IBS 2022



PdtA, a 430 kDa protein of *Pseudomonas aeruginosa*

Adèle RENIER¹, Antoine MAILLARD¹, Yvan CASPAR^{1,2}, Daphna FENEL³ and Ina ATTREE¹



¹Université Grenoble Alpes, Institute of Structural Biology, Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses Team, UMR5075 CNRS, IRIG, CEA, Grenoble, France

²Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie et de Pathologie, CHU de Grenoble Grenoble, France

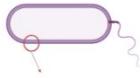
³Université Grenoble Alpes, Institut de Biologie Structurale, Methods and Electron Microscopy team UMR5075 Grenoble France



Introduction

- ◆ *Pseudomonas aeruginosa* is a rod-shaped Gram-negative pathogen
- ◆ Major human opportunistic pathogen
- ◆ Highly resistant to antibiotics
- ◆ WHO critical priority list (Organization, 2019)

→ Need to find new therapeutic targets



Two Partner Secretion (TPS) system

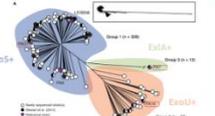
- ◆ TpsB : transporter of Omp85 superfamily
- Channel-forming β -barrel in the outer membrane
- ◆ TspA: large effector protein
- Repeated sequences that are predicted to form β -solenoid structures

Mazar et al, 2007 Trends in Microbiology

Objectives

Study the function and structure of PdtA

Evaluate the presence of antibodies anti-PdtA in patients' sera and their efficiency against *P. aeruginosa* infections



Freschi et al, 2015 Frontiers in Microbiology
Phylogenetic tree showing the three major groups of *P. aeruginosa* strains and their major toxin

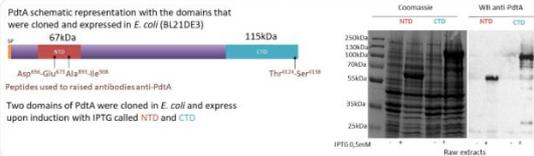
- PdtA**
- ◆ TPS system in *P. aeruginosa*
 - ◆ Function still unknown
 - ◆ Well conserved in several *P. aeruginosa* strains
 - ◆ Antibodies anti-PdtA identified in patients
 - Good candidate for a vaccine or a monoclonal-antibodies based therapy

Methods

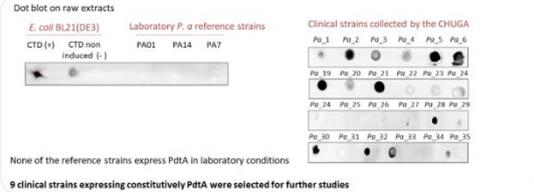
- ◆ Cloning domains of PdtA in *E. coli*, deletion of *pdtA* and *pdtB* in *P. aeruginosa*
- ◆ Synthesis and localisation of PdtA in clinical strains (dot blot, western blot)
- ◆ Visualization of PdtA by immunofluorescence, transmission electronic microscopy
- ◆ Functionality tests *in vitro* (adhesion assay, cytotoxicity test)
- ◆ *Galleria* and *Drosophila* models to test the implication of PdtA in virulence *in vivo*
- ◆ Detection of antibodies anti-PdtA in patients' sera (dot blot, ELISA assay)

Results

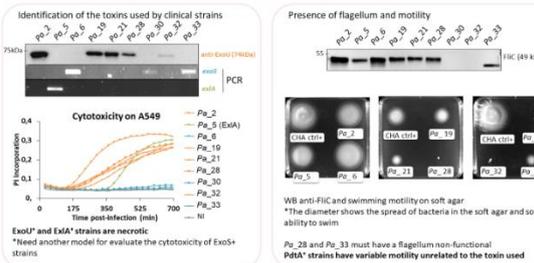
1. Antibodies raised against polypeptides recognize N and C terminal parts of the protein



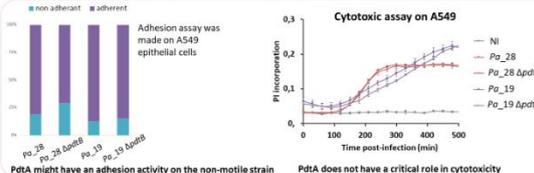
2. PdtA synthesis in clinical and laboratory strains is variable



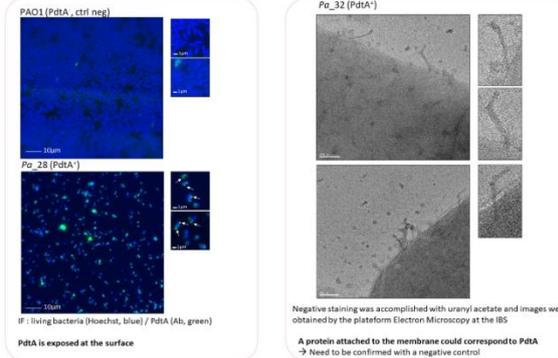
3. PdtA⁺ clinical strains have variable toxin(s) content and motility



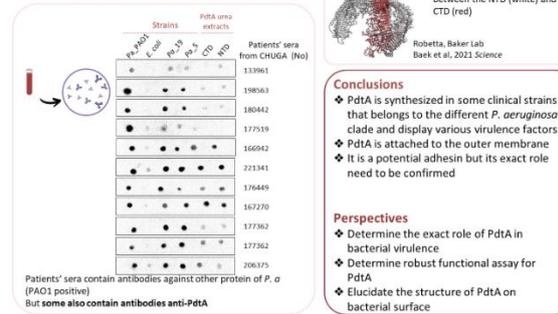
4. Functional assay on PdtA⁺ strains and a Δ pdtB mutant (preliminary results)



5. PdtA forms a membrane-attached structures



6. Some patients' sera have antibodies anti-PdtA



Annexe 3 : Présentation d'un poster lors de la SFM en octobre 2022

PdtA, a 430kDa protein of *Pseudomonas aeruginosa*

Adèle RENIER¹, Antoine MAILLARD¹, Yvan CASPAR^{1,2}, Daphna FENEL³ and Ina ATTREE¹

¹Université Grenoble Alpes, Institute of Structural Biology, Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses Team, Grenoble

²Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie et de Pathologie, CHU de Grenoble Grenoble

³Université Grenoble Alpes, Institut de Biologie Structurale, Methods and Electron Microscopy Grenoble

Introduction and objectives

Pseudomonas aeruginosa (*Pa*) is a gram-negative opportunistic human pathogen that can lead to both acute and chronic infections. It is now a huge threat to human health as it is highly resistant to antibiotics. To treat *Pa* infections, anti-virulence approaches are explored that target essential bacterial factors for infection, such as virulence factor. *Pa* has a panoply of surface-attached and exported proteins involved in virulence that can be secreted by several ways, including Two Partner Secretion (TPS) systems. *Pa* encodes for at least five TPS whose substrates are: LepA protease, CdiA (contact-dependent growth inhibition), CdrA adhesin, Exolysin (ExlA) a pore-forming toxin and PdtA a filamentous hemagglutinin (FHA)-like adhesion recently identified. My project concerns PdtA protein that belongs to the HMW adhesion family of proteins with HMW1 of *Haemophilus influenzae*, an adhesin known to be highly immunogenic (Winter and Barenkamp, 2016). We know that PdtA is expressed during infection as antibodies raised against PdtA were found in patients' sera (Llamas et al., 2009) and the protein is well conserved in clinical strains that is why it is a potential candidate for a vaccine or for monoclonal antibodies based therapy. However, the studies on PdtA were impeded due to the lack of laboratory strains expressing the protein.

Material and methods

We used dot blots and western blots to identify clinical strains that express PdtA. We used those strains as a model for studying PdtA and first, we characterize those strains by identifying their toxins, their cytotoxicity and their motility. Then we made *ptdB* and *pdtA* mutants in those strains and performed functionality tests *in vitro* (cytotoxicity, adhesion). In order to visualize and localize PdtA, we performed immunofluorescence and electron microscopy. Finally, we screened patient's sera collected by the CHUGA to see if they contain antibodies anti-PdtA.

Results

We selected and characterized 9 clinical strains expressing constitutively PdtA, that present different toxin content and motility. We saw by immunofluorescence that PdtA is exposed at the cell surface and preliminary functionality test showed that PdtA might be involved in adhesion to eucariotic cells.

Structural and functional exploration of PdtA, a 430kDa protein of *Pseudomonas aeruginosa*

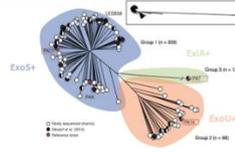
Adèle RENIER¹, Antoine MAILLARD¹, Yvan CASPAR^{1,2}, Daphna FENEL³ and Ina ATTREE¹

¹Université Grenoble Alpes, Institute of Structural Biology, Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses Team, UMR5075 CNRS, IRIG, CEA, Grenoble, France
²Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie et de Pathologie, CHU de Grenoble, France
³Université Grenoble Alpes, Institut de Biologie Structurale, Methods and Electron Microscopy team UMR5075 Grenoble France

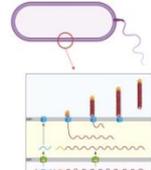
Introduction

Pseudomonas aeruginosa:

- ◆ Rod-shaped Gram-negative bacteria
 - ◆ Major human opportunistic pathogen
 - ◆ Highly resistant to antibiotics
 - ◆ WHO critical priority list (Organization, 2019)
- Need to find new therapeutic targets



Freschi et al, 2015 *Frontiers in Microbiology*
Phylogenetic tree showing the three major groups of *P. aeruginosa* strains and their major toxin



Two Partner Secretion (TPS) system

- ◆ TpsB: transporter of the Omp85 superfamily
→ Channel-forming β-barrel in the outer membrane
- ◆ TpsA: large effector protein
→ Repeated sequences that are predicted to form β-solenoid structures

PdtA

- ◆ TPS system in *P. aeruginosa*
- ◆ Present in several *P. aeruginosa* strains
- ◆ *pdtA* genes up regulated during infection
- ◆ Antibodies against PdtA identified in patients
- ◆ Function still unknown

Laura Faure et al, 2014 *Microbiology*
Otero-Asman et al, 2020 *Scientific Reports* vol 10
Llamas et al, 2009 *PLoS Pathogens*

Objectives

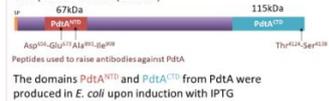
Study the function and structure of PdtA

Evaluate the presence of anti-PdtA antibodies in patients' sera and their efficiency against *P. aeruginosa* infections

Results

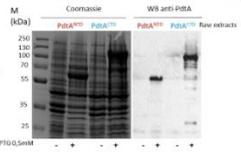
1. Antibodies recognize N-terminal and C-terminal parts of PdtA

PdtA schematic representation with the domains that were produced in *E. coli* (BL21DE3)



Peptides used to raise antibodies against PdtA

The domains PdtA^{NTD} and PdtA^{CTD} from PdtA were produced in *E. coli* upon induction with IPTG



2. PdtA synthesis in clinical and laboratory strains is variable

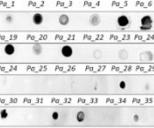
Dot blot on raw bacterial extracts



None of the reference strains produced PdtA in laboratory conditions

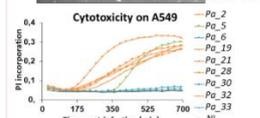
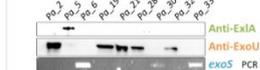
9 clinical strains constitutively expressing PdtA were selected for further studies

Clinical strains (CHUGA)



3. PdtA⁺ clinical strains have variable toxin(s) content and motility

Identification of the toxins used by clinical strains

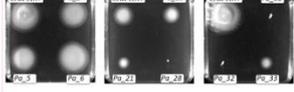
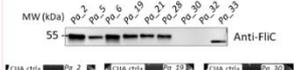


ExoU⁺ and ExoS⁺ strains are necrotic

*Need another model to evaluate the cytotoxicity of ExoS⁺ strains

The three main toxins are associated with PdtA

Presence of flagellum and motility

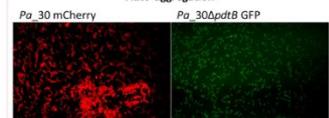


WB anti-FliC and swimming motility on soft agar
*The diameter reflects the spread of bacteria in soft agar i.e. its ability to swim
Four strains are non-motile: they lack a functional flagellum

PdtA⁺ strains have variable motility

4. Functional assay on PdtA⁺ strains and a Δ pdtB mutant

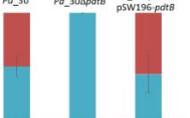
Auto-aggregation



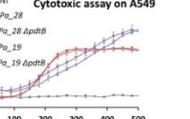
PdtA has adhesive properties with a role in adhesion to epithelial cells A549 and in auto-aggregation

PdtA does not have a critical role in cytotoxicity

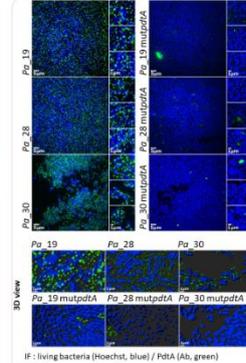
Adhesion on A549



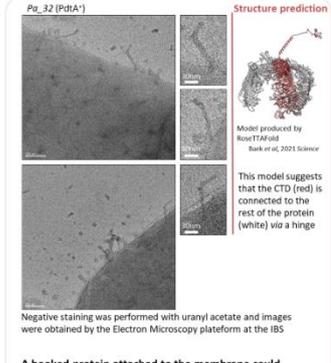
Cytotoxic assay on A549



5. PdtA forms a membrane-attached structure

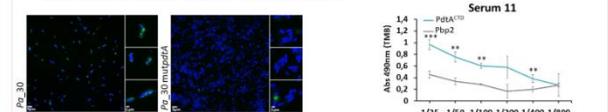
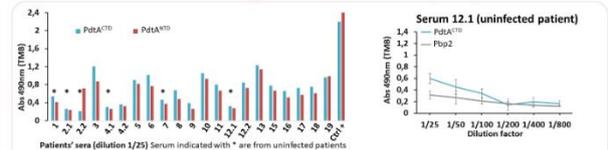


IF: living bacteria (Hoechst, blue) / PdtA (Ab, green)
PdtA is exposed at the surface



A hooked protein attached to the membrane could correspond to PdtA (preliminary result)

6. Patients infected with Pa developed anti-PdtA antibodies (ELISA)



Most of patients' sera infected with Pa contains anti-PdtA antibodies
One out of three tested recognized PdtA at the bacterial surface

Conclusions

- ◆ PdtA is synthesized in some clinical strains that display any major virulence factor: ExoU, ExoS and ExA
- ◆ PdtA is attached to the outer membrane
- ◆ PdtA has adhesive properties but its exact role in infection needs to be elucidated

Perspectives

- ◆ Determine the exact role of PdtA in bacterial virulence
- ◆ Test the efficacy of anti-PdtA antibodies to inhibit PdtA's adhesive properties
- ◆ Elucidate the structure of PdtA on bacterial surface

Acknowledgments

This work was financed by the labex GRAL PhD scholarship (2020-2023). This work used the EM facilities at the Grenoble Instruct-ERIC Center (ISBG; UAR 3518 CNRS CEA-IGA-EMBL) with support from the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI; ANR-10-INSB-0005-02) and GRAL, a project of the University Grenoble Alpes graduate school (Ecoles Universitaires de Recherche) CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003) within the Grenoble Partnership for Structural Biology. The IBS Electron Microscope facility is supported by the Auvergne Rhône-Alpes Region, the Fonds Feder, the Fondation pour la Recherche Médicale and GIS-IBISA.

Annexe 4 : Communication orale à un mini colloque *Pseudomonas*

PdtA, une protéine de 430kDa de *Pseudomonas aeruginosa*

Adèle RENIER¹, Antoine MAILLARD¹, Yvan CASPAR^{1,2}, Daphna FENEL³ and Ina ATTREE¹

¹Université Grenoble Alpes, Institute of Structural Biology, Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses Team, Grenoble

²Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie et de Pathologie, CHU de Grenoble Grenoble

³Université Grenoble Alpes, Institut de Biologie Structurale, Methods and Electron Microscopy Grenoble

Pseudomonas aeruginosa (*Pa*) possède plusieurs systèmes de sécrétion qui lui permettent d'exporter des protéines aux propriétés diverses, dont le système de sécrétion à deux partenaires (TPS). *Pa* possède au moins cinq TPS : LepA (protéase), CdiA (contact-dependent growth inhibition), CdrA (adhésine), Exolysin ExlA (pore-forming toxin) et PdtA, une hémagglutinine filamenteuse (FHA)-like adhésine (Guerin et al., 2017). La protéine PdtA appartient à la famille des HMW adhésines (Faure et al., 2014), comme HMW1 de *Haemophilus influenzae* connue pour ses propriétés immunogéniques.

Le gène *pdtA* est conservé parmi les différentes souches de *Pa* et des anticorps anti-PdtA ont été détectés chez des patients infectés à *Pa* (Llamas et al., 2009). Faure et al (Faure et al., 2014) ont montré que PdtA formait un TPS avec PdtB, et que sa production était activée lors de la déplétion de phosphate organique dans le milieu. Cependant son rôle exact, sa structure et son implication dans la virulence (Faure et al., 2014; Llamas et al., 2009) restent inconnus.

En utilisant des anticorps polyclonaux spécifiques nous avons pu examiner la synthèse de PdtA. Les souches de référence (PAO1, PA7 et PA14) ne la synthétisent pas, cependant la protéine peut être détectée chez certaines souches cliniques. En effet sur une collection de 46 souches cliniques isolées de patients ayant contracté une bactériémie à *Pa*, 9 synthétisent la protéine dans nos conditions de laboratoire. Nous avons utilisé ces souches comme modèle pour étudier PdtA.

Nous avons montré que PdtA a un rôle dans l'auto agrégation des bactéries en comparant une souche clinique sauvage et la souche $\Delta pdtB$. En utilisant les anticorps polyclonaux spécifiques nous avons imagé par microscopie confocale PdtA à la surface de trois souches cliniques. Nous avons ainsi montré qu'il y avait en moyenne 5 unités PdtA à la surface des bactéries. Nous avons également examiné par ELISA plusieurs sérums de patients ayant la mucoviscidose et ayant contracté une infection à *Pa* et avons trouvé que la majorité des sérums contenaient des anticorps anti-PdtA. Finalement nous avons examiné par microscopie électronique la surface des bactéries pour visualiser PdtA.

Annexe 5 : Communication orale lors du séminaire Bacto-Gre en février 2023

Structural and functional exploration on PdtA, a 430kDa protein of *Pseudomonas aeruginosa*

Adèle RENIER¹, Antoine MAILLARD¹, Yvan CASPAR^{1,2}, Daphna FENEL³ and Ina ATTREE¹

¹Université Grenoble Alpes, Institute of Structural Biology, Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses Team, Grenoble

²Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie et de Pathologie, CHU de Grenoble Grenoble

³Université Grenoble Alpes, Institut de Biologie Structurale, Methods and Electron Microscopy Grenoble

Pseudomonas aeruginosa (*Pa*) has several secretion systems that allow the exportation of proteins with diverse properties, including the two-partner secretion system (TPS). *Pa* has at least five TPSs: LepA (protease), CdiA (contact-dependent growth inhibition), CdrA (adhesin), Exolysin ExlA (pore-forming toxin) and PdtA, a filamentous hemagglutinin (FHA)-like adhesin[1]. PdtA belongs to the HMW family of adhesins [2], such as HMW1 from *Haemophilus influenzae*, known for its immunogenic properties.

The *pdtA* gene is conserved among different strains of *Pa* and anti-PdtA antibodies have been detected in patients infected with *Pa* 3. Faure et al [2] showed that PdtA forms a TPS with PdtB, and that its production is activated upon depletion of organic phosphate in the medium. However, its exact role, structure and involvement in virulence [2,3] remain unknown.

We examined PdtA synthesis with specific polyclonal antibodies in a cohort of clinical strains. While reference strains (PAO1, PA7 and PA14) do not synthesize the protein, PdtA is detected in several clinical strains, independently of their origin or phylogenetic affiliation. We imaged by confocal microscopy PdtA on the surface of three clinical strains. This result suggests that there are about five PdtA structures on the surface of bacteria.

We showed that PdtA has a role in bacterial auto-aggregation by comparing a wild-type clinical strain and the mutant strains, Δ pdtB and Δ pdtA. We also examined by ELISA several sera from patients with cystic fibrosis who contracted *Pa* infection and found that the majority of sera contained anti-PdtA antibodies.

