



Université Claude Bernard



DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **22 septembre 2021**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Madame ROUSSIN Morgane**

Titre de la thèse : *Décoder les mécanismes de toxicité et de sécrétion de la protéine TIR PumA de Pseudomonas aeruginosa*

Résumé



L'immunité est un mécanisme de défense présent dans tous les organismes vivants pour lutter contre les corps étrangers envahissants. Chez les vertébrés, le système immunitaire est la première ligne de défense de l'hôte permettant de détecter les envahisseurs ou les signaux de danger endogènes déclenchant ainsi une réponse immunitaire adaptée.

Le domaine TIR (*Toll/interleukin-1 Receptor*), présent au sein de tous les TLRs (*Toll-like Receptors*) et les adaptateurs associés tels que MyD88 and TIRAP, est un composant clé du système immunitaire inné. La détection d'un pathogène déclenche l'interactions entre les domaines TIR de ces protéines permettant la signalisation par les TLRs et enfin l'activation de la réponse inflammatoire.

Ces dernières années, de nombreux travaux ont révélé le rôle d'une famille d'effecteurs bactériens contenant un domaine TIR capables de détourner ces signaux précoces de l'immunité. Chez les pathogènes responsables de zoonose tel que *Brucella abortus*, les protéines TIR BtpA et BtpB participent à la virulence de cette bactérie. Dans le contexte des pathogènes nosocomiaux, une récente étude menée dans le laboratoire a montré que l'effecteur TIR PumA est un facteur de virulence clé de la souche *Pseudomonas aeruginosa* PA7 chez la souris et le nématode. PumA interagit avec les protéines adaptatrices MyD88 et TIRAP, et module l'activation de la réponse immunitaire en contrôlant notamment la translocation du facteur de transcription NF- κ B. PumA est aussi capable de cibler UBAP1 (à l'origine du nom « PumA » pour « *Pseudomonas* UBAP1 modulator A), un composant du complexe ESCRT-1 impliqué dans le transport vésiculaire et l'activation des récepteurs de cytokines.

De plus, de récents travaux ont montré que le domaine TIR possède une activité enzymatique NADase, c'est-à-dire la capacité à dégrader le NAD⁺ de l'hôte, un métabolite central dans beaucoup de processus cellulaires.

Cependant, bien que les mécanismes impliqués dans le détournement de la réponse immunitaire aient été largement étudiés, le rôle des effecteurs contenant un domaine TIR dans la modulation du métabolisme de l'hôte ainsi que leur mécanisme de sécrétion restent encore très peu étudiés. C'est dans cette optique que s'inscrit mon projet de thèse. En effet, ce dernier a pour objectif de caractériser les mécanismes de toxicité et de sécrétion de l'effecteur PumA chez *P. aeruginosa* PA7, une souche atypique et multi-résistante aux antibiotiques. J'ai également participé à un autre projet visant à approfondir le rôle des deux effecteurs TIR BtpA and BtpB dans la pathogénie de *Brucella abortus*.

Ce manuscrit s'articule autour de trois grands axes. Tout d'abord j'introduirai les concepts clé qui s'inscrivent dans le projet, puis je présenterai l'ensemble des résultats obtenus au cours de la thèse accompagnés d'une discussion et de perspectives de recherche.

Pour commencer la lecture de ce manuscrit, je propose tout d'abord une introduction divisée en quatre chapitres correspondant aux concepts clé s'inscrivant dans mon projet de thèse.

Le premier chapitre porte sur *P. aeruginosa*. Nous décrivons tout d'abord la bactérie dans un contexte épidémiologique, puis les facteurs de virulence clé qui contribuent à son fort pouvoir pathogène, et enfin nous décrivons les particularités de la souche PA7.

Pour se défendre contre ce pathogène, le système immunitaire joue un rôle primordial et fera donc l'objet du second chapitre. Il est consacré plus particulièrement à la voie de signalisation TLR et à la description du domaine TIR. Le chapitre III décrit toutes les voies et processus procaryotes et eucaryotes connus dans lequel le NAD joue un rôle central. Ce chapitre se conclue par une mise en lumière du rôle du NAD dans les relations hôtes-pathogènes où seront notamment décrits les effecteurs bactériens capables de moduler le niveau de NAD⁺ cellulaire, ce qui a fait l'objet d'une revue actuellement en révision. Le quatrième et dernier chapitre de l'introduction porte sur le système de sécrétion de type VI (SST6) capable d'injecter des effecteurs bactériens chez l'hôte eucaryote ou procaryote. Ce chapitre décrit ce système en termes de structure, de régulation, de fonctionnement, et de fonctions dans la pathogénie.

Résultats

Le chapitre I porte sur les résultats principaux de ma thèse concernant la caractérisation des mécanismes de toxicité et de sécrétion de PumA qui font l'objet d'un article en cours de rédaction dans lequel je serai première auteure.

Trois loci différents codant le SST6 sont présents dans le génome de *P. aeruginosa* : SST6-H1, -H2, et -H3. Alors que le SST6-H1 est connu pour cibler uniquement les bactéries, le SST6-H2 est également capable de cibler les cellules eucaryotes.

Nous avons découvert que le SST6-H2 est impliqué dans la translocation de PumA dans les cellules infectées, ce qui entraîne l'inhibition de la réponse immunitaire mais aussi la réduction de la concentration cellulaire en NAD⁺. De manière surprenante, nous avons également découvert que PumA est impliqué dans la compétition bactérienne, injectée dans des bactéries voisines comme *Escherichia coli* et *Acinetobacter baumannii* via un SST6 différent, le SST6-H1. Cette toxicité induite par PumA est due à l'activité consommatrice de NAD⁺ (NADase) de son domaine TIR. Nous avons réussi à imager la translocation de PumA dans les bactéries cibles et nous avons découvert que PumA localise avec le SST6 de la bactérie attaquée.

