

Structure et assemblage d'un harpon moléculaire bactérien

Lucas Dupuis, Ambre Moreau, Donovan Robert, Laurent Aussel

▶ **To cite this version:**

Lucas Dupuis, Ambre Moreau, Donovan Robert, Laurent Aussel. Structure et assemblage d'un harpon moléculaire bactérien. Médecine/Sciences, 2020, 36 (4), pp.408-412. 10.1051/medsci/2020065 . hal-02896535

HAL Id: hal-02896535
https://amu.hal.science/hal-02896535

Submitted on 10 Nov 2020

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.

Structure et assemblage d'un harpon moléculaire bactérien

Le système de sécrétion de type VI

Lucas Dupuis[1*], Ambre Moreau[1*], Donovan Robert[1*], Laurent Aussel[2]

[1]Master 2 Microbiologie Intégrative et Fondamentale, Aix Marseille Université, Marseille, France.
[2]Aix Marseille Université, CNRS, LCB UMR, 7283, IMM, Marseille, France.
lucas.dupuis.1@etu.univ-amu.fr
ambre.moreau.1@etu.univ-amu.fr
donovan.robert@etu.univ-amu.fr
aussel@imm.cnrs.fr

> Les bactéries vivent dans des communautés constituées de différentes espèces au sein desquelles elles entretiennent des relations d'entraide ou de compétition [1]. Sauf dans le cas de changements environnementaux brusques, ces communautés sont stables. Par exemple, la composition du microbiote intestinal (les bactéries colonisant l'intestin) subit peu de changements au cours de la vie d'un individu [2]. Cependant, lors d'infections bactériennes ou de la prise d'antibiotiques, ce microbiote peut être déséquilibré, entraînant des dysfonctionnements : on parle alors de dysbiose [3].

Les relations d'échange ou de compétition entre microorganismes reposent en partie sur la production et la sécrétion de petites molécules ou de protéines effectrices dans le milieu ou dans des cellules cibles. Les bactéries ont en effet acquis au cours de l'évolution tout un arsenal de mécanismes permettant ces échanges parmi lesquels les systèmes de sécrétion. Ainsi, environ 25 % des bactéries à Gram négatif possèdent un système de sécrétion de type VI (SST6) [4]. Le système de sécrétion de type VI, utilisé pour la compétition bactérienne et pour l'infection de cellules eucaryotes, est une nanomachine contractile localisée à la membrane de la bactérie, pouvant être comparé à un harpon moléculaire. La flèche qui transporte des toxines, est assemblée à l'intérieur d'un ressort, le fourreau, dont la contraction permet de propulser la flèche vers la cellule cible afin d'y injecter les toxines qu'elle contient. Ce harpon moléculaire est formé de plusieurs parties qui s'assemblent dans un ordre spécifique. On y retrouve ainsi le complexe membranaire, la plateforme d'assemblage, le tube et le fourreau contractile *(Figure 1A)* [5]. La complexité de ce système laisse supposer la nécessité d'une chronologie d'assemblage finement régulée et contrôlée. Cet article synthétise les connaissances sur la régulation et l'assemblage du SST6.

Initiation de l'assemblage

Le SST6 est ancré au niveau de la membrane bactérienne et sa biogénèse débute avec l'arrivée du complexe membranaire, premier élément de la structure *(Figure 1B)*. Il est composé de trois protéines, TssJ, TssL et TssM. Initialement, seules TssJ et TssM s'insèrent dans la membrane. Cela marque le début de l'assemblage du SST6, qui se poursuit par l'insertion de la protéine cytoplasmique TssA *(Figure 1B)*. Des études ont mis en évidence la symétrie d'ordre 6 de TssA, dont la structure ressemble à celle d'une étoile à six branches [6]. TssA s'associe au complexe membranaire TssJM avec lequel elle interagit. Cette interaction a été mise en évidence par des techniques de co-purification qui permettent de révéler les interactions protéine-protéine [7]. L'intérêt du recrutement de TssA dans les étapes précoces de la biogénèse est encore mal compris. Cependant, TssA pourrait jouer un rôle d'adaptateur permettant de lier le complexe membranaire à symétrie d'ordre 5 au reste du SST6, de symétrie d'ordre 6. En parallèle, la protéine TssL, dernier composant du complexe, s'intègre à la membrane.