Annexe 6 : Poster présenté au séminaire 48h GRAL



Structural and functional exploration of PdtA, a 430kDa protein of *Pseudomonas aeruginosa*

Adèle RENIER¹, Antoine MAILLARD¹, Yvan CASPAR^{1,2}, Daphna FENEL³ and Ina ATTREE¹

¹Université Grenoble Alpes, Institute of Structural Biology, Bacterial Pathogenesis and Cellular Responses Team, UMR5075 CNRS, IRIG, CEA, Grenoble, France

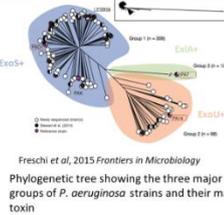
²Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie et de Pathologie, CHU de Grenoble, France

³Université Grenoble Alpes, Institut de Biologie Structurale, Methods and Electron Microscopy team UMR5075 Grenoble France

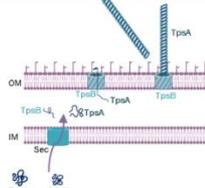
Introduction

Pseudomonas aeruginosa:

- ◆ Rod-shaped Gram-negative bacteria
 - ◆ Major human opportunistic pathogen
 - ◆ Highly resistant to antibiotics
 - ◆ WHO critical priority list (Organization, 2019)
- Need to find new therapeutic targets



Freschi et al, 2015 Frontiers in Microbiology
Phylogenetic tree showing the three major groups of *P. aeruginosa* strains and their major toxin



Two Partner Secretion (TPS) system

- ◆ TpsB : transporter of the Omp85 superfamily
→ Channel-forming β -barrel in the outer membrane
- ◆ TpsA : large effector protein
→ Repeated sequences that are predicted to form β -solenoid structures

PdtA

- ◆ TPS system in *P. aeruginosa*
- ◆ Present in several *P. aeruginosa* strains
- ◆ *pdtA* genes up regulated during infection
- ◆ Antibodies against PdtA identified in patients
- ◆ Function still unknown

Laura Faure et al, 2014 Microbiology
Otero-Asman et al, 2020 Scientific Reports vol 10
Llamas et al, 2009 PLOS Pathogens

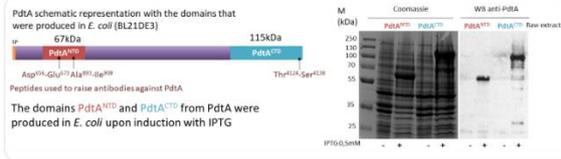
Objectives

Study the function and structure of PdtA

Evaluate the presence of anti-PdtA antibodies in patients' sera and their efficiency against *P. aeruginosa* infections

Results

1. Antibodies recognize N-terminal and C-terminal parts of PdtA



The domains PdtA^{NTD} and PdtA^{CTD} from PdtA were produced in *E. coli* upon induction with IPTG

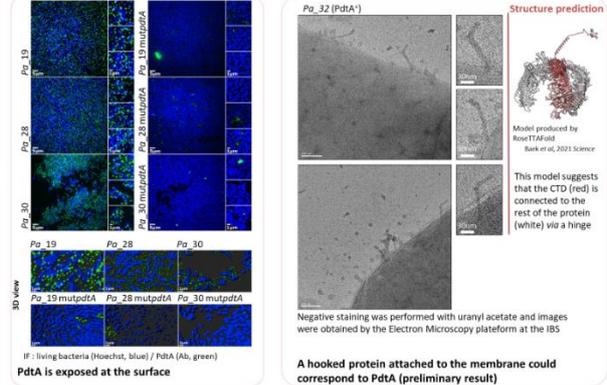
Peptides used to raise antibodies against PdtA

Asp⁶⁹, Glu⁷⁷, Ala¹⁹⁵, Epa¹⁹⁸, Thr⁴¹⁴, Ser⁴²⁸

Peptides used to raise antibodies against PdtA

Asp⁶⁹, Glu⁷⁷, Ala¹⁹⁵, Epa¹⁹⁸, Thr⁴¹⁴, Ser⁴²⁸

5. PdtA forms a membrane-attached structure



IF: living bacteria (Hoechst, blue) / PdtA (Ab, green)

PdtA is exposed at the surface

A hooked protein attached to the membrane could correspond to PdtA (preliminary result)

Negative staining was performed with uranyl acetate and images were obtained by the Electron Microscopy platform at the IBS

Model produced by RoseTTAFold

Bank et al, 2021 Science

This model suggests that the CTD (red) is connected to the rest of the protein (white) by a hinge

A hooked protein attached to the membrane could correspond to PdtA (preliminary result)

Negative staining was performed with uranyl acetate and images were obtained by the Electron Microscopy platform at the IBS

Model produced by RoseTTAFold

Bank et al, 2021 Science

This model suggests that the CTD (red) is connected to the rest of the protein (white) by a hinge

A hooked protein attached to the membrane could correspond to PdtA (preliminary result)

Negative staining was performed with uranyl acetate and images were obtained by the Electron Microscopy platform at the IBS

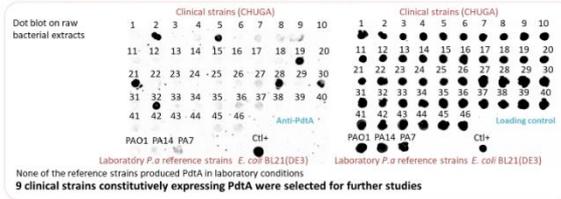
Model produced by RoseTTAFold

Bank et al, 2021 Science

This model suggests that the CTD (red) is connected to the rest of the protein (white) by a hinge

A hooked protein attached to the membrane could correspond to PdtA (preliminary result)

2. PdtA synthesis in clinical and laboratory strains is variable

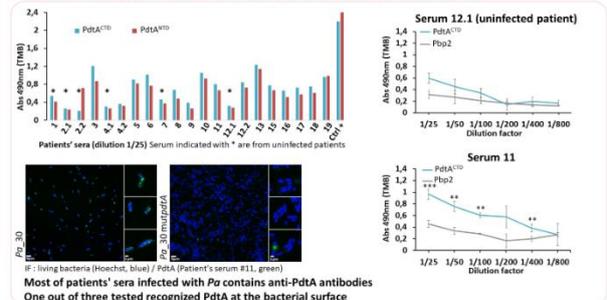


None of the reference strains produced PdtA in laboratory conditions

9 clinical strains constitutively expressing PdtA were selected for further studies

Laboratory *P. a* reference strains: *E. coli* BL21(DE3)

6. Patients infected with *Pa* developed anti-PdtA antibodies (ELISA)



Most of patients' sera infected with *Pa* contains anti-PdtA antibodies

One out of three tested recognized PdtA at the bacterial surface

4

Annexe 7: Alignement complet de PdtA

```
1 10 20 30 40 50
PaG28 ..MPSRPFVPSSTVTVSLDGGIPRLKPLAQITALLMVAGGAQAS.OPFSAAWFAAKGAOQ
PaG30 ..MPSRPFVPSSTVTVSLDGGIPRLKPLAQITALLMVAGGAQAS.OPFSAAWFAAKGAOQ
PA14 ..MPSRPFVPSSTVTVSLDGGIPRLKPLAQITALLMVAGGAQAS.OPFSAAWFAAKGAOQ
PaG2 ..MPSRPFVPSSTVTVSLDGGIPRLKPLAQITALLMVAGGAQAS.OPFSAAWFAAKGAOQ
PaG19 ..MPSRPFVPSSTVTVSLDGGIPRLKPLAQITALLMVAGGAQAS.OPFSAAWFAAKGAOQ
PaG5 ..MPSRPSAPSSTVTVSLDSSGLPRLKPLAQITALLMVAGGAQAS.OPFSAAWFAAKGAOQ
PA7 MPSRPSRPSAPSTVTVSLDSSGLPRLKPLAQITALLMVAGGAQAS.OPFSAAWFAAKGAOQ
PaG7 .....MPSRSPSSARSRALYAPRLKPLAQITALLMVAGGAQAAG.OPFSAAWFAAKGAOQ
PaG33 .....MPSRSPSSARSRALYAPRLKPLAQITALLMVAGGAQAAG.OPFSAAWFAAKGAOQ
PaG6 .....MPSRSPSSARSRALYAPRLKPLAQITALLMVAGGAQAAG.OPFSAAWFAAKGAOQ
PaG1 .....MPSRSPSSARSRALYAPRLKPLAQITALLMVAGGAQAAG.OPFSAAWFAAKGAOQ
PAO1 .....MPSRSPSSARSRALYAPRLKPLAQITALLMVAGGAQAAG.OPFSAAWFAAKGAOQ
```

```
60 70 80 90 100 110
PaG28 S..AGAAPRPGAQLPGMTPPPLAQQQKVNQOLORSIQNLNNTVAAITAAQQAQAAGROAAL
PaG30 S..AGAAPRPGAQLPGMTPPPLAQQQKVNQOLORSIQNLNNTVAAITAAQQAQAAGROAAL
PA14 S..AGAAPRPGAQLPGMTPPPLAQQQKVNQOLORSIQNLNNTVAAITAAQQAQAAGROAAL
PaG2 S..AGAAPRPGAQLPGMTPPPLAQQQKVNQOLORSIQNLNNTVAAITAAQQAQAAGROAAL
PaG19 S..AGAAPRPGAQLPGMTPPPLAQQQKVNQOLORSIQNLNNTVAAITAAQQAQAAGROAAL
PaG5 S..AGVAPRPGVPLPGMTPPPLAQQQKVNQOLORSIQNLNNTVAAITAAQQAQAAGROAAL
PA7 S..AGVAPRPGVPLPGMTPPPLAQQQKVNQOLORSIQNLNNTVAAITAAQQAQAAGROAAL
PaG7 GGAAGAPRPGAQLPGAPPPPLAQQQKVNQOLORSIQNLNNTVAAITAAQQAQAAGROAAL
PaG33 GGAAGAPRPGAQLPGAPPPPLAQQQKVNQOLORSIQNLNNTVAAITAAQQAQAAGROAAL
PaG6 GGAAGAPRPGAQLPGAPPPPLAQQQKVNQOLORSIQNLNNTVAAITAAQQAQAAGROAAL
PaG1 GGAAGAPRPGAQLPGAPPPPLAQQQKVNQOLORSIQNLNNTVAAITAAQQAQAAGROAAL
PAO1 GGAAGAPRPGAQLPGAPPPPLAQQQKVNQOLORSIQNLNNTVAAITAAQQAQAAGROAAL
```

```
120 130 140 150 160 170
PaG28 AAPTDIPDGLGEGGLKVDASLPFEQAWQNAKAPVQSQADGRTTVTVEQTADRAILNWETF
PaG30 AAPTDIPDGLGEGGLKVDASLPFEQAWQNAKAPVQSQADGRTTVTVEQTADRAILNWETF
PA14 AAPTDIPDGLGEGGLKVDASLPFEQAWQNAKAPVQSQADGRTTVTVEQTADRAILNWETF
PaG2 AAPTDIPDGLGEGGLKVDASLPFEQAWQNAKAPVQSQADGRTTVTVEQTADRAILNWETF
PaG19 AAPTDIPDGLGEGGLKVDASLPFEQAWQNAKAPVQSQADGRTTVTVEQTADRAILNWETF
PaG5 AAPTNIPDGLGEGGLKVDASLPFEQAWQNAKAPVQSQDGGRTTVTVEQTADRAILNWETF
PA7 AAPTNIPDGLGEGGLKVDASLPFEQAWQNAKAPVQSQDGGRTTVTVEQTADRAILNWETF
PaG7 NLPQDVPDGLGEGGLKVDASLPFEQAWQNAKGPVQIQAAAGKTTVSI EQTADRAILNWETF
PaG33 NLPQDVPDGLGEGGLKVDASLPFEQAWQNAKGPVQIQAAAGKTTVSI EQTADRAILNWETF
PaG6 NLPQDVPDGLGEGGLKVDASLPFEQAWQNAKGPVQIQAAAGKTTVSI EQTADRAILNWETF
PaG1 NLPQDVPDGLGEGGLKVDASLPFEQAWQNAKGPVQIQAAAGKTTVSI EQTADRAILNWETF
PAO1 NLPQDVPDGLGEGGLKVDASLPFEQAWQNAKGPVQIQAAAGKTTVSI EQTADRAILNWETF
```

```
180 190 200 210 220 230
PaG28 NIGRQTTLQFDQQSNWAVLNRVNDPSARPSQIQGQIKADGTVMVANRNGVVFSGSSQVNV
PaG30 NIGRQTTLQFDQQSNWAVLNRVNDPSARPSQIQGQIKADGTVMVANRNGVVFSGSSQVNV
PA14 NIGRQTTLQFDQQSNWAVLNRVNDPSARPSQIQGQIKADGTVMVANRNGVVFSGSSQVNV
PaG2 NIGRQTTLQFDQQSNWAVLNRVNDPSARPSQIQGQIKADGTVMVANRNGVVFSGSSQVNV
PaG19 NIGRQTTLQFDQQSNWAVLNRVNDPSARPSQIQGQIKADGTVMVANRNGVVFSGSSQVNV
PaG5 NIGRQTTLRFDDQQSNWAVLNRVNDPSARPSQIQGRTEAGGTVMVANRNGVVFSGSSQVNV
PA7 NIGRQTTLRFDDQQSNWAVLNRVNDPSARPSQIQGRTEAGGTVMVANRNGVVFSGSSQVNV
PaG7 NVGRNTTVDFQOHADWALLNRVNDPSARPSQIQGQIKADGTVMLVNRNGVVFSGSSQVDV
PaG33 NVGRNTTVDFQOHADWALLNRVNDPSARPSQIQGQIKADGTVMLVNRNGVVFSGSSQVDV
PaG6 NVGRNTTVDFQOHADWALLNRVNDPSARPSQIQGQIKADGTVMLVNRNGVVFSGSSQVDV
PaG1 NVGRNTTVDFQOHADWALLNRVNDPSARPSQIQGQIKADGTVMLVNRNGVVFSGSSQVDV
PAO1 NVGRNTTVDFQOHADWALLNRVNDPSARPSQIQGQIKADGTVMLVNRNGVVFSGSSQVDV
```

```
240 250 260 270 280 290
PaG28 RNLVAAAAAISDSQFRERGLYFDANGSQPSFTDAAGAVRVEQGALLQTANPASSTAAGGY
PaG30 RNLVAAAAAISDSQFRERGLYFDANGSQPSFTDAAGAVRVEQGALLQTANPASSTAAGGY
PA14 RNLVAAAAAISDSQFRERGLYFDANGSQPSFTDAAGAVRVEQGSLLQTANPASSTAAGGY
PaG2 RNLVAAAAAISDSQFRERGLYFDANGSQPSFTDAAGAVRVEQGALLQTANPASSTAAGGY
PaG19 RNLVAAAAAISDSQFRERGLYFDANGSQPSFTDAAGAVRVEQGALLQTANPASSTAAGGY
PaG5 RNLVAAAAANISDSQFRERGLYFDANGSQPSFTDAAGAVRVERGALLQSADPASSTAAGGY
PA7 RNLVAAAAANISDIQFRERGLYFDANGSQPSFTDAAGAVRVERGALLQSADPASSTAAGGY
PaG7 RNLTVAAANISDEOFRQRGLYDNGASRPTFTDAAGAVRVEQGAQLRTAAPSGSTRGGGY
PaG33 RNLTVAAANISDEOFRQRGLYDNGASRPTFTDAAGAVRVEQGAQLRTAAPSGSTRGGGY
PaG6 RNLTVAAANISDEOFRQRGLYDNGASRPTFTDAAGAVRVEQGAQLRTAAPSGSTRGGGY
PaG1 RNLTVAAANISDEOFRQRGLYDNGASRPTFTDAAGAVRVEQGAQLRTAAPSGSTRGGGY
PAO1 RNLTVAAANISDEOFRQRGLYDNGASRPTFTDAAGAVRVEQGAQLRTAAPSGSTRGGGY
```

300 310 320 330 340 350
PaG28 VLLLGSEVENAGQIVTPKGOATLAAGDSFYIRRGVGTGDNLRSTTRGNEVATSLAADSAA
PaG30 VLLLGSEVENAGQIVTPKGOATLAAGDSFYIRRGVGTGDNLRSTTRGNEVATSLAADSAA
PA14 VLLLGSEVENAGQIVTPKGOATLAAGDSFYIRRGVGTGDNLRSTTRGNEVATSLAADSAA
PaG2 VLLLGSEVENAGQIVTPKGOATLAAGDSFYIRRGVGTGDNLRSTTRGNEVATSLAADSAA
PaG19 VLLLGSEVENAGQIVTPKGOATLAAGDSFYIRRGVGTGDNLRSTTRGNEVATSLAADSAA
PaG5 VLLLGSEVENAGQIVTPKGOATLAAGDSFYIRRGVGTGDNLRSTTRGNEVATSLAADSAA
PA7 VLLLGSEVENAGQIVTPKGOATLAAGDSFYIRRGVGTGDNLRSTTRGNEVATSLAADSAA
PaG7 VLLLGSEVENAGQIVTPKGOATLAAGDSFYIRRGVGTGDNLRSTTRGNEVATSLAADSAA
PaG33 VLLLGSEVDNAGSIVTPKGOATLAAGDSFYIRRGVGTGDNLRSTTRGNEVATSLAADSAA
PaG6 VLLLGSEVDNAGSIVTPKGOATLAAGDSFYIRRGVGTGDNLRSTTRGNEVATSLAADSAA
PaG1 VLLLGSEVDNAGSIVTPKGOATLAAGDSFYIRRGVGTGDNLRSTTRGNEVATSLAADSAA
PAO1 VLLLGSEVDNAGSIVTPKGOATLAAGDSFYIRRGVGTGDNLRSTTRGNEVATSLAADSAA

360 370 380 390 400 410
PaG28 GRVYNQGLIQAAATGDIITLTCRQVROEGVALSSSSDVRGTIHLNLSASDARGSVVILGEGS
PaG30 GRVYNQGLIQAAATGDIITLTCRQVROEGVALSSSSDVRGTIHLNLSASDARGSVVILGEGS
PA14 GRVYNQGLIQAAATGDIITLTCRQVROEGVALSSSSDVRGTIHLNLSASDARGSVVILGEGS
PaG2 GRVYNQGLIQAAATGDIITLTCRQVROEGVALSSSSDVRGTIHLNLSASDARGSVVILGEGS
PaG19 GRVYNQGLIQAAATGDIITLTCRQVROEGVALSSSSDVRGTIHLNLSASDARGSVVILGEGS
PaG5 GRVYNQGLIQAAATGDIITLTCRQVROEGVALSSSSDVRGTIHLNLSASDARGSVVILGEGS
PA7 GRVYNQGLIQAAATGDIITLTCRQVROEGVALSSSSDVRGTIHLNLSASDARGSVVILGEGS
PaG7 GRVYNQGLIQAAATGDIITLTCRQVROEGVALSSSSDVRGTIHLNLSASDARGSVVILGEGS
PaG33 GRVYNQGLIQAAATGDIITLTCRQVROEGVALSSSSDVRGTIHLNLSASDARGSVVILGEGS
PaG6 GRVYNQGLIQAAATGDIITLTCRQVROEGVALSSSSDVRGTIHLNLSASDARGSVVILGEGS
PaG1 GRVYNQGLIQAAATGDIITLTCRQVROEGVALSSSSDVRGTIHLNLSASDARGSVVILGEGS
PAO1 GRVYNQGLIQAAATGDIITLTCRQVROEGVALSSSSDVRGTIHLNLSASDARGSVVILGEGS

420 430 440 450 460 470
PaG28 TTAVLVDASGAGALDSQRDAQQALDGTPTNNVIGRFDNLSRVA DRSEQSRVEIVSGGS
PaG30 TTAVLVDASGAGALDSQRDAQQALDGTPTNNVIGRFDNLSRVA DRSEQSRVEIVSGGS
PA14 TTAVLVDASGAGALDSQRDAQQALDGTPTNNVIGRFDNLSRVA DRSEQSRVEIVSGGS
PaG2 TTAVLVDASGAGALDSQRDAQQALDGTPTNNVIGRFDNLSRVA DRSEQSRVEIVSGGS
PaG19 TTAVLVDASGAGALDSQRDAQQALDGTPTNNVIGRFDNLSRVA DRSEQSRVEIVSGGS
PaG5 TTAVLVDASGAGALDSQRDAQQALDGTPTNNVIGRFDNLSRVA DRSEQSRVEIVSGGS
PA7 TTAVLVDASGAGALDSQRDAQQALDGTPTNNVIGRFDNLSRVA DRSEQSRVEIVSGGS
PaG7 TTAVLVDASGAGALDSQRDAQQALDGTPTNNVIGRFDNLSRVA DRSEQSRVEIVSGGS
PaG33 TTAVLVDASGAGALDSQRDAQQALDGTPTNNVIGRFDNLSRVA DRSEQSRVEIVSGGS
PaG6 TTAVLVDASGAGALDSQRDAQQALDGTPTNNVIGRFDNLSRVA DRSEQSRVEIVSGGS
PaG1 TTAVLVDASGAGALDSQRDAQQALDGTPTNNVIGRFDNLSRVA DRSEQSRVEIVSGGS
PAO1 TTAVLVDASGAGALDSQRDAQQALDGTPTNNVIGRFDNLSRVA DRSEQSRVEIVSGGS