De plus, nous avons imagé la localisation cellulaire de PumA après son injection dans des cellules hôtes eucaryotes et procaryotes pendant l'infection. Nous avons montré qu'en début d'infection PumA localise au niveau de la membrane plasmique, puis se retrouve dans des compartiments intracellulaires contenant MyD88.

En résumé, nos résultats identifient PumA comme un nouvel effecteur trans-règne du SST6 présentant une activité NADase une fois injecté dans des cellules eucaryotes et procaryotes. À notre connaissance, il s'agit de la première description d'un effecteur bactérien utilisant un SST6 sélectif en fonction de la cellule cible.

Durant ma thèse, j'ai également participé à la caractérisation de BtpA et BtpB dans la modulation du métabolisme énergétique de l'hôte, résultats qui ont fait l'objet d'un article dans lequel je suis auteure. Nous avons découvert que l'expression de BtpA et

BtpB réduit la concentration cellulaire en NAD⁺ des cellules épithéliales infectées par *B. abortus* et que cette activité enzymatique est portée par le domaine TIR des deux effecteurs. De plus, ces derniers sont capables de réduire la concentration intracellulaire d'ATP dans la levure. Ces résultats seront présentés dans l'introduction de ce manuscrit, et ne feront donc pas l'objet d'un sous-chapitre résultats.

Le chapitre II fait part des résultats complémentaires qui n'apparaîtront pas dans l'article principal de thèse car ces derniers nécessitent de plus amples investigations.

Nous avons précédemment montré au laboratoire qu'une souche de *P. aeruginosa* non-TIR (PA14) exprimant de manière artificielle PumA était aussi capable d'inhiber la réponse immunitaire. Nous nous sommes donc intéressés à connaître le mécanisme de sécrétion utilisé par PA14 pour délivrer PumA.

Nous avons découvert que PA14 exprimant PumA produit des vésicules extracellulaires contenant PumA, et que ces vésicules elles-mêmes sont capables, après contact avec les cellules épithéliales, de réduire la réponse immunitaire et la concentration en NAD⁺ à l'inverse des vésicules produites par la souche sauvage (n'exprimant pas PumA). C'est au cours de cette investigation que nous avons découvert que la souche PA7 ne produit pas de vésicules extracellulaires dans les mêmes conditions de cultures que la souche PA14.

Par la suite, nous avons souhaité déterminer si PumA pouvait aussi emprunter un ou plusieurs SST6 de la souche PA14. Nous avons montré que le H3-SST6 de cette souche semble impliqué dans l'injection de PumA en infection, mais aussi dans la cible bactérienne *E. coli*. Cependant, de futures investigations sont nécessaires pour comprendre de quelles manières les vésicules extracellulaires et le SST6 sont impliqués dans l'injection de PumA par une souche de *Pseudomonas* non-TIR.

Discussion

Une première partie de la discussion portera sur les résultats obtenus dans les chapitres I et II. Une deuxième partie sera dédiée à nos récentes découvertes sur la protéine PumA pouvant fournir des premiers éléments de réponse quant aux facteurs génétiques et protéiques impliqués dans les fonctions de l'effecteur.

Nous discuterons tout d'abord du domaine C-terminal de PumA qui compose environ la moitié de la protéine. En effet, un alignement par BLAST ne permet pas d'identifier de domaines connus déjà décrits dans la littérature. Nous avons cependant, à l'aide d'une méthode plus robuste, identifié le domaine NB-ARC, un domaine souvent retrouvé dans des protéines de résistance (*R proteins*) chez les plantes. Ce domaine est notamment responsable d'une activité ATPase et impliqué dans la mort cellulaire médiée par l'activité NADase des domaines TIR. D'autre part, nous discuterons des mécanismes génétiques et moléculaires impliqués dans la prise en charge de PumA par le SST6. PumA est un effecteur du SST6 particulier puisque le gène *pumA* ne possède aucune des protéines marqueurs habituellement présentes dans l'environnement génétique des effecteurs du SST6. Néanmoins, nous avons potentiellement identifiés dans le domaine C-terminal des motifs caractéristiques d'effecteurs du SST6. De plus, il est connu qu'en général un

gène codant une immunité est présent en aval du gène codant l'effecteur. Dès lors, nous avons tenté de découvrir la protéine d'immunité qui protège PA7 de l'activité toxique de PumA. Ces investigations nous ont également permis de montrer que PumA semble interagir avec des protéines du SST6-H1 *in vitro*, confirmant davantage l'implication du système dans la sécrétion de PumA. Bien que les protéines du SST6-H1 soient bien exprimées en condition classiques de croissance, il est plus difficile d'observer celles du SST6-H2 puisque ce dernier semble être fonctionnel uniquement en présence de l'hôte eucaryote. Cependant, aucune étude n'a encore mis en évidence les facteurs mis en jeu dans la reconnaissance par le SST6-H2 de la cible eucaryote. Par ailleurs, nous avons montré que la présence de fibronectine pouvait jouer un rôle dans l'activation du SST6-H2 de *P. aeruginosa* PA7 *in vivo*.

Pour conclure, nous avons identifié le premier effecteur de *P. aeruginosa* possédant un domaine TIR capable d'une activité NADase après injection dans les cellules cibles eucaryotes et procaryotes *via* un SST6 différent. De plus, PumA est un effecteur du T6SS particulier qui ne possède pas les marqueurs génétiques habituels et qui présente des ressemblances avec des protéines de l'immunité chez les plantes.