Une fois le complexe membranaire assemblé, TssA permet le recrutement de la plateforme d'assemblage et de la pointe perforatrice avant d'initier la polymérisation du tube et du fourreau contractile *(Figure 1B)* [6]. La question qui se pose est maintenant de comprendre comment le reste du système se met en place.

Élongation de la structure contractile

La formation et l'élongation du tube entouré de son fourreau contractile constituent la prochaine étape de l'assemblage du SST6. La protéine Hcp, sous forme d'hexamère, constitue le tube, tandis que le fourreau contractile est composé de blocs formés des protéines TssB et TssC *(Figure 1B)*. Le recrutement des nouvelles sous-unités de la structure est assuré par TssA qui présente ainsi plusieurs propriétés : elle se lie au complexe membranaire ainsi qu'aux hexamères d'Hcp du tube et aux blocs de TssBC du fourreau [6]. Une fois les premières sous-unités recrutées, TssA coordonne l'assemblage de la structure tube/fourreau, comme cela a pu être observé par des expériences de microscopie à fluorescence *(Figure 2)* [6]. La protéine TssA et les protéines du fourreau contractile ont été étiquetées par des marqueurs fluorescents verts

*Ces trois auteurs ont de façon égale participé au travail

https://doi.org/10.1051/medsci/2020065

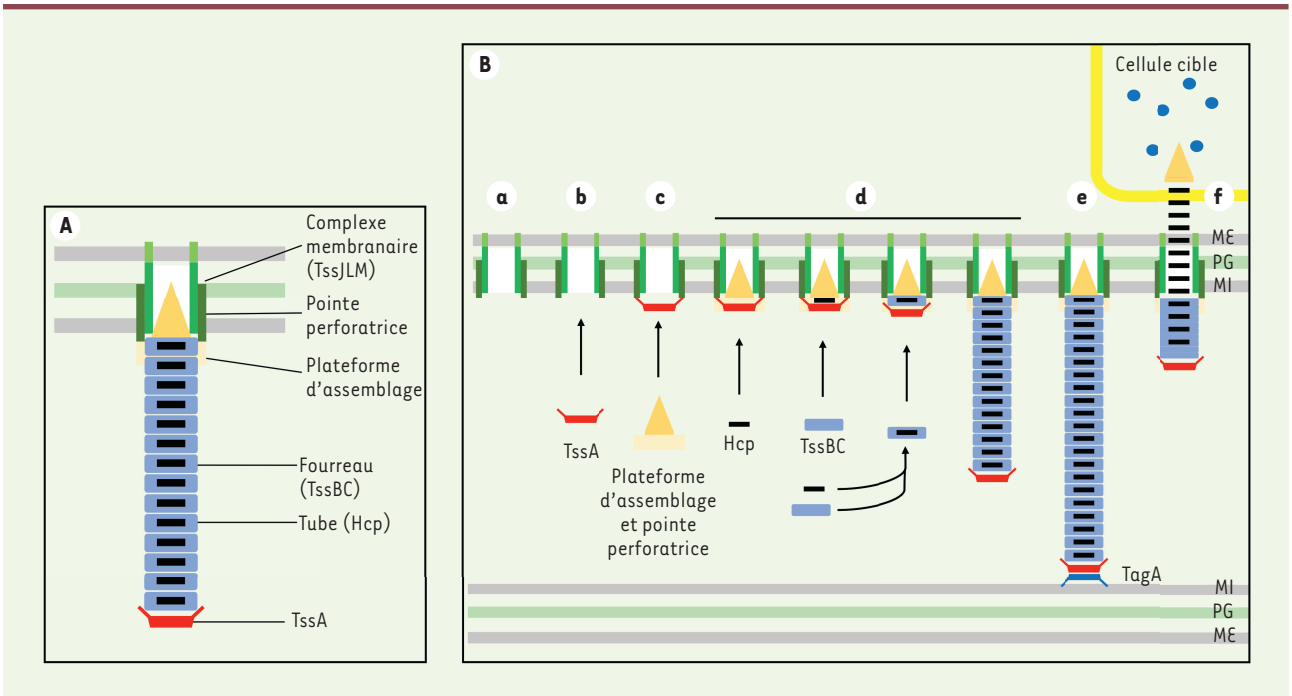


Figure 1. ***Structure, assemblage et contraction du système de sécrétion de Type VI (SST6). A.*** Représentation schématique du SST6 assemblé et de ses composants. ***B.*** Les différentes étapes de l'assemblage du SST6 : ***(a)*** recrutement du complexe membranaire TssJLM ; ***(b)*** recrutement de TssA ; ***(c)*** recrutement de la plateforme d'assemblage et de la pointe perforatrice ; ***(d)*** élongation de la structure contractile par empilement de Hcp composant le tube et de TssBC composant le fourreau ; ***(e)*** arrêt de l'élongation lors de l'interaction entre TssA et TagA ; ***(f)*** contraction du fourreau pour injecter des effecteurs protéiques dans la cellule cible. ME : membrane externe ; PG : peptidoglycane ; MI : membrane interne.

(sfGFP) et rouges (mCherry), ce qui a permis de montrer que TssA se désolidarisait de la structure membranaire en restant positionnée à l'extrémité distale de la structure contractile en formation, s'éloignant ainsi de la membrane. Ce positionnement permet à TssA d'assurer le recrutement progressif des hexamères de Hcp et des blocs TssBC à l'extrémité distale *(Figure 1B)*.