480 490 500 510 520 530
PaG28 VDFQGGSLTLASGGQVAVSAGRSLLRDGAQVDVAGAVGVKVAMESNNIQINVOGNEQRD
PaG30 VDFQGGSLTLASGGQVAVSAGRSLLRDGAQVDVAGAVGVKVAMESNNIQINVOGNEQRD
PA14 VDFQGGSLTLASGGQVAVSAGRSLLRDGAQVDVAGAVGVKVAMESNNIQINVOGNEQRD
PaG2 VDFQGGSLTLASGGQVAVSAGRSLLRDGAQVDVAGAVGVKVAMESNNIQINVOGNEQRD
PaG19 VDFQGGSLTLASGGQVAVSAGRSLLRDGAQVDVAGAVGVKVAMESNNIQINVOGNEQRD
PaG5 VDFQGGSLTLASGGQVAVSAGRSLLRDGAQVDVAGAVGVKVAMESNNIQINVOGNEQRD
PA7 VDFQGGSLTLASGGQVAVSAGRSLLRDGAQVDVAGAVGVKVAMESNNIQINVOGNEQRD
PaG7 VDFQGGSLTLASGGQVAVSAGRSLLRDGAQVDVAGAVGVKVAMESNNIQINVOGNEQRD
PaG33 VDFQGGSLTLASGGQVAVSAGRSLLRDGAQVDVAGAVGVKVAMESNNIQINVOGNEQRD
PaG6 VDFQGGSLTLASGGQVAVSAGRSLLRDGAQVDVAGAVGVKVAMESNNIQINVOGNEQRD
PaG1 VDFQGGSLTLASGGQVAVSAGRSLLRDGAQVDVAGAVGVKVAMESNNIQINVOGNEQRD
PAO1 VDFQGGSLTLASGGQVAVSAGRSLLRDGAQVDVAGAVGVKVAMESNNIQINVOGNEQRD

540 550 560 570 580 590
PaG28 APVNRDGGGLASNDVWVDARELVLPACTNGYATDRWYTAGGELLEGGYLGTNRNHSAGEW
PaG30 APVNRDGGGLASNDVWVDARELVLPACTNGYATDRWYTAGGELLEGGYLGTNRNHSAGEW
PA14 APVNRDGGGLASNDVWVDARELVLPACTNGYATDRWYTAGGELLEGGYLGTNRNHSAGEW
PaG2 APVNRDGGGLASNDVWVDARELVLPACTNGYATDRWYTAGGELLEGGYLGTNRNHSAGEW
PaG19 APVNRDGGGLASNDVWVDARELVLPACTNGYATDRWYTAGGELLEGGYLGTNRNHSAGEW
PaG5 APVNRDGGGLASNDVWVDARELVLPACTNGYATDRWYTAGGELLEGGYLGTNRNHSAGEW
PA7 APVNRDGGGLASNDVWVDARELVLPACTNGYATDRWYTAGGELLEGGYLGTNRNHSAGEW
PaG7 APVNRDGGGLASNDVWVDARELVLPACTNGYATDRWYTAGGELLEGGYLGTNRNHSAGEW
PaG33 APVNRDGGGLASNDVWVDARELVLPACTNGYATDRWYTAGGELLEGGYLGTNRNHSAGEW
PaG6 APVNRDGGGLASNDVWVDARELVLPACTNGYATDRWYTAGGELLEGGYLGTNRNHSAGEW
PaG1 APVNRDGGGLASNDVWVDARELVLPACTNGYATDRWYTAGGELLEGGYLGTNRNHSAGEW
PAO1 APVNRDGGGLASNDVWVDARELVLPACTNGYATDRWYTAGGELLEGGYLGTNRNHSAGEW

600 610 620 630 640 650
PaG28 MAQGGT LFTTGG ELVSO P GSTVNLSSGGLDVQGG L IROTWLKGS DGRLYE SRAPGDLLY
PaG30 MAQGGT LFTTGG ELVSO P GSTVNLSSGGLDVQGG L IROTWLKGS DGRLYE SRAPGDLLY
PA14 MAQGGT LFTTGG ELVSO P GSTVNLSSGGLDVQGG L IROTWLKGS DGRLYE SRAPGDLLY
PaG2 MAQGGT LFTTGG ELVSO P GSTVNLSSGGLDVQGG L IROTWLKGS DGRLYE SRAPGDLLY
PaG19 MAQGGT LFTTGG ELVSO P GSTVNLSSGGLDVQGG L IROTWLKGS DGRLYE SRAPGDLLY
PaG5 MAQGGT LFTTGG ELVSO P GSTVNLSSGGLDVQGG L IROTWLKGS DGRLYE SRAPGDLLY
PA7 MAQGGT LFTTGG ELVSO P GSTVNLSSGGLDVQGG L IROTWLKGS DGRLYE SRAPGDLLY
PaG7 MAQGGI VSFTGN DVVTO AGSQ INLSGGTLDVQGGY IROTWLKGS DGRLYE LGSAPGDLLY
PaG33 MAQGGI VSFTGN DVVTO AGSQ INLSGGTLDVQGGY IROTWLKGS DGRLYE LGSAPGDLLY
PaG6 MAQGGI VSFTGN DVVTO AGSQ INLSGGTLDVQGGY IROTWLKGS DGRLYE LGSAPGDLLY
PaG1 MAQGGI VSFTGN DVVTO AGSQ INLSGGTLDVQGGY IROTWLKGS DGRLYE LGSAPGDLLY
PAO1 MAQGGI VSFTGN DVVTO AGSQ INLSGGTLDVQGGY IROTWLKGS DGRLYE LGSAPGDLLY

660 670 680 690 700 710
PaG28 EGIYRGYEDSSPRWGQTRYFYNPLIAPQSRYESGYMVG RDAGR LVVGTASAVLEGDLLGK
PaG30 EGIYRGYEDSSPRWGQTRYFYNPLIAPQSRYESGYMVG RDAGR LVVGTASAVLEGDLLGK
PA14 EGIYRGYEDSSPRWGQTRYFYNPLIAPQSRYESGYMVG RDAGR LVVGTASAVLEGDLLGK
PaG2 EGIYRGYEDSSPRWGQTRYFYNPLIAPQSRYESGYMVG RDAGR LVVGTASAVLEGDLLGK
PaG19 EGIYRGYEDSSPRWGQTRYFYNPLIAPQSRYESGYMVG RDAGR LVVGTASAVLEGDLLGK
PaG5 EGIYRGYEDSSPRWGQTRYFYNPLIAPQSRYESGYMVG RDAGR LVVGTASAVLEGDLLGK
PA7 EGIYRGYEDSSPRWGQTRYFYNPLIAPQSRYESGYMVG RDAGR LVVGTASAVLEGDLLGK
PaG7 DGIYRGYEAHSBRWDQTRYFYNPLIAPTQRYENGY SVGRDAGSLVIGSANARLDGQVVGD
PaG33 DGIYRGYEAHSBRWDQTRYFYNPLIAPTQRYENGY SVGRDAGSLVIGSANARLDGQVVGD
PaG6 DGIYRGYEAHSBRWDQTRYFYNPLIAPTQRYENGY SVGRDAGSLVIGSANARLDGQVVGD
PaG1 DGIYRGYEAHSBRWDQTRYFYNPLIAPTQRYENGY SVGRDAGSLVIGSANARLDGQVVGD
PAO1 DGIYRGYEAHSBRWDQTRYFYNPLIAPTQRYENGY SVGRDAGSLVIGSANARLDGQVVGD

720 730 740 750 760 770
PaG28 VFOGERQVRAPQ GADGYQOANAVARGAE LIVGSYTPRYESASGNVLYNLAPTLQOVRL
PaG30 VFOGERQVRAPQ GADGYQOANAVARGAE LIVGSYTPRYESASGNVLYNLAPTLQOVRL
PA14 VFOGERQVRAPQ GADGYQOANAVARGAE LIVGSYTPRYESASGNVLYNLAPTLQOVRL
PaG2 VFOGERQVRAPQ GADGYQOANAVARGAE LIVGSYTPRYESASGNVLYNLAPTLQOVRL
PaG19 VFOGERQVRAPQ GADGYQOANAVARGAE LIVGSYTPRYESASGNVLYNLAPTLQOVRL
PaG5 VFOGERQVRAPQ GADGYQOANAVARGAE LIVGSYTPRYESASGNVLYNLAPTLQOVRL
PA7 VFOGERQVRAPQ GADGYQOANAVARGAE LIVGSYTPRYESASGNVLYNLAPTLQOVRL
PaG7 TYRGERQTEAPQAGLDGYNOSONAVARGAQLVVGRYTPYVVKSSGLELYALGADAGSLKQ
PaG33 TYRGERQTEAPQAGLDGYNOSONAVARGAQLVVGRYTPYVVKSSGLELYALGADAGSLKQ
PaG6 TYRGERQTEAPQAGLDGYNOSONAVARGAQLVVGRYTPYVVKSSGLELYALGADAGSLKQ
PaG1 TYRGERQTEAPQAGLDGYNOSONAVARGAQLVVGRYTPYVVKSSGLELYALGADAGSLKQ
PAO1 TYRGERQTEAPQAGLDGYNOSONAVARGAQLVVGRYTPYVVKSSGLELYALGADAGSLKQ

780 790 800 810 820 830
PaG28 ADG...GEP LANLDLDTALAEQRGVLLDSERLSGFELGAVRVAAERETAVDNALQVGD
PaG30 ADG...GEP LANLDLDTALAEQRGVLLDSERLSGFELGAVRVAAERETAVDNALQVSD
PA14 ADG...GEP LANLDLDTALAEQRGVLLDSERLSGFELGAVRVAAERETAVDNALQVGD
PaG2 ADG...GEP LANLDLDTALAEQRGVLLDSERLSGFELGAVRVAAERETAVDNALQVSD
PaG19 ADG...GEP LANLDLDTALAEQRGVLLDSERLSGFELGAVRVAAERETAVDNALQVGD
PaG5 ADG...GAPSATSLGLDAA LADEQRGTLQDSERLSGFELGAVRVAAERETAVDGDALQVGN
PA7 ADG...GPPSAASLGLDTA LADEQRGTLQDSERLSGFELGAVRVAAERETAVDGDALQVGN
PaG7 VVIGTGEVAAEEPTLDAPVAERQGRSLDSELLNGFQLGGLKVAAGESIRVDSALTLAN
PaG33 VVIGTGEVAAEEPTLDAPVAERQGRSLDSELLNGFQLGGLKVAAGESIRVDSALTLAN
PaG6 VVIGTGEVAAEEPTLDAPVAERQGRSLDSELLNGFQLGGLKVAAGESIRVDSALTLAN
PaG1 VVIGTGEVAAEEPTLDAPVAERQGRSLDSELLNGFQLGGLKVAAGESIRVDSALTLAN
PAO1 VVIGTGEVAAEEPTLDAPVAERQGRSLDSELLNGFQLGGLKVAAGESIRVDSALTLAN

840 850 860 870 880 890
PaG28 GGEIVLYAP E EVNADLTARA GSSLRLGNVLEQVEVARGERIDTYLTPAAGQRAALT LGDG
PaG30 GGEIVLYAP E EVNADLTARA GSSLRLGNVLEQVEVARGERIDTYLTPAAGQRAALT LGDG
PA14 GGEIVLYAP E EVNADLTARA GSSLRLGNVLEQVEVARGERIDTYLTPAAGQRAALT LGDG
PaG2 GGEIVLYAP E EVNADLTARA GSSLRLGNVLEQVEVARGERIDTYLTPAAGQRAALT LGDG
PaG19 GGEIVLYAP E EVNADLTARA GSSLRLGNVLEQVEVARGERIDTYLTPAAGQRAALT LGDG
PaG5 GGEITLYAP E EVNADLVARA GSSLRLGNVLEQVEVARGERLDTYLTPAAGQRAAVT LGDG
PA7 GGEITLYAP E EVNADLVARA GSSLRLGNVLEQVEVARGERLDTYLTPAAGQRAAVT LGDG
PaG7 GGEAILFANDVAIDADITAHGSSLQAGNVLAQISPNG...TIDGFVDAGREAGILRVGDG
PaG33 GGEAILFANDVAIDADITAHGSSLQAGNVLAQISPNG...TIDGFVDAGREAGILRVGDG
PaG6 GGEAILFANDVAIDADITAHGSSLQAGNVLAQISPNG...TIDGFVDAGREAGILRVGDG
PaG1 GGEAILFANDVAIDADITAHGSSLQAGNVLAQISPNG...TIDGFVDAGREAGILRVGDG
PAO1 GGEAILFANDVAIDADITAHGSSLQAGNVLAQISPNG...TIDGFVDAGREAGILRVGDG

900 910 920 930 940 950
PaG28 VTLDARGLWSNQMQGG.VDADRAYLDGGRI SLRSGDLSLGDGSRIDVSSGAALLADGKQ
PaG30 VTLDARGLWSNQMQGG.VDADRAYLDGGRI SLRSGDLSLGDGSRIDVSSGAALLADGKQ
PA14 VTLDARGLWSNQMQGG.VDADRAYLDGGRI SLRSGDLSLGDGSRIDVSSGAALLADGKQ
PaG2 VTLDARGLWSNQVQGG.VDADRAYLDGGRI SLRSGDLSLGDGSRIDVSSGAALLADGKQ
PaG19 VTLDARGLWSNQVQGG.VDADRAYLDGGRI SLRSGDLSLGDGSRIDVSSGAALLADGKQ
PaG5 VRLDARGLWSNLLRGG.VEAEERAYLDGGRV SLRSGDLSLGDGSRIDVSSGAALLADGKQ
PA7 VRLDARGLWSNLLRGG.VEAEERAYLDGGRV SLRSGDLSLGDGSRIDVSSGAALLADGKQ
PaG7 VRLDASGLWSNLLLAPEDNDTLAYRDGGRISLRSGDLSLGDGSRIDVSSGAALLADGKR
PaG33 VRLDASGLWSNLLLAPEDNDTLAYRDGGRISLRSGDLSLGDGSRIDVSSGAALLADGKR
PaG6 VRLDASGLWSNLLLAPEDNDTLAYRDGGRISLRSGDLSLGDGSRIDVSSGAALLADGKR
PaG1 VRLDASGLWSNLLLAPEDNDTLAYRDGGRISLRSGDLSLGDGSRIDVSSGAALLADGKR
PAO1 VRLDASGLWSNLLLAPEDNDTLAYRDGGRISLRSGDLSLGDGSRIDVSSGAALLADGKR

960 970 980 990 1000 1010
PaG28 VGGKGGDLTLSANTGSAAG.DGRQLQGGELAGHGVA GAGTLSVQAPRVSIG.AAAQDGTLL
PaG30 VGGKGGDLTLSANTGSAAG.DGRQLQGGELAGHGVA GAGTLSVQAPRVSIG.AAAQDGTLL
PA14 VGGKGGDLTLSANTGSAAG.DGRQLQGGELAGHGVA GAGTLSVQAPRVSIG.AAAQDGTLL
PaG2 VGGKGGDLTLSANTGSAAG.DGRQLQGGELAGHGVA GAGTLSVQAPRVSIG.AAAQDGTLL
PaG19 VGGKGGDLTLSANTGSAAG.DGRQLQGGELAGHGVA GAGTLSVQAPRVSIG.AAAQDGTLL
PaG5 VGGKGGDLTLSANTGSAAG.DGRQLQGGELAGHGVA GAGTLSVQAPRVSIG.AAAQDGTLL
PA7 VGGKGGDLTLSANTGSAAG.DGRQLQGGELAGHGVA GAGTLSVQAPRVSIG.AAAQDGTLL
PaG7 LGGRGGDIALHASAGLAQASDGLQLQGGELAGHGVA GAGTLSVQAPRVSIG.AAAQDGTLL
PaG33 LGGRGGDIALHASAGLAQASDGLQLQGGELAGHGVA GAGTLSVQAPRVSIG.AAAQDGTLL
PaG6 LGGRGGDIALHASAGLAQASDGLQLQGGELAGHGVA GAGTLSVQAPRVSIG.AAAQDGTLL
PaG1 LGGRGGDIALHASAGLAQASDGLQLQGGELAGHGVA GAGTLSVQAPRVSIG.AAAQDGTLL
PAO1 LGGRGGDIALHASAGLAQASDGLQLQGGELAGHGVA GAGTLSVQAPRVSIG.AAAQDGTLL

1020 1030 1040 1050 1060 1070
PaG28 ALAAGFFDKGFASYQVIGEGLEVAEGAQVQVLRP YRF RDDAIVASGADPELLALEPWL
PaG30 ALAAGFFDKGFASYQVIGEGLEVAEGAQVQVLRP YRF RDDAVSVASGADPELLALEPWL
PA14 ALAAGFFDKGFASYQVIGEGLEVAEGAQVQVLRP YRF RDDAIVASGADPELLALEPWL
PaG2 ALAAGFFDKGFASYQVIGEGLEVAEGAQVQVLRP YRF RDDAIVASGADPELLALEPWL
PaG19 ALAAGFFDKGFASYQVIGEGLEVAEGAQVQVLRP YRF RDDAIVASGADPELLALEPWL
PaG5 ALASGFFDRGFASYRVIGEGLEVTETQVQVRRP YRF RDDAVAIASGADPELLALEPWL
PA7 ALASGFFDRGFASYRVIGEGLEVTETQVQVRRP YRF RDDAVAIASGADPELLALEPWL
PaG7 QLAEDFFQGGFASYRVVGRSGLTVAEDAQVQVRRP YRF RDDAVAIASGADPELLALEPWL
PaG33 QLAEDFFQGGFASYRVVGRSGLTVAEDAQVQVRRP YRF RDDAVAIASGADPELLALEPWL
PaG6 QLAEDFFQGGFASYRVVGRSGLTVAEDAQVQVRRP YRF RDDAVAIASGADPELLALEPWL
PaG1 QLAEDFFQGGFASYRVVGRSGLTVAEDAQVQVRRP YRF RDDAVAIASGADPELLALEPWL
PAO1 QLAEDFFQGGFASYRVVGRSGLTVAEDAQVQVRRP YRF RDDAVAIASGADPELLALEPWL

1080 1090 1100 1110 1120
PaG28 TPLYEERPADGELRORPGASLFLQAGS.RQSGAGQVADSVLDIGHGSSLVEVDPGQRTEBL
PaG30 TPLYEERPADGELRORPGASLFLQAGS.RQSGAGQVADSVLDVGGSSLVEVDPGQRTEBL
PA14 TPLYEERPADGELRORPGASLFLQAGS.RQSGAGQVADSVLDIGHGSSLVEVDPGQRTEBL
PaG2 TPLYEERPADGELRORPGASLFLQAGS.RQSGAGQVADSVLDIGHGSSLVEVDPGQRTEBL
PaG19 TPLYEERPADGELRORPGASLFLQAGS.RQSGAGQVADSVLDIGRGSLLVEVDPGQRTEBL
PaG5 APLYEERPASGELLORPGASLFLQAGT.RQTGAGQVADSVLDIARGSSLVEVDPGQRTEBL
PA7 APLYEERPASGELLORPGASLFLQAGT.RQTGAGQVADSVLDIARGSSLVEVDPGQRTEBL
PaG7 PPLYLEDALAGRLVOREGADLYLQAGGDGNILGQLDPEASQTELELGRGSSLVEVDPGRAIVL
PaG33 PPLYLEDALAGRLVOREGADLYLQAGGDGNILGQLDPEASQTELELGRGSSLVEVDPGRAIVL
PaG6 PPLYLEDALAGRLVOREGADLYLQAGGDGNILGQLDPEASQTELELGRGSSLVEVDPGRAIVL
PaG1 PPLYLEDALAGRLVOREGADLYLQAGGDGNILGQLDPEASQTELELGRGSSLVEVDPGRAIVL
PAO1 PPLYLEDALAGRLVOREGADLYLQAGGDGNILGQLDPEASQTELELGRGSSLVEVDPGRAIVL

1130 1140 1150 1160 1170 1180
PaG28 RSVGQLNVDGRLNAWGG.....SIELGSVALPDPVRDQVESVGHQRAIRVGEQGVLDVAA
PaG30 RSVGQLSVDGRLNAWGG.....SIELGSVALPDPVRDQVESVGHQRAIRVGEQGVLDVAA
PA14 RSVGQLNVDGRLNAWGG.....SIELGSVALPDPVRDQVESVGHQRAIRVGEQGVLDVAA
PaG2 RSVGQLNVDGRLNAWGG.....SIELGSVALPDPVRDQVESVGHQRAIRVGEQGVLDVAA
PaG19 RSVGQLNVDGRLNAWGG.....SIELGSVALPDPVRDQVESVGHQRAIRVGEQGVLDVAA
PaG5 RGVGQLNIEGRINAWGG.....SIELGSVALPAPQRDPLESVGHQRAIRVGEQGVLDVAA
PA7 RGVGQLNIEGRINAWGG.....SIELGSVALPAPQRDPLESVGHQRAIRVGEQGVLDVAA
PaG7 RGPQGITLLDGLNAWGGRIDVRRQQQFGALDVTQDNQPKAQGGQPHARSIWIIGEQALLDVAAG
PaG33 RGPQGITLLDGLNAWGGRIDVRRQQQFGALDVTQDNQPKAQGGQPHARSIWIIGEQALLDVAAG
PaG6 RGPQGITLLDGLNAWGGRIDVRRQQQFGALDVTQDNQPKAQGGQPHARSIWIIGEQALLDVAAG
PaG1 RGPQGITLLDGLNAWGGRIDVRRQQQFGALDVTQDNQPKAQGGQPHARSIWIIGEQALLDVAAG
PAO1 RGPQGITLLDGLNAWGGRIDVRRQQQFGALDVTQDNQPKAQGGQPHARSIWIIGEQALLDVAAG

1190 1200 1210 1220 1230 1240
PaG28 RAA TALDFQ GRRYQ VVD GGSIVIGG TVE HASGK ADA AELFID LRP GSL LDASGTQAL LD
PaG30 RAA TALDFQ GRRYQ VAD GGSIVIGG TVE HASGK ADA AELFID LRP GSL LDASGTQAL LD
PA14 RAA TALDFQ GRRYQ VVD GGSIVIGG TVE HASGK ADA AELFID LRP GSL LDASGTQAL LD
PaG2 RAA TALDFQ GRRYQ VVD GGSIVIGG TVE HASGK ADA AELFID LRP GSL LDASGTQAL LD
PaG19 RAA TALDFQ GRRYQ Q LAD GGSIVIGG TVE HASGK ADA AELFID LRP GSL LDASGTQAL LD
PaG5 RAA TALDFQ GRRYQ RVAE GGSIVIGG TVE QAGGKAAA AELFID LRP GSL LDASGTQAL LD
PA7 RAA TALDFQ GRRYQ RVAE GGSIVIGG TVE QAGGKAAA AELFID LRP GSL LDASGTQAL LD
PaG7 RAA TALDFQ GRRYQ RVAE GGSIVIGG TVE QAGGKAAA AELFID LRP GSL LDASGTQAL LD
PaG33 RAA TALDFQ GRRYQ VQS GGSIVIGG EID PGKAIATS ADAFVIVRPGARLEASGSQAQLD
PaG6 RAA TALDFQ GRRYQ VQS GGSIVIGG EID PGKAIATS ADAFVIVRPGARLEASGSQAQLD
PaG1 RAA TALDFQ GRRYQ VQS GGSIVIGG EID PGKAIATS ADAFVIVRPGARLEASGSQAQLD
PAO1 RAA TALDFQ GRRYQ VQS GGSIVIGG EID PGKAIATS ADAFVIVRPGARLEASGSQAQLD

1250 1260 1270 1280 1290 1300
PaG28 VPGVQTRVSSA GGSISLASANGLYLDGDLRAFAAGGEGAAAGSITLALATPNYLTSLATD
PaG30 VPGVQTRVSSA GGSISLASANGLYLDGDLRAFAAGGEGAAAGSITLALATPNYLTSLATD
PA14 VPGVQTRVSSA GGSISLASANGLYLDGDLRAFAAGGEGAAAGSITLALATPNYLTSLATD
PaG2 VPRVQTRVSSA GGSISLASANGLYLDGDLRAFAAGGEGAAAGSITLALATPNYLTSLATD
PaG19 VPGVQTRVSSA GGSISLASANGLYLDGDLRAFAAGGEGAAAGSITLALATPNYLTSLATD
PaG5 VPGVQTRVSSA GGSISLASANGLYLDGDLRAFAAGGEGAAAGSITLALATPNYLTSLATD
PA7 VPGVQTRVSSA GGSISLASANGLYLDGDLRAFAAGGEGAAAGSITLALATPNYLTSLATD
PaG7 VPGVQTRVSSA GGSISLASANGLYLDGDLRAFAAGGEGAAAGSITLALATPNYLTSLATD
PaG33 VPGIGRVL LAGD GGRITALS YNGLYLDGSLRAAAGGEGAAAGSITLALADAPLYQGFTVVD
PaG6 VPGIGRVL LAGD GGRITALS YNGLYLDGSLRAAAGGEGAAAGSITLALADAPLYQGFTVVD
PaG1 VPGIGRVL LAGD GGRITALS YNGLYLDGSLRAAAGGEGAAAGSITLALADAPLYQGFTVVD
PAO1 VPGIGRVL LAGD GGRITALS YNGLYLDGSLRAAAGGEGAAAGSITLALADAPLYQGFTVVD

1310 1320 1330 1340 1350
PaG28 QVLRPRELIVGQ QRE AAG EGRDYA YGHG RLAA SQVQD GGF GDLT LFS DGL
PaG30 QVLRPRELIVGQ QRE AAG EGRNYA YGHG RLAA SQVQD GGF GDLT LFS DGL
PA14 QVLRPRELIVGQ QRE AAG EGRDYA YGHG RLAA SQVQD GGF GDLT LFS DGL
PaG2 QVLRPRELIVGQ QRE AAG EGRDYA YGHG RLAA SQVQD GGF GDLT LFS DGL
PaG19 QVLRPRELIVGQ QRE AAG EGRDYA YGHG RLAA SQVQD GGF GDLT LFS DGL
PaG5 QVLRPRELIVGQ QRD TAG EGRDYA YGHG RLAA SQVQD GGF GDLT LFS DGL
PA7 QVLRPRELIVGQ QRD TAG EGRDYA YGHG RLAA SQVQD GGF GDLT LFS DGL
PaG7 DRV LAMRE LILTAGH ADSGLPTLLQPGMD DSALR YGQS RVGT QSLT GGF DQLS LFS NGP
PaG33 DRV LAMRE LILTAGH ADSGLPTLLQPGMD DSALR YGQS RVGT QSLT GGF DQLS LFS NGP
PaG6 DRV LAMRE LILTAGH ADSGLPTLLQPGMD DSALR YGQS RVGT QSLT GGF DQLS LFS NGP
PaG1 DRV LAMRE LILTAGH ADSGLPTLLQPGMD DSALR YGQS RVGT QSLT GGF DQLS LFS NGP
PAO1 DRV LAMRE LILTAGH ADSGLPTLLQPGMD DSALR YGQS RVGT QSLT GGF DQLS LFS NGP

1360 1370 1380 1390 1400 1410
PaG28 LSFAGDLELS LAQR LR LYS CALGLGEGAA GDSRVRLSAPS LLLAGAFVNEAAE NNETQPL
PaG30 LSFAGDLELS LAQR LR LYS CALGLGEGAA GDSRVRLSAPS LLLAGAFVNEAAE NNETQPL
PA14 LSFAGDLELS LAQR LR LYS CALGLGEGAA GDSRVRLSAPS LLLAGAFVNEAAE NNETQPL
PaG2 LSFAGDLELS LAQR LR LYS CALGLGEGAA GDSRVRLSAPS LLLAGAFVNEAAE NNETQPL
PaG19 LSFAGDLELS LAQR LR LYS CALGLGEGAA GDSRVRLSAPS LLLAGAFVNEAAE NNETQPL
PaG5 LSFAGDLELS LAQR LR LYS CALGLGEGAA GDSRVRLSAPS LLLAGAFVNEAAE NNETQPL
PA7 LSFAGDLELS LAQR LR LYS CALGLGEGAA GDSRVRLSAPS LLLAGAFVNEAAE NNETQPL
PaG7 LSFEGNIDLAMGRS LNLYACTIAATG . . GGPSEVKLQAPYVRLSGIGMYGQQA SGEFRPR
PaG33 LSFEGNIDLAMGRS LNLYACTIAATG . . GGPSEVKLQAPYVRLSGIGMYGQQA SGEFRPR
PaG6 LSFEGNIDLAMGRS LNLYACTIAATG . . GGPSEVKLQAPYVRLSGIGMYGQQA SGEFRPR
PaG1 LSFEGNIDLAMGRS LNLYACTIAATG . . GGPSEVKLQAPYVRLSGIGMYGQQA SGEFRPR
PAO1 LSFEGNIDLAMGRS LNLYACTIAATG . . GGPSEVKLQAPYVRLSGIGMYGQQA SGEFRPR

1420 1430 1440 1450 1460 1470
PaG28 STGLFEVSRQPS EALFEASAQ VLDI RDS LVFGS RGSFRD ASGGTQTIDRR GFD RVELS ST
PaG30 STGLFEVSRQPS EALFEASAQ VLDI RDS LVFGS RGSFRD ASGGTQTIDRR GFD RVELS ST
PA14 STGLFEVSRQPS EALFEASAQ VLDI RDS LVFGS RGSFRD ASGGTQTIDRR GFD RVELS ST
PaG2 STGLFEVSRQPS EALFEASAQ VLDI RDS LVFGS RGSFRD ASGGTQTIDRR GFD RVELS ST
PaG19 STGLFEVSRQPS EALFEASAQ VLDI RDS LVFGS RGSFRD ASGGTQTIDRR GFD RVELS ST
PaG5 STSLAQVSRQPS SEARFEASAQ VLDI RDS LVFGS RGSFRD ATGGTRMVD RR GFD RVELS ST
PA7 STSLAQVSRQPS SEARFEASAQ VLDI RDS LVFGS RGSFRD ATGGTRMVD RR GFD RVELS ST
PaG7 LT . YGPTATAE QVRLQVSAGR LLDI AGR LSFSGD GVINGVN EAVRYQR GFEKVT LRSE
PaG33 LT . YGPTATAE QVRLQVSAGR LLDI AGR LSFSGD GVINGVN EAVRYQR GFEKVT LRSE
PaG6 LT . YGPTATAE QVRLQVSAGR LLDI AGR LSFSGD GVINGVN EAVRYQR GFEKVT LRSE
PaG1 LT . YGPTATAE QVRLQVSAGR LLDI AGR LSFSGD GVINGVN EAVRYQR GFEKVT LRSE
PAO1 LT . YGPTATAE QVRLQVSAGR LLDI AGR LSFSGD GVINGVN EAVRYQR GFEKVT LRSE

	1480	1490	1500	1510	1520	1530												
PaG28	GD	MR	LL	AGNATPVERI	NTQVLSG	GD	LL	IR	AAQLYP	GT	GAGAR	IL	AGYG	YQADGAA	AF	DP		
PaG30	GD	MR	LL	AGNATPVERI	NTQVLSG	GD	LL	IR	AAQLYP	GT	GAGAR	IL	AGYG	YQADGAA	AF	DP		
PA14	GD	MR	LL	AGNATPVERI	NTQVLSG	GD	LL	IR	AAQLYP	GT	GAGAR	IL	AGYG	YQADGAA	AF	DP		
PaG2	GD	MR	LL	AGNATPVERI	NTQVLSG	GD	LL	IR	AAQLYP	GT	GAGAR	IL	AGYG	YQADGAA	AF	DP		
PaG19	GD	MR	LL	AGNATPVERI	NTQVLSG	GD	LL	IR	AAQLYP	GT	GAGAR	IL	AGYG	YQADGAA	AF	DP		
PaG5	GD	MR	LL	AGNAEPMERIN	TQLLSA	GD	VL	IR	AAQLYP	GS	GAGAR	IL	AGYG	YQADGAAP	AF	DP		
PA7	GD	MR	LL	AGNAEPMERIN	TQLLSA	GD	VL	IR	AAQLYP	GS	GAGAR	IL	AGYG	YQADGAAP	AF	DP		
PaG7	GD	LR	FA	G.DYPENGDP	SGRL	LIT	H	GD	LQ	LT	AAQLYP	VT	GASST	LY	AGYGL	DEG.GQ	AV	FDA
PaG33	GD	LR	FA	G.DYPENGDP	SGRL	LIT	H	GD	LQ	LT	AAQLYP	VT	GASST	LY	AGYGL	DEG.GQ	AV	FDA
PaG6	GD	LR	FA	G.DYPENGDP	SGRL	LIT	H	GD	LQ	LT	AAQLYP	VT	GASST	LY	AGYGL	DEG.GQ	AV	FDA
PaG1	GD	LR	FA	G.DYPENGDP	SGRL	LIT	H	GD	LQ	LT	AAQLYP	VT	GASST	LY	AGYGL	DEG.GQ	AV	FDA
PAO1	GD	LR	FA	G.DYPENGDP	SGRL	LIT	H	GD	LQ	LT	AAQLYP	VT	GASST	LY	AGYGL	DEG.GQ	AV	FDA

	1540	1550	1560	1570	1580																																																					
PaG28	AR	SL	RI	ERS	DATT	PE	QPL	AV	FG	RL	SL	GA	AS	SV	QGGV	V	R	AP	LG	Y	LE	I	Q	N	AD	K	V	E																													
PaG30	AR	SL	RI	ERS	DATT	PE	QPL	AV	FG	RL	SL	GA	AS	SV	QGGV	V	R	AP	LG	Y	LE	I	Q	N	AD	K	V	E																													
PA14	AR	SL	RI	ERS	DATT	PE	QPL	AV	FG	RL	SL	GA	AS	SV	QGGV	V	R	AP	LG	Y	LE	I	Q	N	AD	K	V	E																													
PaG2	AR	SL	RI	ERS	DATT	PE	QPL	AV	FG	RL	SL	GA	AS	SV	QGGV	V	R	AP	LG	Y	LE	I	Q	N	AD	K	V	E																													
PaG19	AR	SL	RI	ERS	DATT	PE	QPL	AV	FG	RL	SL	GA	AS	SV	QGGV	V	R	AP	LG	Y	LE	I	Q	N	AD	K	V	E																													
PaG5	TR	SL	RI	ERS	GATT	PE	QPL	AV	FG	SL	SL	GA	AS	SV	QGGV	V	R	AP	LG	Y	LE	I	Q	S	NGG	G	A	G	T	T	N	R	V	E																								
PA7	TR	SL	RI	ERS	GATT	PE	QPL	AV	FG	SL	SL	GA	AS	SV	QGGV	V	R	AP	LG	Y	LE	I	Q	S	NGG	G	A	G	T	T	N	R	V	E																								
PaG7	ER	H	L	A	I	E	R	S	G	E	S	L	P	D	T	P	L	S	V	F	G	S	L	A	F	M	A	S	N	I	E	Q	G	G	V	V	R	A	P	L	G	L	I	Q	F	G	S	N	..	L	D	R	A	P	G	T	V	R
PaG33	ER	H	L	A	I	E	R	S	G	E	S	L	P	D	T	P	L	S	V	F	G	S	L	A	F	M	A	S	N	I	E	Q	G	G	V	V	R	A	P	L	G	L	I	Q	F	G	S	N	..	L	D	R	A	P	G	T	V	R
PaG6	ER	H	L	A	I	E	R	S	G	E	S	L	P	D	T	P	L	S	V	F	G	S	L	A	F	M	A	S	N	I	E	Q	G	G	V	V	R	A	P	L	G	L	I	Q	F	G	S	N	..	L	D	R	A	P	G	T	V	R
PaG1	ER	H	L	A	I	E	R	S	G	E	S	L	P	D	T	P	L	S	V	F	G	S	L	A	F	M	A	S	N	I	E	Q	G	G	V	V	R	A	P	L	G	L	I	Q	F	G	S	N	..	L	D	R	A	P	G	T	V	R
PAO1	ER	H	L	A	I	E	R	S	G	E	S	L	P	D	T	P	L	S	V	F	G	S	L	A	F	M	A	S	N	I	E	Q	G	G	V	V	R	A	P	L	G	L	I	Q	F	G	S	N	..	L	D	R	A	P	G	T	V	R

	1590	1600	1610	1620	1630	1640																																																			
PaG28	LL	S	G	S	L	T	S	V	S	G	A	G	L	T	P	Y	G	G	T	V	D	G	Q	V	W	R	Y	A	G	E	E	I	A	L	T	G	V	G	S	F	N	E	R	G	I	M	D	T	G	V	D	L	G	G	R	S	V
PaG30	LL	S	G	S	L	T	S	V	S	G	A	G	L	T	P	Y	G	G	T	V	D	G	Q	V	W	R	Y	A	G	E	E	I	A	L	T	G	V	G	S	F	N	E	R	G	I	M	D	T	G	V	D	L	G	G	R	S	V
PA14	LL	S	G	S	L	T	S	V	S	G	A	G	L	T	P	Y	G	G	T	V	D	G	Q	V	W	R	Y	A	G	E	E	I	A	L	T	G	V	G	S	F	N	E	R	G	I	M	D	T	G	V	D	L	G	G	R	S	V
PaG2	LL	S	G	S	L	T	S	V	S	G	A	G	L	T	P	Y	G	G	T	V	D	G	Q	V	W	R	Y	A	G	E	E	I	A	L	T	G	V	G	S	F	N	E	R	G	I	M	D	T	G	V	D	L	G	G	R	S	V
PaG19	LL	S	G	S	L	T	S	V	S	G	A	G	L	T	P	Y	G	G	T	V	D	G	Q	V	W	R	Y	A	G	E	E	I	A	L	T	G	V	G	S	F	N	E	R	G	I	M	D	T	G	V	D	L	G	G	R	S	V
PaG5	LL	P	G	S	L	T	S	V	S	G	A	L	L	P	Y	G	G	T	V	D	G	Q	A	W	R	Y	A	G	K	E	V	V	L	T	G	V	G	S	S	N	D	R	G	V	L	K	T	G	L	D	L	G	G	L	S	V	
PA7	LL	P	G	S	L	T	S	V	S	G	A	L	L	P	Y	G	G	T	V	D	G	Q	A	W	R	Y	A	G	K	E	V	V	L	T	G	V	G	S	S	N	D	R	G	V	L	K	T	G	L	D	L	G	G	L	S	V	
PaG7	LL	P	G	S	L	T	S	V	S	G	A	E	L	V	M	P	Y	G	G	T	D	G	I	N	Y	L	V	N	Q	V	P	I	O	L	T	G	A	G	G	A	L	A	A	G	T	L	V	A	G	V	G	L	Y	A	S	E	V
PaG33	LL	P	G	S	L	T	S	V	S	G	A	E	L	V	M	P	Y	G	G	T	D	G	I	N	Y	L	V	N	Q	V	P	I	O	L	T	G	A	G	G	A	L	A	A	G	T	L	V	A	G	V	G	L	Y	A	S	E	V
PaG6	LL	P	G	S	L	T	S	V	S	G	A	E	L	V	M	P	Y	G	G	T	D	G	I	N	Y	L	V	N	Q	V	P	I	O	L	T	G	A	G	G	A	L	A	A	G	T	L	V	A	G	V	G	L	Y	A	S	E	V
PaG1	LL	P	G	S	L	T	S	V	S	G	A	E	L	V	M	P	Y	G	G	T	D	G	I	N	Y	L	V	N	Q	V	P	I	O	L	T	G	A	G	G	A	L	A	A	G	T	L	V	A	G	V	G	L	Y	A	S	E	V
PAO1	LL	P	G	S	L	T	S	V	S	G	A	E	L	V	M	P	Y	G	G	T	D	G	I	N	Y	L	V	N	Q	V	P	I	O	L	T	G	A	G	G	A	L	A	A	G	T	L	V	A	G	V	G	L	Y	A	S	E	V

	1650	1660	1670	1680	1690	1700																																																					
PaG28	R	V	A	S	G	A	T	L	D	L	S	G	G	E	L	L	G	A	G	F	V	S	G	R	G	G	S	T	D	A	R	N	P	L	V	R	F	D	E	B	E	G	R	F	D	L	P	G	L	A	D	N	P	I	Y	A	I	V	P
PaG30	R	V	A	S	G	A	T	L	D	L	S	G	G	E	L	L	G	A	G	F	V	S	G	R	G	G	S	T	D	A	R	N	P	L	V	R	F	D	E	B	E	G	R	F	D	L	P	G	L	A	D	N	P	I	Y	A	I	V	P
PA14	R	V	A	S	G	A	T	L	D	L	S	G	G	E	L	L	G	A	G	F	V	S	G	R	G	G	S	T	D	A	R	N	P	L	V	R	F	D	E	B	E	G	R	F	D	L	P	G	L	A	D	N	P	I	Y	A	I	V	P
PaG2	R	V	A	S	G	A	T	L	D	L	S	G	G	E	L	L	G	A	G	F	V	S	G	R	G	G	S	T	D	A	R	N	P	L	V	R	F	D	E	B	E	G	R	F	D	L	P	G	L	A	D	N	P	I	Y	A	I	V	P
PaG19	R	V	A	S	G	A	T	L	D	L	S	G	G	E	L	L	G	A	G	F	V	S	G	R	G	G	S	T	D	A	R	N	P	L	V	R	F	D	E	B	E	G	R	F	D	L	P	G	L	A	D	N	P	I	Y	A	I	V	P
PaG5	Q	V	A	P	G	A	T	L	D	L	S	G	G	E	L	L	G	A	G	F	V	S	G	R	G	G	S	T	D	A	R	N	P	L	V	R	I	D	E	D	G	R	F	S	L	P	G	L	A	D	N	P	I	Y	A	I	V	P	
PA7	Q	V	A	P	G	A	T	L	D	L	S	G	G	E	L	L	G	A	G	F	V	S	G	R	G	G	S	T	D	A	R	N	P	L	V	R	I	D	E	D	G	R	F	S	L	P	G	L	A	D	N	P	I	Y	A	I	V	P	
PaG7	D	V	Q	Q	A	R	L	D	L	S	G	G	E	L	L	G	A	G	F	I	S	G	R	G	G	S	T	D	A	R	F	H	P	L	V	Q	D	N	D	G	F	R	L	P	E	L	S	N	P	V	Y	A	I	V	P				
PaG33	D	V	Q	Q	A	R	L	D	L	S	G	G	E	L	L	G	A	G	F	I	S	G	R	G	G	S	T	D	A	R	F	H	P	L	V	Q	D	N	D	G	F	R	L	P	E	L	S	N	P	V	Y	A	I	V	P				
PaG6	D	V	Q	Q	A	R	L	D	L	S	G	G	E	L	L	G	A	G	F	I	S	G	R	G	G	S	T	D	A	R	F	H	P	L	V	Q	D	N	D	G	F	R	L	P	E	L	S	N	P	V	Y	A	I	V	P				
PaG1	D	V	Q	Q	A	R	L	D	L	S	G	G	E	L	L	G	A	G	F	I	S	G	R	G	G	S	T	D	A	R	F	H	P	L	V	Q	D	N	D	G	F	R	L	P	E	L	S	N	P	V	Y	A	I	V	P				
PAO1	D	V	Q	Q	A	R	L	D	L	S	G	G	E	L	L	G	A	G	F	I	S	G	R	G	G	S	T	D	A	R	F	H	P	L	V	Q	D	N	D	G	F	R	L	P	E	L	S	N	P	V	Y	A	I	V	P				

1770 1780 1790 1800 1810 1820
PaG28 GLGRAAP TQLMRS GSWSLA GQLSLVGT GVRDEL FRQVLLTP ADVLRRHSQYNETSYSDFA
PaG30 GLGRAAP TQLMRS GSWSLA GQLSLVGT GVRDEL FRQVLLTP ADVLRRHSQYNETSYSDFA
PA14 GLGRAAP TQLMRS GSWSLA GQLSLVGT GVRDEL FRQVLLTP ADVLRRHSQYNETSYSDFA
PaG2 MLGRAAP TQLMRS GSWSLA GQLSLVGT GVRDEL FRQVLLTP ADVLRRHSQYNETSYSDFA
PaG19 GLGRAAP TQLMRS GSWSLA GQLSLVGT GVRDEL FRQVLLTP ADVLRRHSQYNETSYSDFA
PaG5 GLGRAAP TQLMRS GSWSLA GQLSLVGT GVRDEL FRQVLLTP ADVLRRHSQYNETSYSDFA
PA7 GLGRAAP TQLMRS GSWSLA GQLSLVGT GVRDEL FRQVLLTP ADVLRRHSQYNETSYSDFA
PaG7 GQGAPMATQGLRNGSWATS GQLSIAGTS IRDSLRSQVILSSADTLRRYSQYNETSYADFI
PaG33 GQGAPMATQGLRNGSWATS GQLSIAGTS IRDSLRSQVILSSADTLRRYSQYNETSYADFI
PaG6 GQGAPMATQGLRNGSWATS GQLSIAGTS IRDSLRSQVILSSADTLRRYSQYNETSYADFI
PaG1 GQGAPMATQGLRNGSWATS GQLSIAGTS IRDSLRSQVILSSADTLRRYSQYNETSYADFI
PAO1 GQGAPMATQGLRNGSWATS GQLSIAGTS IRDSLRSQVILSSADTLRRYSQYNETSYADFI

1830 1840 1850 1860 1870 1880
PaG28 MADAARRGIPRPMPLVDARSIRLDLLAGGG..ADALAFDGTGLFQAARGGYGGSLLVVLGN
PaG30 MADAARRGIPRPMPLVDARSIRLDLLAGGG..ADALAFDGTGLFQAARGGYGGSLLVVLGN
PA14 MADAARRGIPRPMPLVDARSIRLDLLAGGG..ADALAFDGTGLFQAARGGYGGSLLVVLGN
PaG2 MADAARRGIPRPMPLVDARSIRLDLLAGGG..ADALAFDGTGLFQAARGGYGGSLLVVLGN
PaG19 MADAARRGIPRPMPLVDARSIRLDLLAGGG..ADALAFDGTGLFQAARGGYGGSLLVVLGN
PaG5 RADAARRGIPRPMPLVDARSIRLDLLAGGG..ADALAFDGRGLEQAARGGYGGSLLVVLGN
PA7 RADAARRGIPRPMPLVDARSIRLDLLAGGG..ADALAFDGRGLEQAARGGYGGSLLVVLGN
PaG7 RADAARRGIPRPMPLVDARSIRLDLLAGGG..ADALAFDGRGLEQAARGGYGGSLLVVLGN
PaG33 RADAARRGIPRPMPLVDARSIRLDLLAGGG..ADALAFDGRGLEQAARGGYGGSLLVVLGN
PaG6 RADAARRGIPRPMPLVDARSIRLDLLAGGG..ADALAFDGRGLEQAARGGYGGSLLVVLGN
PaG1 RADAARRGIPRPMPLVDARSIRLDLLAGGG..ADALAFDGRGLEQAARGGYGGSLLVVLGN
PAO1 RADAARRGIPRPMPLVDARSIRLDLLAGGG..ADALAFDGRGLEQAARGGYGGSLLVVLGN

1890 1900 1910 1920 1930 1940
PaG28 NQRTEIVGAGAQASEGFQGVTLRADDLNAF GAARMVIGSTPAVLYGQGGNYVTFDI TDGA
PaG30 NQRTEIVGAGAQASEGFQGVTLRADDLNAF GAARMVIGSTPAVLYGQGGNYVTFDI TDGA
PA14 DQRTEIVGAGAQASEGFQGVTLRADDLNAF GAARMVIGSTPAVLYGQGGNYVTFDI TDGA
PaG2 NQRTEIVGAGAQASEGFQGVTLRADDLNAF GAARMVIGSTPAVLYGQGGNYVTFDI TDGA
PaG19 NQRTEIVGAGAQASEGFQGVTLRADDLNAF GAARMVIGSTPAVLYGQGGNYVTFDI TDGA
PaG5 NQRTEIVGAGAQASEGFQGVTLRADDLNAF GAARMVIGSTPAVLYGQGGNYVTFDI TDGA
PA7 NQRTEIVGAGAQASEGFQGVTLRADDLNAF GAARMVIGSTPAVLYGQGGNYVTFDI TDGA
PaG7 AGTEILPEGGLPDSDFAGVSLVADDLNAI GASRIAGTLPVVEYGEQGNVQFVGGSNRL
PaG33 AGTEILPEGGLPDSDFAGVSLVADDLNAI GASRIAGTLPVVEYGEQGNVQFVGGSNRL
PaG6 AGTEILPEGGLPDSDFAGVSLVADDLNAI GASRIAGTLPVVEYGEQGNVQFVGGSNRL
PaG1 AGTEILPEGGLPDSDFAGVSLVADDLNAI GASRIAGTLPVVEYGEQGNVQFVGGSNRL
PAO1 AGTEILPEGGLPDSDFAGVSLVADDLNAI GASRIAGTLPVVEYGEQGNVQFVGGSNRL

1950 1960 1970 1980 1990 2000
PaG28 QSVFLRNGAELAAPEVFL LANRPGEA ISLEQGAAIVTLGRGAAAYDARDGFYIYASGGRSM
PaG30 QSVFLRNGAELAAPEVFL LANRPGEA ISLEQGAAIVTLGRGAAAYDARDGFYIYASGGRSM
PA14 QSVFLRNGAELAAPEVFL LANRPGEA ISLEQGAAIVTLGRGAAAYDARDGFYIYASGGRSM
PaG2 QSVFLRNGAELAAPEVFL LANRPGEA ISLEQGAAIVTLGRGAAAYDARDGFYIYASGGRSM
PaG19 QSVFLRNGAELAAPEVFL LANRPGEA ISLEQGAAIVTLGRGAAAYDARDGFYIYASGGRSM
PaG5 RSVFLRNGAELAAPEVFL LANRPGEA ISLEQGAAIVTLGRGAAAYDARDGFYIYASGGRSM
PA7 RSVFLRNGAELAAPEVFL LANRPGEA ISLEQGAAIVTLGRGAAAYDARDGFYIYASGGRSM
PaG7 FPFVLRKGAHLSAPEVILGR....DITLLEGGSGITSLGKGTAYDSSDGFYIYQPGGRNL
PaG33 FPFVLRKGAHLSAPEVILGR....DITLLEGGSGITSLGKGTAYDSSDGFYIYQPGGRNL
PaG6 FPFVLRKGAHLSAPEVILGR....DITLLEGGSGITSLGKGTAYDSSDGFYIYQPGGRNL
PaG1 FPFVLRKGAHLSAPEVILGR....DITLLEGGSGITSLGKGTAYDSSDGFYIYQPGGRNL
PAO1 FPFVLRKGAHLSAPEVILGR....DITLLEGGSGITSLGKGTAYDSSDGFYIYQPGGRNL

2010 2020 2030 2040 2050 2060
PaG28 LALSNGV LNVLPPEAGT PDSGPGD ILLGVPAADGVAGE TRLYSEGS LVAATDKRFVLDGS
PaG30 LALSNGV LNVLPPEAGT PDSGPGD ILLGVPAADGVAGE TRLYSEGS LVAATDKRFVLDGS
PA14 LALSNGV LNVLPPEAGT PDSGPGD ILLGVPAADGVAGE TRLYSEGS LVAATDKRFVLDGS
PaG2 LALSNGV LNVLPPEAGT PDSGPGD ILLGVPAADGVAGE TRLYSEGS LVAATDKRFVLDGS
PaG19 LALSNGV LNVLPPEAGT PDSGPGD ILLGVPAADGVAGE TRLYSEGS LVAATDKRFVLDGS
PaG5 LALSNGV LNVLPPEAGT PDRGPGD ILLGVSAAGGAAGET RLYSEGS LVAATDKRFVLDSS
PA7 LALSNGV LNVLPPEAGT PDRGPGD ILLGVSAAGGAAGET RLYSEGS LVAATDKRFVLDSS
PaG7 LLLSNGW LNL LPAADSSLP...VRLGCAEAGACADTELYSEGLG IATNGVTTFGDN
PaG33 LLLSNGW LNL LPAADSSLP...VRLGCAEAGACADTELYSEGLG IATNGVTTFGDN
PaG6 LLLSNGW LNL LPAADSSLP...VRLGCAEAGACADTELYSEGLG IATNGVTTFGDN
PaG1 LLLSNGW LNL LPAADSSLP...VRLGCAEAGACADTELYSEGLG IATNGVTTFGDN
PAO1 LLLSNGW LNL LPAADSSLP...VRLGCAEAGACADTELYSEGLG IATNGVTTFGDN

2070 2080 2090 2100 2110 2120
PaG28 VRYGTRNLT LAA GGFNVGE QAL LAELAE RGVLP TGLALDQOVL DRLLQGDASE GAPPLET
PaG30 VRYGTRNLT LAA GGFNVGE QAL LAELAE RGVLP TGLALDQOVL DRLLQGDASE GAPPLET
PA14 VRYGTRNLT LAA GGFNVGE QAL LAELAE RGVLP TGLALDQOVL DRLLQGDASE GAPPLET
PaG2 VRYGTRNLT LAA GGFNVGE QAL LAELAE RGVLP TGLALDQOVL DRLLQGDASE GAPPLET
PaG19 VRYGTRNLT LAA GGFNVGE QAL LAELAE RGVLP TGLALDQOVL DRLLQGDASE GAPPLET
PaG5 VRYGTRNLT LAA GAFNVGE QAL LAGLA RGVLP TGLALDQOVL DRLLQGDASE GAPPLET
PA7 VRYGTRNLT LAA GAFNVGE QAL LAGLA RGVLP TGLALDQOVL DRLLQGDASE GAPPLET
PaG7 VRYGTRNLT LAA GAFNVGE QAL LAGLA RGVLP TGLALDQOVL DRLLQGDASE GAPPLET
PaG33 VRYGTRNLS LAL STINIGSSQS LADAAA RGVLP NGLALDQTVLQ RLLRGERGA GIPALEN
PaG6 VRYGTRNLS LAL STINIGSSQS LADAAA RGVLP NGLALDQTVLQ RLLRGERGA GIPALEN
PaG1 VRYGTRNLS LAL STINIGSSQS LADAAA RGVLP NGLALDQTVLQ RLLRGERGA GIPALEN
PAO1 VRYGTRNLS LAL STINIGSSQS LADAAA RGVLP NGLALDQTVLQ RLLRGERGA GIPALEN

2130 2140 2150 2160 2170 2180
PaG28 LVLNARDAFNF YGDVSLDSYDP SSGRSRLSR LVLGTPAIYGYGSDS SVASIRTSNLIWNG
PaG30 LVLNARDAFNF YGDVSLDSYDP SSGRSRLSR LVLGTPAIYGYGSDS SVASIRTSNLIWNG
PA14 LVLNARDAFNF YGDVSLDSYDP SSGRSRLSR LVLGTPAIYGYGSDS SVASIRTSNLIWNG
PaG2 LVLNARDAFNF YGDVSLDSYDP SSGRSRLSR LVLGTPAIYGYGSDS SVASIRTSNLIWNG
PaG19 LVLNARDAFNF YGDVSLDSYDP SSGRSRLSR LVLGTPAIYGYGSDS SVASIRTSNLIWNG
PaG5 LVLNARDAFNF YGDVSLDSYDPATGRSRLSR LVLGTPAIYGYGSDS SVASIRTSNLIWNG
PA7 LVLNARDAFNF YGDVSLDSYDPATGRSRLSR LVLGTPAIYGYGSDS SVASIRTSNLIWNG
PaG7 LVLNARDAFNF YGDVSLDSYDPATGRSRLSR LVLGTPAIYGYGSDS SVASIRTSNLIWNG
PaG33 LILSARDAVNI YGSVSLDYDPATGKSSLAN LVLGTPAIYGHGTGEDV ASIRTSASLVWSG
PaG6 LILSARDAVNI YGSVSLDYDPATGKSSLAN LVLGTPAIYGHGTGEDV ASIRTSASLVWSG
PaG1 LILSARDAVNI YGSVSLDYDPATGKSSLAN LVLGTPAIYGHGTGEDV ASIRTSASLVWSG
PAO1 LILSARDAVNI YGSVSLDYDPATGKSSLAN LVLGTPAIYGHGTGEDV ASIRTSASLVWSG

2190 2200 2210 2220 2230 2240
PaG28 AQTTPAAGVITGGAGSGOGLDIRSERLEFGYGPFSOPSAIDSYORLALGFATVNLASER
PaG30 AQTTPAAGVITGGAGSGOGLDIRSERLEFGYGPFSOPSAIDSYORLALGFATVNLASER
PA14 AQTTPAAGVITGGAGSGOGLDIRSERLEFGYGPFSOPSAIDSYORLALGFATVNLASER
PaG2 AQTTPAAGVITGGAGSGOGLDIRSERLEFGYGPFSOPSAIDSYORLALGFATVNLASER
PaG19 AQTTPAAGVITGGAGSGOGLDIRSERLEFGYGPFSOPSAIDSYORLALGFATVNLASER
PaG5 AQTTPAAGVITGGAGSGOGLDIRSERLEFGYGPFSOPSAIDSYORLALGFATVNLASER
PA7 AQTTPAAGVITGGAGSGOGLDIRSERLEFGYGPFSOPSAIDSYORLALGFATVNLASER
PaG7 SSOPAAAPVAGGAGSGSGLTRVDAERITLGYANTOPAGETDEARLALGFABVOLNASER
PaG33 SSOPAAAPVAGGAGSGSGLTRVDAERITLGYANTOPAGETDEARLALGFABVOLNASER
PaG6 SSOPAAAPVAGGAGSGSGLTRVDAERITLGYANTOPAGETDEARLALGFABVOLNASER
PaG1 SSOPAAAPVAGGAGSGSGLTRVDAERITLGYANTOPAGETDEARLALGFABVOLNASER
PAO1 SSOPAAAPVAGGAGSGSGLTRVDAERITLGYANTOPAGETDEARLALGFABVOLNASER

2250 2260 2270 2280 2290 2300
PaG28 ITANHKGSLAVYQSQGEYRAGSGYAYSGGDLNLI TPLL TGEAGSRNSLLAGGALRVSAGG
PaG30 ITANHKGSLAVYQSQGEYRAGSGYAYSGGDLNLI TPLL TGEAGSRNSLLAGGALRVSAGG
PA14 ITANHKGSLAVYQSQGEYRAGSGYAYSGGDLNLI TPLL TGEAGSRNSLLAGGALRVSAGG
PaG2 ITANHKGSLAVYQSQGEYRAGSGYAYSGGDLNLI TPLL TGEAGSRNSLLAGGALRVSAGG
PaG19 ITANHKGSLAVYQSQGEYRAGSGYAYSGGDLNLI TPLL TGEAGSRNSLLAGGALRVSAGG
PaG5 ITANHKGSLAVYQSQGEYRAGSGYAYSGGDLNLI TPLL TGEAGSRNSLLAGGALRVSAGG
PA7 ITANHKGSLAVYQSQGEYRAGSGYAYSGGDLNLI TPLL TGEAGSRNSLLAGGALRVSAGG
PaG7 ISANHKGSLRVYQRLDGYVAGEGLRYSGGDLRLS TPLL TGEAGSLSRISGGSLSLAAPA
PaG33 ISANHKGSLRVYQRLDGYVAGEGLRYSGGDLRLS TPLL TGEAGSLSRISGGSLSLAAPA
PaG6 ISANHKGSLRVYQRLDGYVAGEGLRYSGGDLRLS TPLL TGEAGSLSRISGGSLSLAAPA
PaG1 ISANHKGSLRVYQRLDGYVAGEGLRYSGGDLRLS TPLL TGEAGSLSRISGGSLSLAAPA
PAO1 ISANHKGSLRVYQRLDGYVAGEGLRYSGGDLRLS TPLL TGEAGSLSRISGGSLSLAAPA

2310 2320 2330 2340 2350 2360
PaG28 GGAASTPV ELANGALGAELALEGASLLDTRVGLPSGKLSLTAQEDLELGAQAQLDLAGR
PaG30 GGAASTPV ELANGALGAELALEGASLLDTRVGLPSGKLSLTAQEDLELGAQAQLDLAGR
PA14 GGAASTPV ELANGALGAELALEGASLLDTRVGLPSGKLSLTAQEDLELGAQAQLDLAGR
PaG2 GGAASTPV ELANGALGAELALEGASLLDTRVGLPSGKLSLTAQEDLELGAQAQLDLAGR
PaG19 GGAASTPV ELANGALGAELALEGASLLDTRVGLPSGKLSLTAQEDLELGAQAQLDLAGR
PaG5 GNVTSAPL ELANGALGAELALEGASLLDTRVGLPSGKLSLTAQEDLELGAQAQLDLAGR
PA7 GNVTSAPL ELANGALGAELALEGASLLDTRVGLPSGKLSLTAQEDLELGAQAQLDLAGR
PaG7 GAAAVTFDSGTAGLGAELSLSAREIRLDSAVSLPSGKLSLTAQEDLELGDGARDLAGR
PaG33 GAAAVTFDSGTAGLGAELSLSAREIRLDSAVSLPSGKLSLTAQEDLELGDGARDLAGR
PaG6 GAAAVTFDSGTAGLGAELSLSAREIRLDSAVSLPSGKLSLTAQEDLELGDGARDLAGR
PaG1 GAAAVTFDSGTAGLGAELSLSAREIRLDSAVSLPSGKLSLTAQEDLELGDGARDLAGR
PAO1 GAAAVTFDSGTAGLGAELSLSAREIRLDSAVSLPSGKLSLTAQEDLELGDGARDLAGR

2370 2380 2390 2400 2410 2420
PaG28 ALRFDDVIRYSWGGEVNLLSHGGNIRQAGASRIDLSANNQAGSLTAVALDSAAGVVDLQ
PaG30 ALRFDDVIRYSWGGEVNLLSHGGNIRQAGASRIDLSANNQAGSLTAVALDSAAGVVDLQ
PA14 ALRFDDVIRYSWGGEVNLLSHGGNIRQAGASRIDLSANNQAGSLTAVALDSAAGVVDLQ
PaG2 ALRFDDVIRYSWGGEVNLLSHGGNIRQAGASRIDLSANNQAGSLTAVALDSAAGVVDLQ
PaG19 ALRFDDVTIRYSWGGEVNLLSHGGNIRQAGASRIDLSANNQAGSLTAVALDSAAGVVDLQ
PaG5 AVRFDVTRYSWGGEVNLLSRGGDIRQAGASRIDLSANNRAGSLTAVALGSEAGVVDLQ
PA7 AVRFDVTRYSWGGEVNLLSRGGDIRQAGASRIDLSANNRAGSLTAVALGSEAGVVDLQ
PaG7 KASFDVTKYSWGGDLLLSRAGDIRQAGASRIDLSANNRGGTLSAVALAEDAGVVDLQ
PaG33 KASFDVTKYSWGGDLLLSRAGDIRQAGASRIDLSANNRGGTLSAVALAEDAGVVDLQ
PaG6 KASFDVTKYSWGGDLLLSRAGDIRQAGASRIDLSANNRGGTLSAVALAEDAGVVDLQ
PaG1 KASFDVTKYSWGGDLLLSRAGDIRQAGASRIDLSANNRGGTLSAVALAEDAGVVDLQ
PAO1 KASFDVTKYSWGGDLLLSRAGDIRQAGASRIDLSANNRGGTLSAVALAEDAGVVDLQ

2430 2440 2450 2460 2470 2480
PaG28 GQITLAASSGEYDAGGTLVPYAAGSVEIRAQRLLGEGTTPDSRFADLNQRLNAGQVFGARSF
PaG30 GQITLAASSGEYDAGGTLVPYAAGSVEIRAQRLLGEGTTPDSRFADLNQRLNAGQVFGARSF
PA14 GQITLAASSGEYDAGGTLVPYAAGSVEIRAQRLLGEGTTPDSRFADLNQRLNAGQVFGARSF
PaG2 GQITLAASSGEYDAGGTLVPYAAGSVEIRAQRLLGEGTTPDSRFADLNQRLNAGQVFGARSF
PaG19 GQITLAASSGEYDAGGTLVPYAAGSVEIRAQRLLGEGTTPDSRFADLNQRLNAGQVFGARSF
PaG5 GQITLAASSGEYDAGGTLVPYAAGSVEIRAQRLLGEGTTPDSRFADLNQRLNAGQVFGARSF
PA7 GQITLAASSGEYDAGGTLVPYAAGSVEIRAQRLLGEGTTPDSRFADLNQRLNAGQVFGARSF
PaG7 GRITLGGASGDYDAGGTRVPLGGELEIRAQRLLGEGTTPDSRFADLNQRLNAGQVFGARSF
PaG33 GRITLGGASGDYDAGGTRVPLGGELEIRAQRLLGEGTTPDSRFADLNQRLNAGQVFGARSF
PaG6 GRITLGGASGDYDAGGTRVPLGGELEIRAQRLLGEGTTPDSRFADLNQRLNAGQVFGARSF
PaG1 GRITLGGASGDYDAGGTRVPLGGELEIRAQRLLGEGTTPDSRFADLNQRLNAGQVFGARSF
PAO1 GRITLGGASGDYDAGGTRVPLGGELEIRAQRLLGEGTTPDSRFADLNQRLNAGQVFGARSF

2490 2500 2510 2520 2530 2540
PaG28 QIKQGDNLIGNDVRASTIEVSLDGGHLSVNGVLDASGEQVGSIRLAAKQGLSTIGGEALLD
PaG30 QIKQGDNLIGNDVRASTIEVSLDGGHLSVNGVLDASGEQVGSIRLAAKQGLSTIGGEALLD
PA14 QIKQGDNLIGNDVRASTIEVSLDGGHLSVNGVLDASGEQVGSIRLAAKQGLSTIGGEALLD
PaG2 QIKQGDNLIGNDVRASTIEVSLDGGHLSVNGVLDASGEQVGSIRLAAKQGLSTIGGEALLD
PaG19 QIKQGDNLIGNDVRASTIEVSLDGGHLSVNGVLDASGEQVGSIRLAAKQGLSTIGGEALLD
PaG5 QIKQGDLTIGSEVKAATAIEVSLDGGHLSVNGVLDASGEQVGSIRLAAKQGLSTIGGEALLD
PA7 QIKQGDLTIGSEVKAATAIEVSLDGGHLSVNGVLDASGEQVGSIRLAAKQGLSTIGGEALLD
PaG7 QIKQGDLLQIGDGLKAHRIEVSLDNGQLCVSGTVLDASGAQVGEIRLAAKQGLSTIGGNALLD
PaG33 QIKQGDLLQIGDGLKAHRIEVSLDNGQLCVSGTVLDASGAQVGEIRLAAKQGLSTIGGNALLD
PaG6 QIKQGDLLQIGDGLKAHRIEVSLDNGQLCVSGTVLDASGAQVGEIRLAAKQGLSTIGGNALLD
PaG1 QIKQGDLLQIGDGLKAHRIEVSLDNGQLCVSGTVLDASGAQVGEIRLAAKQGLSTIGGNALLD
PAO1 QIKQGDLLQIGDGLKAHRIEVSLDNGQLCVSGTVLDASGAQVGEIRLAAKQGLSTIGGNALLD

2550 2560 2570 2580 2590 2600
PaG28 AHGRRRLRVDSYCKIIDSPNRALIELNAGDGLLSLGA GARIDLRHGTAAAGSAPGQNDGV
PaG30 AHGRRRLRVDSYCKIIDSPNRALIELNAGDGLLSLGA GARIDLRHGTAAAGSAPGQNDGV
PA14 AHGRRRLRVDSYCKIIDSPNRALIELNAGDGLLSLGA GARIDLRHGTAAAGSAPGQNDGV
PaG2 AHGRRRLRVDSYCKIIDSPNRALIELNAGDGLLSLGA GARIDLRHGTAAAGSAPGQNDGV
PaG19 AHGRRRLRVDSYCKIIDSPNRALIELNAGDGLLSLGA GARIDLRHGTAAAGSAPGQNDGV
PaG5 AHGRRRLRVDSYCKIIDSPNRALIELNAGDGLLSLGA GARIDLRHGTAAAGSAPGQNDGV
PA7 AHGRRRLRVDSYCKIIDSPNRALIELNAGDGLLSLGA GARIDLRHGTAAAGSAPGQNDGV
PaG7 AHGSLLRVDSYCKIIDSPNRAMVELSSGSGTLVLAGGARIDLRHGTAAAPAEQVDG...V
PaG33 AHGSLLRVDSYCKIIDSPNRAMVELSSGSGTLVLAGGARIDLRHGTAAAPAEQVDG...V
PaG6 AHGSLLRVDSYCKIIDSPNRAMVELSSGSGTLVLAGGARIDLRHGTAAAPAEQVDG...V
PaG1 AHGSLLRVDSYCKIIDSPNRAMVELSSGSGTLVLAGGARIDLRHGTAAAPAEQVDG...V
PAO1 AHGSLLRVDSYCKIIDSPNRAMVELSSGSGTLVLAGGARIDLRHGTAAAPAEQVDG...V

2610 2620 2630 2640 2650 2660
PaG28 ARGTLDLVAPRLGGATAGDIAIDAGAPLQILGARATLSAVQRYDDAPVAALPASNGRYP
PaG30 ARGTLDLVAPRLGGATAGDIAIDAGAPLQILGARATLSAVQRYDDAPVAALPASNGRYP
PA14 ARGTLDLVAPRLGGATAGDIAIDAGAPLQILGARATLSAVQRYDDAPVAALPASNGRYP
PaG2 ARGTLDLVAPRLGGATAGDIAIDAGAPLQILGARATLSAVQRYDDAPVAALPASNGRYP
PaG19 ARGTLDLVAPRLGGATAGDIAIDAGAPLQILGARATLSAVQRYDDAPVAALPASNGRYP
PaG5 ARGSLDLVAPRLGGATAGDIAVDASGPTLQILGARTTLNAVQRYDDAPSAAPASNGRAY
PA7 ARGSLDLVAPRLGGATAGDIAVDASGPTLQILGARTTLNAVQRYDDAPSAAPASNGRAY
PaG7 ARGTLLENAPRLGGVVSAGDIAIDASGALDIRGAGSTALNAVQRYDDAPWGNDFPAGGRYP
PaG33 ARGTLLENAPRLGGVVSAGDIAIDASGALDIRGAGSTALNAVQRYDDAPWGNDFPAGGRYP
PaG6 ARGTLLENAPRLGGVVSAGDIAIDASGALDIRGAGSTALNAVQRYDDAPWGNDFPAGGRYP
PaG1 ARGTLLENAPRLGGVVSAGDIAIDASGALDIRGAGSTALNAVQRYDDAPWGNDFPAGGRYP
PAO1 ARGTLLENAPRLGGVVSAGDIAIDASGALDIRGAGSTALNAVQRYDDAPWGNDFPAGGRYP

	2670	2680	2690	2700	2710	2720
PaG28	Q E I T Q A Y L D G K H Q Q S E L F M Q A A L A N S A L L D G K L A G L N N A T Y A E A F H L R P G E I V S A T A D G					
PaG30	Q E I T Q A Y L D G K H Q Q S E L F M Q A A L A N S A L L D G K L A G L N N A T Y A E A F H L R P G E I V S A T A D G					
PA14	Q E I T Q A Y L D G K H Q Q S E L F M Q A A L A N S A L L D G K L A G L N N A T Y A E A F H L R P G E I V S A T A D G					
PaG2	Q E I T Q A Y L D G K H Q Q S E L F M Q A A L A N S A L L D G K L A G L N N A T Y A E A F H L R P G E I V S A T A D G					
PaG19	Q E I T Q A Y L D G K H Q Q S E L F M Q A A L A N S A L L D G K L A G L N N A A Y A E A F H L R P E I V S A T A D G					
PaG5	Q E I T Q A Y L D G K H Q Q N E L F M Q A A L A N A A L L D G K L A G L N D A A Y A D A F H L R P G E I V S A T A D G					
PA7	Q E I T Q A Y L D G K H Q Q N E L F M Q A A L A N A A L L D G K L A G L N D A A Y A D A F H L R P G E I V S A T A D G					
PaG7	Q V I D Q A Y L D A R H A E S S A F I A A A L A N R E L L D G K L A G L T N A T Y A D A F H L R P G V E I V S A T A D G					
PaG33	Q V I D Q A Y L D A R H A E S S A F I A A A L A N R E L L D G K L A G L T N A T Y A D A F H L R P G V E I V S A T A D G					
PaG6	Q V I D Q A Y L D A R H A E S S A F I A A A L A N R E L L D G K L A G L T N A T Y A D A F H L R P G V E I V S A T A D G					
PaG1	Q V I D Q A Y L D A R H A E S S A F I A A A L A N R E L L D G K L A G L T N A T Y A D A F H L R P G V E I V S A T A D G					
PAO1	Q V I D Q A Y L D A R H A E S S A F I A A A L A N R E L L D G K L A G L T N A T Y A D A F H L R P G V E I V S A T A D G					

	2730	2740	2750	2760	2770	2780
PaG28	D L V V Q G D L D L S C H R Y A S L N P R T A K T S V Y G S G E A G S L A I R A G G D L N I Y G S V T D G F A P P P E T					
PaG30	D L V V Q G D L D L S C H R Y A S L N P R T A K T S V Y G S G E A G S L A I R A G G D L N I Y G S V T D G F A P P P E T					
PA14	D L V V Q G D L D L S C H R Y A S L N P R T A K T S V Y G S G E A G S L A I R A G G D L N I Y G S V T D G F A P P P E T					
PaG2	D L V V Q G D L D L S C H R Y A S L N P R T A K T S V Y G S G E A G S L A I R A G G D L N I Y G S V T D G F A P P P E T					
PaG19	D L V V Q G D L D L S C H R Y A S L N P R T A K T S V Y G S G E A G S L A I R A G G D L N I Y G S V T D G F A P P P E T					
PaG5	D L V V Q G D L D L S C Y R Y A S L N P H T A K T M V Y G S G E A G S L A I R A G G D L N I Y G S V T D G F A P P P E T					
PA7	D L V V Q G D L D L S C Y R Y A S L N P H T A K T M V Y G S G E A G S L A I R A G G D L N I Y G S V T D G F A P P P E T					
PaG7	D L V V Q G D L D L S C Y R Y A S L N P N T P L T E V Y G S G E V G A L V L R A G G D L N I Y G S I N D G F A P P P D S					
PaG33	D L V V Q G D L D L S C Y R Y A S L N P N T P L T E V Y G S G E V G A L V L R A G G D L N I Y G S I N D G F A P P P D S					
PaG6	D L V V Q G D L D L S C Y R Y A S L N P N T P L T E V Y G S G E V G A L V L R A G G D L N I Y G S I N D G F A P P P D S					
PaG1	D L V V Q G D L D L S C Y R Y A S L N P N T P L T E V Y G S G E V G A L V L R A G G D L N I Y G S I N D G F A P P P D S					
PAO1	D L V V Q G D L D L S C Y R Y A S L N P N T P L T E V Y G S G E V G A L V L R A G G D L N I Y G S I N D G F A P P P D S					

	2790	2800	2810	2820	2830	2840
PaG28	D D D G G W L L L A G Q D H L G G D R V V P T A G V R L D D D S F F P A G K T L N F E L P I K A M T L A A G T R L P V E					
PaG30	D D D G G W L L L A G Q D H L G G D R V V P T A G V R L D D D S F F P A G K T L N F E L P I K A M T L A A G T R L P V E					
PA14	D D D G G W L L L A G Q D H L G G D R V V P T A G V R L D D D S F F P A G K T L N F E L P I K A M T L A A G T R L P V E					
PaG2	D D D G G W L L L A G Q D H L G G D R V V P T A G V R L D D D S F F P A G K T L N F E L P I K A M T L A A G T R L P V E					
PaG19	D D D G G W L L L A G Q D H L G G D R V V P T A G V R L D D D S F F P A G K T L N F E L P I K A M T L A A G T R L P V E					
PaG5	D D D G G W R L L S G Q D R L G G D R V V P A A G V R L D D D S F F P A G K T L N F E L P I K A M T L A A G T R L P V E					
PA7	D D D G G W R L L S G Q D R L G G D R V V P A A G V R L D D D S F F P A G K T L N F E L P I K A M T L A A G T R L P V E					
PaG7	P D D K G W I L T P G V Q P F G G D L V V P G P G V V L G D G T A F L G G R T L N Y D L P I K G T I L A A G T R L A T E					
PaG33	P D D K G W I L T P G V Q P F G G D L V V P G P G V V L G D G T A F L G G R T L N Y D L P I K G T I L A A G T R L A T E					
PaG6	P D D K G W I L T P G V Q P F G G D L V V P G P G V V L G D G T A F L G G R T L N Y D L P I K G T I L A A G T R L A T E					
PaG1	P D D K G W I L T P G V Q P F G G D L V V P G P G V V L G D G T A F L G G R T L N Y D L P I K G T I L A A G T R L A T E					
PAO1	P D D K G W I L T P G V Q P F G G D L V V P G P G V V L G D G T A F L G G R T L N Y D L P I K G T I L A A G T R L A T E					

	2850	2860	2870	2880	2890	2900
PaG28	A V L S O P L Q L P A G T V L E G A L L D A A G N L L R P A G S L L G E A L D L P A G T R L G A G S R R P L A T P V T G					
PaG30	A V L S O P L Q L P A G T V L E G A L L D A A G N L L R P A G S L L G E A L D L P A G T R L G A G S R R P L A T P V T G					
PA14	A V L S O P L Q L P A G T V L E G A L L D A A G N L L R P A G S L L G E A L D L P A G T R L G A G S R R P L A T P V T G					
PaG2	A V L S O P L Q L P A G T V L E G A L L D A A G N L L R P A G S L L G E A L D L P A G T R L G A G S R R P L A T P V T G					
PaG19	A V L S O P L Q L P A G T V L E G A L L D A A G N L L R P A G S L L G E A L D L P A G T R L G A G S R R P L A T P V T G					
PaG5	A V L S O P L R L P A G T V L E G A L L D A A G N L L Q P A G S L L G E A L E L P A G T R L G A G S R R P L A T P V M A					
PA7	A V L S O P L R L P A G T V L E G A L L D A A G N L L Q P A G S L L G E A L E L P A G T R L G A G S R R P L A T P V M A					
PaG7	A V L E O P Y T L A A G S V L V A D I H D A A G N L L Y A A G S L L R D G V T L E V G S R L G A G T L L A A P A S V Q A					
PaG33	A V L E O P Y T L A A G S V L V A D I H D A A G N L L Y A A G S L L R D G V T L E V G S R L G A G T L L A A P A S V Q A					
PaG6	A V L E O P Y T L A A G S V L V A D I H D A A G N L L Y A A G S L L R D G V T L E V G S R L G A G T L L A A P A S V Q A					
PaG1	A V L E O P Y T L A A G S V L V A D I H D A A G N L L Y A A G S L L R D G V T L E V G S R L G A G T L L A A P A S V Q A					
PAO1	A V L E O P Y T L A A G S V L V A D I H D A A G N L L Y A A G S L L R D G V T L E V G S R L G A G T L L A A P A S V Q A					

	2910	2920	2930	2940	2950	2960
PaG28	M T W P G G V P L P G R A T L A N D E V D G V R L A G G L A L R A G A F L P A G S D I R L P D G A A S V D V R P A G A V					
PaG30	M T W P G G V P L P G R A T L A S G E V D G V R L A G G L A L R A G A F L P A G S D I R L P D G A A S V D V R P A G A V					
PA14	M T W P G G V P L P G R A T L A N D E V D G V R L A G G L A L R A G A F L P A G S D I R L P D G A A S V D V R P A G A V					
PaG2	M T W P G G V P L P G R A T L A N D E V D G V R L A G G L A L R A G A F L P A G S D I R L P D G A A S V D V R P A G A V					
PaG19	M T W P G G V P L P G R A T L A N D E V D G V R L A G G L A L R A G A F L P A G S D I R L P D G A A S V D V R P A G A V					
PaG5	M S W P G G V P L P G R A T L A N G E A D G V R L A G G L E L R A G A F L P A G S D I R L P D G A A S V D V R P V G A V					
PA7	M S W P G G V P L P G R A T L A N G E A D G V R L A G G L E L R A G A F L P A G S D I R L P D G A A S V D V R P V G A V					
PaG7	M T W P A G V P L P S I L R E G P S R P N V L L L N G E L A L A R G S L I P S Q T E V V L A G D A P F I E L R P S D G V					
PaG33	M I W P A G V P L P S I L R E G P S T P N V L L L N G E L A L A R G S L I P S Q T E V V L A G D A P F I E L R P S D G V					
PaG6	M T W P A G V P L P S I L R E G P S R P N V L L L N G E L A L A R G S L I P S Q T E V V L A G D A P F I E L R P S D G V					
PaG1	M T W P A G V P L P S I L R E G P S R P N V L L L N G E L A L A R G S L I P S Q T E V V L A G D A P F I E L R P S D G V					
PAO1	M T W P A G V P L P S I L R E G P S R P N V L L L N G E L A L A R G S L I P S Q T E V V L A G D A P F I E L R P S D G V					

2970 2980 2990 3000 3010 3020
PaG28 S...HNWAIAPMLAAGSQSWSVRLVAGADLQAADPRITDPRSSGQMR LADTHYGMRRIPAA
PaG30 S...HNWAIAPMLAAGSQSWSVRLVAGADLQAADPRITDPRSSGQMR LADTHYGMRRIPAA
PA14 S...HNWAIAPMLAAGSQSWSVRLVAGADLQAADPRITDPRSSGQMR LADTHYGMRRIPAA
PaG2 S...HNWAIAPMLAAGSQSWSVRLVAGADLQAADPRITDPRSSGQMR LADTHYGMRRIPAA
PaG19 S...HNWAIAPMLAAGSQSWSVRLVAGADLQAADPRITDPRSSGQMR LADTHYGMRRIPAA
PaG5 S...HNWAIAPMLAAGSQSWSVRLVAGADLQAADPRITDPLSRGQMR LADTHYGMRRIPAT
PA7 S...HNWAIAPMLAAGSQSWSVRLVAGADLQAADPRITDPLSRGQMR LADTHYGMRRIPAT
PaG7 RQGRNWALAEMLPAGSQSWSMRLVAGADLAADNRLVRFDDSSASLN LADTHYQAKIEQSS
PaG33 RQGRNWALAEMLPAGSQSWSMRLVAGADLAADNRLVRFDDSSASLN LADTHYQAKIEQSS
PaG6 RQGRNWALAEMLPAGSQSWSMRLVAGADLAADNRLVRFDDSSASLN LADTHYQAKIEQSS
PaG1 RQGRNWALAEMLPAGSQSWSMRLVAGADLAADNRLVRFDDSSASLN LADTHYQAKIEQSS
PAO1 RQGRNWALAEMLPAGSQSWSMRLVAGADLAADNRLVRFDDSSASLN LADTHYQAKIEQSS

3030 3040 3050 3060 3070 3080
PaG28 GGGLVWTQEGVDNWGDPSLKPDPPLDPEALGYPTICDDFFPTWCASSGGMVWTEEGVAGW
PaG30 GGGLVWTQEGVDNWGDPSLKPDPPLDPEALGYPTICDDFFPTWCASSGGMVWTEEGVAGW
PA14 GGGLVWTQEGVDNWGDPSLKPDPPLDPEALGYPTICDDFFPTWCASSGGMVWTEEGVAGW
PaG2 GGGLVWTQEGVDNWGDPSLKPDPPLDPEALGYPTICDDFFPTWCASSGGMVWTEEGVAGW
PaG19 GGGLVWTQEGVDNWGDPSLKPDPPLDPEALGYPTICDDFFPTWCASSGGMVWTEEGVAGW
PaG5 GGGLVWTQEGVDNWGDPSLKPDPPLDPEALGYPTICDDFFPTWCASSGGMVWTEEGVAGW
PA7 GGGLVWTQEGVDNWGDPSLKPDPPLDPEALGYPTICDDFFPTWCASSGGMVWTEEGVAGW
PaG7 GG...LVFTDQATDWGITPGTVDDESNEWICGLGPYCAEPPRWTWAPGNYLGMPAGTAIGE
PaG33 GG...LVFTDQATDWGITPGTVDDESNEWICGLGPYCAEPPRWTWAPGNYLGMPAGTAIGE
PaG6 GG...LVFTDQATDWGITPGTVDDESNEWICGLGPYCAEPPRWTWAPGNYLGMPAGTAIGE
PaG1 GG...LVFTDQATDWGITPGTVDDESNEWICGLGPYCAEPPRWTWAPGNYLGMPAGTAIGE
PAO1 GG...LVFTDQATDWGITPGTVDDESNEWICGLGPYCAEPPRWTWAPGNYLGMPAGTAIGE

3090 3100 3110 3120 3130 3140
PaG28 GDPGKPGDLDPEALGYPTICDDFFPTWCASSDDYALEAEPYASRFSVLRGTGDDLDF
PaG30 GDPGKPGDLDPEALGYPTICDDFFPTWCASSDDYALEAEPYASRFSVLRGTGDDLDF
PA14 GDPGKPGDLDPEALGYPTICDDFFPTWCASSDDYALEAEPYASRFSVLRGTGDDLDF
PaG2 GDPGKPGDLDPEALGYPTICDDFFPTWCASSDDYALEAEPYASRFSVLRGTGDDLDF
PaG19 GDPGKPGDLDPEALGYPTICDDFFPTWCASSDDYALEAEPYASRFSVLRGTGDDLDF
PaG5 GDPGKPGDLDPEALGYPTICDDFFPTWCASSDDYALEAEPYASRFSVLRGTGDDLDF
PA7 GDPGKPGDLDPEALGYPTICDDFFPTWCASSDDYALEAEPYASRFSVLRGTGDDLDF
PaG7 GDLWCSVDP SLCIEN.....LGKTVVTPQNQLFSVLRGTGDDLDA
PaG33 GDLWCSVDP SLCIEN.....LGKTVVTPQNQLFSVLRGTGDDLDA
PaG6 GDLWCSVDP SLCIEN.....LGKTVVTPQNQLFSVLRGTGDDLDA
PaG1 GDLWCSVDP SLCIEN.....LGKTVVTPQNQLFSVLRGTGDDLDA
PAO1 GDLWCSVDP SLCIEN.....LGKTVVTPQNQLFSVLRGTGDDLDA

3150 3160 3170 3180 3190 3200
PaG28 AAGNLRMDSPFCVYTAGTASAVDSSYNLARARDGGSVLRDPAALGGYEQWVGGGOSLYSA
PaG30 AAGNLRMDSPFCVYTAGTASAVDSSYNLARARDGGSVLRDPAALGGYEQWVGGGOSLYSA
PA14 AAGNLRMDSPFCVYTAGTASAVDSSYNLARARDGGSVLRDPAALGGYEQWVGGGOSLYSA
PaG2 AAGNLRMDSPFCVYTAGTASAVDSSYNLARARDGGSVLRDPAALGGYEQWVGGGOSLYSA
PaG19 AAGNLRMDSPFCVYTAGTASAVDSSYNLARARDGGSVLRDPAALGGYEQWVGGGOSLYSA
PaG5 AAGNLRMDSPFCVYTAGTASAVDSSYNLARARDGGSVLRDPAALGGYEQWVGGGOSLYSA
PA7 AAGNLRMDSPFCVYTAGTASAVDSSYNLARARDGGSVLRDPAALGGYEQWVGGGOSLYSA
PaG7 SAGNLTQWSPFCVYTAGTQAADVATG...FNQPRGLFNGSVLGCAGGADYEVLS TSQYQA
PaG33 SAGNLTQWSPFCVYTAGTQAADVATG...FNQPRGLFNGSVLGCAGGADYEVLS TSQYQA
PaG6 SAGNLTQWSPFCVYTAGTQAADVATG...FNQPRGLFNGSVLGCAGGADYEVLS TSQYQA
PaG1 SAGNLTQWSPFCVYTAGTQAADVATG...FNQPRGLFNGSVLGCAGGADYEVLS TSQYQA
PAO1 SAGNLTQWSPFCVYTAGTQAADVATG...FNQPRGLFNGSVLGCAGGADYEVLS TSQYQA

3210 3220 3230 3240 3250 3260
PaG28 WYPTLGGNLTAVGGDLRQDVLGRLSGAVP..NAGYD SAAVGNWLWRQGS GSTAGTADR T
PaG30 WYPTLGGNLTAVGGDLRQDVLGRLSGAVP..NAGYD SAAVGNWLWRQGS GSTAGTADR T
PA14 WYPTLGGNLTAVGGDLRQDVLGRLSGAVP..NAGYD SAAVGNWLWRQGS GSTAGTADR T
PaG2 WYPTLGGNLTAVGGDLRQDVLGRLSGAVP..NAGYD SAAVGNWLWRQGS GSTAGTADR T
PaG19 WYPTLGGNLTAVGGDLRQDVLGRLSGAVP..NAGYD SAAVGNWLWRQGS GSTAGTADR T
PaG5 WYPTLGGNLTAVGGDLRQDVLGRLSGAVS..NTGQD SAAVGNWLWRQGS ASTAGTTDA T
PA7 WYPTLGGNLTAVGGDLRQDVLGRLSGAVS..NTGQD SAAVGNWLWRQGS ASTAGTTDA T
PaG7 WYPTLGGNLTAVGGDLRQDQWAEKLTSSDPIRPLP SAAVGNWLWRQGS ADRE..GVP T
PaG33 WYPTLGGNLTAVGGDLRQDQWAEKLTSSDPIRPLP SAAVGNWLWRQGS ADRE..GVP T
PaG6 WYPTLGGNLTAVGGDLRQDQWAEKLTSSDPIRPLP SAAVGNWLWRQGS ADRE..GVP T
PaG1 WYPTLGGNLTAVGGDLRQDQWAEKLTSSDPIRPLP SAAVGNWLWRQGS ADRE..GVP T
PAO1 WYPTLGGNLTAVGGDLRQDQWAEKLTSSDPIRPLP SAAVGNWLWRQGS ADRE..GVP T

3270 3280 3290 3300 3310 3320
PaG28 AWWINFGTYARQPGGDGAAAATQQVGFTEI GTLGGGLSLKVA GDAGVIEARTSSVPEE
PaG30 AWWINFGTYARQPGGDGAAAATQQVGFTEI GTLGGGLSLKVA GDAGVIEARTSSVPEE
PA14 AWWINFGTYARQPGGDGAAAATQQVGFTEI GTLGGGLSLKVA GDAGVIEARTSSVPEE
PaG2 AWWINFGTYARQPGGDGAAAATQQVGFTEI GTLGGGLSLKVA GDAGVIEARTSSVPEE
PaG19 AWWINFGTYARQPGGDGAAAATQQVGFTEI GTLGGGLSLKVA GDAGVIEARTSSVPEE
PaG5 AWWINFGTYARQPGSEGAAAATQQVGFTEI GTLGGGLSLRVA GDAGVIEARTSSVAQVR
PA7 AWWINFGTYARQPGSEGAAAATQQVGFTEI GTLGGGLSLRVA GDAGVIEARTSSVAQVR
PaG7 AWWINFGSYVRGAEGL...DAPYL VGFTGF GTLGGGLSMRTG GDAGNIAPRGDGSIPSS
PaG33 AWWINFGSYVRGAEGL...DAPYL VGFTGF GTLGGGLSMRTG GDAGNIAPRGDGSIPSS
PaG6 AWWINFGSYVRGAEGL...DAPYL VGFTGF GTLGGGLSMRTG GDAGNIAPRGDGSIPSS
PaG1 AWWINFGSYVRGAEGL...DAPYL VGFTGF GTLGGGLSMRTG GDAGNIAPRGDGSIPSS
PAO1 AWWINFGSYVRGAEGL...DAPYL VGFTGF GTLGGGLSMRTG GDAGNIAPRGDGSIPSS

3330 3340 3350 3360
PaG28 ...SQRSOGLVLAVGSSGRV GADGQLTSSGGGMDVRIGGALNP...
PaG30 ...SQRSOGLVLAVGSSGRV GADGQLTSSGGGMDVRIGGALNP...
PA14 ...SQRSOGLVLAVGSSGRV GADGQLTSSGGGMDVRIGGALNP...
PaG2 ...SQRSOGLVLAVGSSGRV GADGQLTSSGGGMDVRIGGALNP...
PaG19 ...SQRSOGLVLAVGSSGRV GADGQLTSSGGGMDVRIGGALNP...
PaG5 ...SQRSOGLVLAVGSSGRV GEDGRLSLSSGGGMDVRIGGALNP...
PA7 ...SQRSOGLVLAVGSSGRV GEDGRLSLSSGGGMDVRIGGALNP...
PaG7 GNLNFRSOGLVLAVAGTGR L TSDGALOLGGGDLNVRIGGEVNP SREARATQTYSSSGFD
PaG33 GNLNFRSOGLVLAVAGTGR L TSDGALOLGGGDLNVRIGGEVNP SREARATQTYSSSGFD
PaG6 GNLNFRSOGLVLAVAGTGR L TSDGALOLGGGDLNVRIGGEVNP SREARATQTYSSSGFD
PaG1 GNLNFRSOGLVLAVAGTGR L TSDGALOLGGGDLNVRIGGEVNP SREARATQTYSSSGFD
PAO1 GNLNFRSOGLVLAVAGTGR L TSDGALOLGGGDLNVRIGGEVNP SREARATQTYSSSGFD

3370 3380 3390 3400 3410 3420
PaG28 .LTPFDQ GSSLYGAMVNLRGNAQVRATS LGGIDL IYGR L DSDQVPGERRAYDF FVSTLGL
PaG30 .LTPFDQ GSSLYGAMVNLRGNAQVRATS LGGIDL IYGR L DSDQVPGERRAYDF FVSTLGL
PA14 .LTPFDQ GSSLYGAMVNLRGNAQVRATS LGGIDL IYGR L DSDQVPGERRAYDF FVSTLGL
PaG2 .LTPFDQ GSSLYGAMVNLRGNAQVRATS LGGIDL IYGR L DSDQVPGERRAYDF FVSTLGL
PaG19 .LTPFDQ GSSLYGAMVNLRGNAQVRATS LGGIDL IYGR L DSDQVPGERRAYDF FVSTLGL
PaG5 .LTPFDQ GSSLYGAMVNLRGNAQVRATS LGGIDL IYGR L DSDQVPGERRAYDF FVSTLGL
PA7 .LTPFDQ GSSLYGAMVNLRGNAQVRATS LGGIDL IYGR L DSDQVPGERRAYDF FVSTLGL
PaG7 GLYSGGTIHDLQ GALINLRGSASLYSGALGGIDPRYDTLLR..DPAEVRSRDAFSP TLAS
PaG33 GLYSGGTIHDLQ GALINLRGSASLYSGALGGIDPRYDTLLR..DPAEVRSRDAFSP TLAS
PaG6 GLYSGGTIHDLQ GALINLRGSASLYSGALGGIDPRYDTLLR..DPAEVRSRDAFSP TLAS
PaG1 GLYSGGTIHDLQ GALINLRGSASLYSGALGGIDPRYDTLLR..DPAEVRSRDAFSP TLAS
PAO1 GLYSGGTIHDLQ GALINLRGSASLYSGALGGIDPRYDTLLR..DPAEVRSRDAFSP TLAS

3430 3440 3450 3460 3470
PaG28 ANGGP TLVPGDATFS LNSLGDVLVQGVDPGRTP LMN..GTPYTSASGVEGYGLSGFSLW
PaG30 ANGGP TLVPGDATFS LNSLGDVLVQGVDPGRTP LMN..GTPYTSASGVEGYGLSGFSLW
PA14 ANGGP TLVPGDATFS LNSLGDVLVQGVDPGRTP LMN..GTPYTSASGVEGYGLSGFSLW
PaG2 ANGGP TLVPGDATFS LNSLGDVLVQGVDPGRTP LMN..GTPYTSASGVEGYGLSGFSLW
PaG19 ANGGP TLVPGDATFS LNSLGDVLVQGVDPGRTP LMN..GTPYTSASGVEGYGLSGFSLW
PaG5 ANGGP TLVPGDATFS LNSLGDVLVQGVDPGRTP LMN..GTPYTSASGVEGYGLSGFSLW
PA7 ANGGP TLVPGDATFS LNSLGDVLVQGVDPGRTP LMN..GTPYTSASGVEGYGLSGFSLW
PaG7 STGGL TLVAGDTGMRL ETRGDVLVGVTDPPGRVGVNTPV GFTAPDGSVYQGGGI IAWFSLW
PaG33 STGGL TLVAGDTGMRL ETRGDVLVGVTDPPGRVGVNTPV GFTAPDGSVYQGGGI IAWFSLW
PaG6 STGGL TLVAGDTGMRL ETRGDVLVGVTDPPGRVGVNTPV GFTAPDGSVYQGGGI IAWFSLW
PaG1 STGGL TLVAGDTGMRL ETRGDVLVGVTDPPGRVGVNTPV GFTAPDGSVYQGGGI IAWFSLW
PAO1 STGGL TLVAGDTGMRL ETRGDVLVGVTDPPGRVGVNTPV GFTAPDGSVYQGGGI IAWFSLW

3480 3490 3500 3510 3520
PaG28 TERT AIDLTSAGGNLTP...VSQGRTEOD TDSALVYPAKLSAVALTGSLSLYG
PaG30 TERT AIDLTSAGGNLTP...VSQGRTEOD TDSALVYPAKLSAVALTGSLSLYG
PA14 TERT AIDLTSAGGNLTP...VSQGRTEOD TDSALVYPAKLSAVALTGSLSLYG
PaG2 TERT AIDLTSAGGNLTP...VSRGRTEOD TDSALVYPAKLSAVALTGSLSLYG
PaG19 TERT AIDLTSAGGNLTP...VSRGRTEOD TDSALVYPAKLSAVALTGSLSLYG
PaG5 SERT AIDLTSAGGNLTP...VSLGRPEOV TDSALVYPAKLSAVALTGSLSLYG
PA7 SERT AIDLTSAGGNLTP...VSLGRPEOV TDSALVYPAKLSAVALTGSLSLYG
PaG7 TARTSIDLFAAGGNLTPSTQLVEATNAIPMAGRNLSP SDGRFIYPSIVRAAPEGSIYLG
PaG33 TARTSIDLFAAGGNLTPSTQLVEATNAIPMAGRNLSP SDGRFIYPSIVRAAPEGSIYLG
PaG6 TARTSIDLFAAGGNLTPSTQLVEATNAIPMAGRNLSP SDGRFIYPSIVRAAPEGSIYLG
PaG1 TARTSIDLFAAGGNLTPSTQLVEATNAIPMAGRNLSP SDGRFIYPSIVRAAPEGSIYLG
PAO1 TARTSIDLFAAGGNLTPSTQLVEATNAIPMAGRNLSP SDGRFIYPSIVRAAPEGSIYLG

3530 3540 3550 3560 3570 3580
PaG28 NATLRE...NARSDRTALV LAPS S OGR L D LLAGDSIYAGGYS I SRSGASTG SLATP LN
PaG30 NATLRE...NARSDRTALV LAPS S OGR L D LLAGDSIYAGGYS I SRSGASTG SLATP LN
PA14 NATLRE...NARSDRTALV LAPS S OGR L D LLAGDSIYAGGYS I SRSGASTG SLATP LN
PaG2 NATLRS...NARSDRTALV LAPS S OGR L D LLAGDSIYAGGYS I SRSGASTG SLATP LN
PaG19 NATLPE...NARSDRTALV LAPS S OGR L D LLAGDSIYAGGYS I SRSGASTG SLATP LN
PaG5 NATRRD...NTRSDMTALV LAPS S OGR L D LLAGDSIYAGGYS I SRSGASTG SLATP LN
PA7 NATRRD...NTRSDMTALV LAPS S OGR L D LLAGDSIYAGGYS I SRSGASTG SLATP LN
PaG7 PSSGYMGGVSLNVSTTPYSL L LAPS L NGE L E LLAGDSIYAGGYS VQRSGADPANLP SIWT
PaG33 PSSGYMGGVSLNVSTTPYSL L LAPS L NGE L E LLAGDSIYAGGYS VQRSGADPANLP SIWT
PaG6 PSSGYMGGVSLNVSTTPYSL L LAPS L NGE L E LLAGDSIYAGGYS VQRSGADPANLP SIWT
PaG1 PSSGYMGGVSLNVSTTPYSL L LAPS L NGE L E LLAGDSIYAGGYS VQRSGADPANLP SIWT
PAO1 PSSGYMGGVSLNVSTTPYSL L LAPS L NGE L E LLAGDSIYAGGYS VQRSGADPANLP SIWT

3590 3600 3610 3620 3630
PaG28 PSYQGYTGITRQ...VDNLS S DGS R ADTNHF PLFAFG ANSVSGEWGAA LEP SRFYALAGD
PaG30 PSYQGYTGITRQ...VDNLS S DGS R ADTNHF PLFAFG ANSVSGEWGAA LEP SRFYALAGD
PA14 PSYQGYTGITRQ...VDNLS S DGS R ADTNHF PLFAFG ANSVSGEWGAA LEP SRFYALAGD
PaG2 PSYQGYTGITRQ...VDNLS S DGS R ANQERF PLFAFG ANSVSGEWGAA LEP SRFYALAGD
PaG19 PSYQGYTGITRQ...VDNLS S DGS R ADTNHF PLFAFG ANSVSGEWGAA LEP SRFYALAGD
PaG5 PSYQGYTGGARQ...ADNLS S DGS R ASFELF PLFAFG ANSVSGEWGAA QEP SRFHALS GD
PA7 PSYQGYTGGARQ...ADNLS S DGS R ASFELF PLFAFG ANSVSGEWGAA QEP SRFHALS GD
PaG7 PAFAGYS DAALLNPIAGN G S F DGNP AVIGGL PLFYFGP .DSAASLARD LOPARFYALTGD
PaG33 PAFAGYS DAALLNPIAGN G S F DGNP AVIGGL PLFYFGP .DSAASLARD LOPARFYALTGD
PaG6 PAFAGYS DAALLNPIAGN G S F DGNP AVIGGL PLFYFGP .DSAASLARD LOPARFYALTGD
PaG1 PAFAGYS DAALLNPIAGN G S F DGNP AVIGGL PLFYFGP .DSAASLARD LOPARFYALTGD
PAO1 PAFAGYS DAALLNPIAGN G S F DGNP AVIGGL PLFYFGP .DSAASLARD LOPARFYALTGD

3640 3650 3660 3670 3680 3690
PaG28 LVGV D SGRLLR Y TGTSDVRF GQLRYEGH GAVRMIAGRDIVS SGTGLG SER T ASDNMGVYA
PaG30 LVGV D SGRLLR Y TGTSDVRF GQLRYEGH GAVRMIAGRDIVS SGTGLG SER T ASDNMGVYA
PA14 LVGV D SGRLLR Y TGTSDVRF GQLRYEGH GAVRMIAGRDIVS SGTGLG SER T ASDNMGVYA
PaG2 LVGV D SGRLLR Y TGTSDVRF GQLRYEGH GAVRMIAGRDIVS SGTGLG SER T ASDNMGVYA
PaG19 LVGV D SGRLLR Y TGTSDVRF GQLRYEGH GAVRMIAGRDIVS SGTGLG SER T ASDNMGVYA
PaG5 LVGV D SGRLLR Y TDPGDARF GQLRYEGH GAVRMIAGRDIVS SGTGLG IERRFAS T LENYA
PA7 LVGV D SGRLLR Y TDPGDARF GQLRYEGH GAVRMIAGRDIVS SGTGLG IERRFAS T LENYA
PaG7 IVGLN SGAQIRFGE QAGNRAGOTWYEGAGP VWMRAGRDIVASGTBLGQRI S APS QI STDA
PaG33 IVGLN SGAQIRFGE QAGNRAGOTWYEGAGP VWMRAGRDIVASGTBLGQRI S APS QI STDA
PaG6 IVGLN SGAQIRFGE QAGNRAGOTWYEGAGP VWMRAGRDIVASGTBLGQRI S APS QI STDA
PaG1 IVGLN SGAQIRFGE QAGNRAGOTWYEGAGP VWMRAGRDIVASGTBLGQRI S APS QI STDA
PAO1 IVGLN SGAQIRFGE QAGNRAGOTWYEGAGP VWMRAGRDIVASGTBLGQRI S APS QI STDA

3700 3710 3720 3730 3740 3750
PaG28 SSG NLFVNTS AT DVSLVQAGRDILYGNFNVAGPGS LEISAGRNI LMNDE VAV TSLGAVV
PaG30 SSG NLFVNTS AT DVSLVQAGRDILYGNFNVAGPGS LEISAGRNI LMNDE VAV TSLGAVV
PA14 SSG NLFVNTS AT DVSLVQAGRDILYGNFNVAGPGS LEISAGRNI LMNDE VAV TSLGAVV
PaG2 SSG NLFVNTS AT DVSLVQAGRDILYGNFNVAGPGS LEISAGRNI LMNDE VAV TSLGAVV
PaG19 SSG NLFVNTS AT DVSLVQAGRDILYGNFNVAGPGS LEISAGRNI LMNDE VAV TSLGAVV
PaG5 SSG NLFVNTL AS DVSLVQAGRDILYGNFNVAGPGS LEISAGRNI LMNDE VAV TSLGAVV
PA7 SSG NLFVNTL AS DVSLVQAGRDILYGNFNVAGPGS LEISAGRNI LMNDE VAV TSLGAVV
PaG7 SFTGNLFVHDDP NDLSLVQAGRDILYGNFNVAGPGT LEISAGRNI LMNDE RAAI TSLGAVV
PaG33 SFTGNLFVHDDP NDLSLVQAGRDILYGNFNVAGPGT LEISAGRNI LMNDE RAAI TSLGAVV
PaG6 SFTGNLFVHDDP NDLSLVQAGRDILYGNFNVAGPGT LEISAGRNI LMNDE RAAI TSLGAVV
PaG1 SFTGNLFVHDDP NDLSLVQAGRDILYGNFNVAGPGT LEISAGRNI LMNDE RAAI TSLGAVV
PAO1 SFTGNLFVHDDP NDLSLVQAGRDILYGNFNVAGPGT LEISAGRNI LMNDE RAAI TSLGAVV

3760 3770 3780 3790 3800 3810
PaG28 AGDTRS GASIVLQAGASQADYS GFLRRYLELDNLAQAGTPLAEOPGKVVRIYENELIEWL
PaG30 AGDTRS GASIVLQAGASQADYS GFLRRYLELDNLAQAGTPLAEOPGKVVRIYENELIEWL
PA14 AGDTRS GASIVLQAGASQADYS GFLRRYLELDNLAQAGTPLAEOPGKVVRIYENELIEWL
PaG2 AGDTRS GASIVLQAGASQADYS GFLRRYLELDNLAQAGTPLAEOPGKVVRIYENELIEWL
PaG19 AGDTRS GASIVLQAGASQADYS GFLRRYLELDNLAQAGTPLAEOPGKVVRIYENELIEWL
PaG5 PGDARS GASIVLQAGASQADYS GFLRRYLELDNLAQAGTPLAEOPGKVVRIYENELIEWL
PA7 PGDARS GASIVLQAGASQADYS GFLRRYLELDNLAQAGTPLAEOPGKVVRIYENELIEWL
PaG7 PGDSRP GADIVLQAGAAGADYQAFLE RYLD PANLAQAGTPLAEOPGKVVRIYSELAKWL
PaG33 PGDSRP GADIVLQAGAAGADYQAFLE RYLD PANLAQAGTPLAEOPGKVVRIYSELAKWL
PaG6 PGDSRP GADIVLQAGAAGADYQAFLE RYLD PANLAQAGTPLAEOPGKVVRIYSELAKWL
PaG1 PGDSRP GADIVLQAGAAGADYQAFLE RYLD PANLAQAGTPLAEOPGKVVRIYSELAKWL
PAO1 PGDSRP GADIVLQAGAAGADYQAFLE RYLD PANLAQAGTPLAEOPGKVVRIYSELAKWL

3820 3830 3840 3850 3860 3870
PaG28 SGRVGFSGDAQQAREFLAGLSAEQORIFAREVYFAELKAGGREYNEVGGVROGSYLRGRN
PaG30 SGRVGFSGDAQQAREFLAGLSAEQORIFAREVYFAELKAGGREYNEVGGVROGSYLRGRN
PA14 SGRVGFSGDAQQAREFLAGLSAEQORIFAREVYFAELKAGGREYNEVGGVROGSYLRGRN
PaG2 SGRVGFSGDAQQAREFLAGLSAEQORIFAREVYFAELKAGGREYNEVGGVROGSYLRGRN
PaG19 SGRVGFSGDAQQAREFLAGLSAEQORIFAREVYFAELKAGGREYNEVGGVROGSYLRGRN
PaG5 AGRVGFSGDVLQARDFLAGLPAEQORIFARELYFAELKAGGREYNEAGGVROGSYLRGRN
PA7 AGRVGFSGDVLQARDFLAGLPAEQORIFARELYFAELKAGGREYNEAGGVROGSYLRGRN
PaG7 NEREGFAGDAEQAQAFAGLPAEQORIFAREVYFAELRAGGREYNEVGGVROGSYLRGRN
PaG33 NEREGFAGDAEQAQAFAGLPAEQORIFAREVYFAELRAGGREYNEVGGVROGSYLRGRN
PaG6 NEREGFAGDAEQAQAFAGLPAEQORIFAREVYFAELRAGGREYNEVGGVROGSYLRGRN
PaG1 NEREGFAGDAEQAQAFAGLPAEQORIFAREVYFAELRAGGREYNEVGGVROGSYLRGRN
PAO1 NEREGFAGDAEQAQAFAGLPAEQORIFAREVYFAELRAGGREYNEVGGVROGSYLRGRN

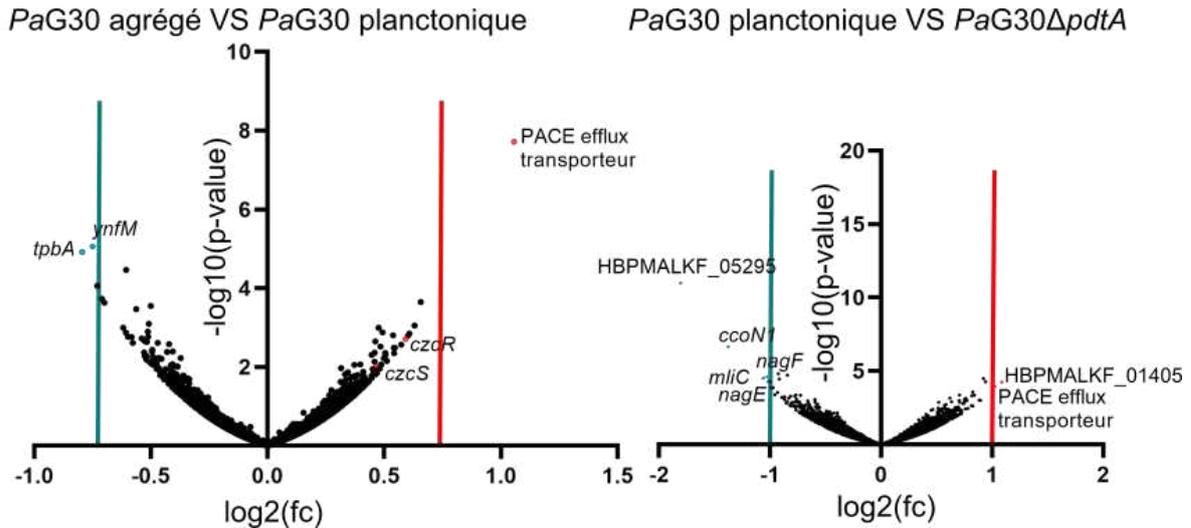
3880 3890 3900 3910 3920 3930
PaG28 AIAALFPERDPAGNPISYEGDIVMYGGAGVHTNFGGDIQLLTPGGQOVFGIEGEAPPSA
PaG30 AIAALFPERDPAGNPISYEGDIVMYGGAGVHTNFGGDIQLLTPGGQOVFGIEGEAPPSA
PA14 AIAALFPERDPAGNPISYEGDIVMYGGAGVHTNFGGDIQLLTPGGQOVFGIEGEAPPSA
PaG2 AIAALFPERDPAGNPISYEGDIVMYGGAGVHTNFGGDIQLLTPGGQOVFGIEGEAPPSA
PaG19 AIAALFPERDPAGNPISYEGDIVMYGGAGVHTNFGGDIQLLTPGGQOVFGIEGEAPPSA
PaG5 AIAALFPERDPAGNPISYEGDIVMYGGAGVHTNFGGDIQLLTPGGQOVFGIEGEAPPSA
PA7 AIAALFPERDPAGNPISYEGDIVMYGGAGVHTNFGGDIQLLTPGGQOVFGIEGEAPPSA
PaG7 AIAALFPERDPAGNPISYEGDIVMYGGAGVHTNFGGDIQLLTPGGQOVFGIEGEAPPSA
PaG33 AIAALFPERDPAGNPISYEGDIVMYGGAGVHTNFGGDIQLLTPGGQOVFGIEGEAPPSA
PaG6 AIAALFPERDPAGNPISYEGDIVMYGGAGVHTNFGGDIQLLTPGGQOVFGIEGEAPPSA
PaG1 AIAALFPERDPAGNPISYEGDIVMYGGAGVHTNFGGDIQLLTPGGQOVFGIEGEAPPSA
PAO1 AIAALFPERDPAGNPISYEGDIVMYGGAGVHTNFGGDIQLLTPGGQOVFGIEGEAPPSA

3940 3950 3960 3970 3980 3990
PaG28 GVVTOGVGNIRSYALS SILLGQSRVMTTFGGDIQIWSAEGDINAGRGSKTTVVYTPPRLI
PaG30 GVVTOGVGNIRSYALS SILLGQSRVMTTFGGDIQIWSAEGDINAGRGSKTTVVYTPPRLI
PA14 GVVTOGVGNIRSYALG SILLGQSRVMTTFGGDIQIWSAEGDINAGRGSKTTVVYTPPRLI
PaG2 GVVTOGVGNIRSYALS SILLGQSRVMTTFGGDIQIWSAEGDINAGRGSKTTVVYTPPRLI
PaG19 GVVTOGVGNIRSYALS SILLGQSRVMTTFGGDIQIWSAEGDINAGRGSKTTVVYTPPRLI
PaG5 GVVTOGVGNIRSYAQS SILLGQSRVMTTFGGDIQIWSAEGDINAGRGSKTTVVYTPPRLI
PA7 GVVTOGMGNIRSYAQS SILLGQSRVMTTFGGDIQIWSAEGDINAGRGSKTTVVYTPPRLI
PaG7 GIVTQGGDIQAYSRD SILLGQSRIMTTFGGSI LWSAEGDINAGRGSKTTVVYTPPRLI
PaG33 GIVTQGGDIQAYSRD SILLGQSRIMTTFGGSI LWSAEGDINAGRGSKTTVVYTPPRLI
PaG6 GIVTQGGDIQAYSRD SILLGQSRIMTTFGGSI LWSAEGDINAGRGSKTTVVYTPPRLI
PaG1 GIVTQGGDIQAYSRD SILLGQSRIMTTFGGSI LWSAEGDINAGRGSKTTVVYTPPRLI
PAO1 GIVTQGGDIQAYSRD SILLGQSRIMTTFGGSI LWSAEGDINAGRGSKTTVVYTPPRLI

4000 4010 4020 4030 4040 4050
PaG28 YDAWGNVSLSPQVPSTGAGIATLNPIPEVAPGDIDLIAPLGTIDAGEAGIRVSGNVNVAA
PaG30 YDAWGNVSLSPQVPSTGAGIATLNPIPEVAPGDIDLIAPLGTIDAGEAGIRVSGNVNVAA
PA14 YDAWGNVSLSPQVPSTGAGIATLNPIPEVAPGDIDLIAPLGTIDAGEAGIRVSGNVNVAA
PaG2 YDAWGNVSLSPQVPSTGAGIATLNPIPEVAPGDIDLIAPLGTIDAGEAGIRVSGNVNVAA
PaG19 YDAWGNVSLSPQVPSTGAGIATLNPIPEVAPGDIDLIAPLGTIDAGEAGIRVSGNVNVAA
PaG5 YDAWGNVSLSPQVPSTGAGIATLNPIPEVAPGDIDLIAPLGTIDAGEAGIRVSGNVNVAA
PA7 YDAWGNVSLSPQVPSTGAGIATLNPIPEVAPGDIDLIAPLGTIDAGEAGIRVSGNVNVAA
PaG7 YDAWGNVSLSPQVPSTGAGIATLNPIPEVAPGDIDLIAPLGTIDAGEAGIRVSGNVNVAA
PaG33 YDAWGNVSLSPQVPSTGAGIATLNPIPEVAPGDIDLIAPLGTIDAGEAGIRVSGNVNVAA
PaG6 YDAWGNVSLSPQVPSTGAGIATLNPIPEVAPGDIDLIAPLGTIDAGEAGIRVSGNVNVAA
PaG1 YDAWGNVSLSPQVPSTGAGIATLNPIPEVAPGDIDLIAPLGTIDAGEAGIRVSGNVNVAA
PAO1 YDAWGNVSLSPQVPSTGAGIATLNPIPEVAPGDIDLIAPLGTIDAGEAGIRVSGNVNVAA

4060 4070 4080 4090 4100 4110
PaG28 LOVVNAANIQTQGOSSGIPVVASVNTGALTSASAAASSATQAAEDVSRQQQAARQRMPS
PaG30 LOVVNAANIQTQGOSSGIPVVASVNTGALTSASAAASSATQAAEDVSRQQQAARQRMPS
PA14 LOVVNAANIQTQGOSSGIPVVASVNTGALTSASAAASSATQAAEDVSRQQQAARQRMPS
PaG2 LOVVNAANIQTQGOSSGIPVVASVNTGALTSASAAASSATQAAEDVSRQQQAARQRMPS
PaG19 LOVVNAANIQTQGOSSGIPVVASVNTGALTSASAAASSATQAAEDVSRQQQAARQRMPS
PaG5 LOVVNAANIQTQGOSSGIPVVASVNTGALTSASAAASSATQAAEDVSRQQQAARQRMPS
PA7 LOVVNAANIQTQGOSSGIPVVASVNTGALTSASAAASSATQAAEDVSRQQQAARQRMPS
PaG7 LOVVNAANIQTQGOSSGIPVVASVNTGALTSASAAASSATQAAEDVSRQQQAARQRMPS
PaG33 LOVVNAANIQTQGOSSGIPVVASVNTGALTSASAAASSATQAAEDVSRQQQAARQRMPS
PaG6 LOVVNAANIQTQGOSSGIPVVASVNTGALTSASAAASSATQAAEDVSRQQQAARQRMPS
PaG1 LOVVNAANIQTQGOSSGIPVVASVNTGALTSASAAASSATQAAEDVSRQQQAARQRMPS
PAO1 LOVVNAANIQTQGOSSGIPVVASVNTGALTSASAAASSATQAAEDVSRQQQAARQRMPS

	4120	4130	4140	4150	4160	4170
PaG28	VITVQVLGFGNERLEPSRDGASRSPGYN	PDSAVQVLGAGALGEQARS	QLTDEERGNL	L		
PaG30	VITVQVLGFGNERLEPSRDGASRSPGYN	PDSAVQVLGAGALGEQARS	QLTDEERGNL	L		
PA14	VITVQVLGFGNERLEPSRDGASRSPGYN	PDSAVQVLGAGALGEQARS	QLTDEERGNL	L		
PaG2	VITVQVLGFGNERLEPSRDGASRSPGYN	PDSAVQVLGAGALGEQARS	QLTDEERGNL	L		
PaG19	VITVQVLGFGNERLEPSRDGASRSPGYN	PDSAVQVLGAGALGEQARS	QLTDEERGNL	L		
PaG5	VITVQVLGFGNERLEPSRDGASRAPGYD	PDSAVQVLGAGALGEQARR	QLTDEERGNL	L		
PA7	VITVQVLGFGNERLEPSRDGASRAPGYD	PDSAVQVLGAGALGEQARR	QLTDEERGNL	L		
PaG7	VITVQVLGFGNERLEPSRDGASRSPGYN	PDSAVQVLGAGALGEQARS	QLTDEERGNL	L		
PaG33	VITVQVLGFGNERLEPSRDGASRSPGYN	PDSAVQVLGAGALGEQARS	QLTDEERGNL	L		
PaG6	VITVQVLGFGNERLEPSRDGASRSPGYN	PDSAVQVLGAGALGEQARS	QLTDEERGNL	L		
PaG1	VITVQVLGFGNERLEPSRDGASRSPGYN	PDSAVQVLGAGALGEQARS	QLTDEERGNL	L		
PA01	VITVQVLGFGNERLEPSRDGASRSPGYN	PDSAVQVLGAGALGEQARS	QLTDEERGNL	L		



Annexe 8: RNAseq de *PaG30* agrégées VS *PaG30* planctoniques et *PaG30* planctoniques VS *PaG30ΔpdtA*.

Les volcanos plots ont été construits dans GraphPad à partir des données obtenues. Les gènes exprimés différemment de manière significative et avec un fold change d'au moins 2 sont indiqués, en rouge pour les gènes surexprimés et en bleu pour les gènes sous-exprimés. Pour la comparaison de la souche sauvage agrégée vs planctonique, le seuil est plus bas et correspond à un fold change d'au moins 1,68 ($\log_2 > 0,75$).

ID <i>PaG30</i>	ID PAO1	$\log_2(\text{Fc})$	P-value	Nom
HBPMAKLF_02552		1.06	1.92e-08	PACE efflux transporteur
HBPMAKLF_03168	PA2523	0,59	0,002	<i>czcR</i>
HBPMAKLF_01351	PA5030	-0,75	8.74e-06	<i>ynfM</i>
HBPMAKLF_04440	PA3885	-0,79	1.21e-05	<i>tpbA</i>

Gènes exprimés différemment entre les bactéries *PaG30* agrégées VS *PaG30* planctoniques.

ID <i>PaG30</i>	ID PAO1	$\log_2(\text{Fc})$	P-value	Nom
HBPMAKLF_03925	PA0690	5.02	8.34e-110	<i>pdtA</i>
HBPMAKLF_01405	PA5084	1.09	5.48e-05	
HBPMAKLF_02552		1.02	0,0001	PACE efflux transporteur
HBPMAKLF_04440	PA3885	0,69	0,003	<i>tpbA</i>
HBPMAKLF_05295	PA1855	-1.8	1.02e-11	
HBPMAKLF_05294	PA1856	-1.38	2.22e-07	CcoN1
HBPMAKLF_02843	PA3760	-1.03	2.48e-05	<i>nagF</i>
HBPMAKLF_03743	PA0867	-1.06	2.99e-05	<i>mliC</i>
HBPMAKLF_02844	PA3761	-1.02	5.12e-05	<i>nagE</i>

Gènes exprimés différemment entre les bactéries *PaG30* planctoniques VS *PaG30ΔpdtA*.

Résumé

Pseudomonas aeruginosa (*Pa*) est un pathogène opportuniste responsable de nombreuses infections aiguës et chroniques. La virulence de ce pathogène repose sur un arsenal de facteurs de virulence qui peuvent être sécrétés de différentes manières. En effet, *Pa* possède plusieurs systèmes de sécrétion, et ma thèse s'est focalisée sur les protéines sécrétées par le système de sécrétion à deux partenaires (TPS). Le premier projet porte sur l'étude de PdtA. Cette protéine appartient à la famille des adhésines de type High Molecular Weight (HMW), comme HMW1 et HMW2 de *Haemophilus influenzae*, connues pour leurs propriétés adhésives et immunogènes. Le gène *pdtA* est conservé parmi les différentes souches de *Pa* et des anticorps anti-PdtA ont été détectés chez des patients infectés par *Pa*. Cependant, son rôle exact et sa structure restent inconnus. Nous avons examiné la synthèse de la protéine PdtA à l'aide d'anticorps polyclonaux dans une cohorte de souches cliniques. Alors que les souches de référence de laboratoire (PAO1, PA7 et PA14) ne synthétisent pas la protéine, PdtA est détectée dans plusieurs souches cliniques, indépendamment de leur appartenance phylogénique. La localisation de PdtA sur la surface de bactéries a été confirmée par immunofluorescence. Nous avons aussi montré que PdtA joue un rôle dans l'auto-agrégation bactérienne en comparant une souche clinique et les souches mutantes isogéniques $\Delta pdtB$ et $\Delta pdtA$. Nous avons montré que plusieurs sérums de patients atteints de mucoviscidose ayant contracté une infection à *Pa* contenaient des anticorps anti-PdtA, en utilisant un ELISA. Un deuxième projet consistait à évaluer la relation entre la structure et la fonction de différentes protéines homologues d'ExlA chez d'autres espèces de *Pseudomonas*. En effet, il existe des protéines homologues à la toxine ExlA chez *Pseudomonas entomophila*, *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas chlororaphis*. Nous avons montré que les différentes protéines ExlA-like diffèrent par leur fonction de cytolysse, leur liaison aux membranes et leur capacité à cliver la E-cadhérine. Ces différences sont liées aux différences de leur partie C-terminale. Cependant, nous avons montré que l'association de la partie N-terminale avec la partie C-terminale est essentielle à la fonction de la protéine en examinant la fonctionnalité de protéines hybrides. Dans l'ensemble, ce travail a permis de mieux comprendre le fonctionnement de deux facteurs de virulence de *Pa* et ouvre la voie pour poursuivre les recherches sur une potentielle cible thérapeutique.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa (*Pa*) is an opportunistic pathogen responsible for numerous acute and chronic infections. The virulence of this pathogen relies on an arsenal of virulence factors that can be secreted by different pathways. Indeed, *Pa* has several secretion systems, and my thesis focused on proteins secreted by the two-partner secretion system (TPS). A first project focuses on the study of PdtA. This protein belongs to the family of High Molecular Weight-like adhesins, like HMW1 and HMW2 from *Haemophilus influenzae*, known for their adhesive and immunogenic properties. The *pdtA* gene is conserved among different strains of *Pa*, and anti-PdtA antibodies have been detected in *Pa*-infected patients. However, its exact role and structure remain unknown. We examined PdtA synthesis using polyclonal antibodies in a cohort of clinical strains. While laboratory reference strains (PAO1, PA7 and PA14) do not synthesize the protein, PdtA is detected in several clinical strains, irrespective of their phylogenetic affiliation. The localization of PdtA on the bacterial surface was confirmed by immunofluorescence. We also showed that PdtA plays a role in bacterial self-aggregation by comparing a clinical strain and the isogenic mutant strains $\Delta pdtB$ and $\Delta pdtA$. Using ELISA, we showed that several sera from cystic fibrosis patients infected by *Pa* contained anti-PdtA antibodies. A second project was to evaluate the relationship between structure and function of different ExlA homologous proteins in other *Pseudomonas* species. Proteins homologous to ExlA toxin exist in *Pseudomonas entomophila*, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas chlororaphis*. We have shown that the different ExlA-like proteins differ in their cytolytic function, membrane binding and ability to cleave E-cadherin. These differences are linked to differences in their C-terminus. However, we have shown that the association of the N-terminal part with the C-terminal part is essential for protein function by examining the functionality of hybrid proteins. Overall, this work has provided a better understanding of the function of two *Pa* virulence factors and opens the way for further research into a potential therapeutic target.