Cette élongation, qui mène à la formation complète d'une structure contractile et opérationnelle, s'effectue en quelques minutes *(Figure 1B* et *Figure 2)*. À ce stade, il est légitime de se demander comment se passe l'arrêt de l'élongation et quels sont les mécanismes mis en place pour réguler la taille de la structure tubulaire.

Terminaison de l'assemblage

L'élongation du SST6 par empilement de Hcp et des blocs de TssBC se poursuit jusqu'à ce que celui-ci rencontre la membrane située à l'opposé de la cellule bactérienne *(Figure 1B* et *Figure 2)* [8]. Pour arrêter l'élongation, le recrutement de TagA, protéine cytoplasmique liée à la membrane, est nécessaire [8,9]. Lorsque le SST6 arrive à la membrane opposée, il rencontre TagA qui s'associe à TssA et bloque sa capacité à recruter les hexamères de Hcp et les blocs de TssBC, ce qui mène à la terminaison de l'élongation du SST6 *(Figure 1B* et *Figure 2)*. L'interaction entre TssA et TagA a été mise en évidence par la technique d'APEX2 (*engineered ascorbate peroxydase 2*) [9]. Cette technique repose sur un étiquetage de toutes les protéines situées à proximité de celle que l'on veut étudier, suivi d'une identification des protéines étiquetées (dans ce cas, TssA). Cela permet de révéler ce que l'on appelle le proxisome, c'est-à-dire l'ensemble des protéines à proximité de la protéine d'intérêt. La technique d'APEX2 a été nommée ainsi car elle utilise un variant synthétique de l'ascorbate peroxydase qui permet d'oxyder les dérivés du phénol en radicaux phénoxyl en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Plus précisément, le phénol-biotine est oxydé en phénoxyl-biotine qui marque les partenaires proches. Ces partenaires ainsi marqués peuvent être identifiés par spectrométrie de masse : c'est ainsi que la protéine TagA a été révélée comme partenaire de TssA.

Selon ce modèle, en l'absence de TagA, le SST6 continuerait de s'allonger malgré sa rencontre avec la membrane opposée. C'est un phénomène que l'on observe chez les bactéries dépourvues de TagA dans lesquelles le SST6 se courbe pour continuer à s'allonger. La localisation membranaire de TagA implique que la terminaison de l'élongation du SST6 ne peut avoir lieu qu'une fois que ce dernier a atteint la membrane opposée. La longueur du tube et du fourreau est ainsi limitée par la distance entre les membranes de la bactérie, donc par la

Entretien avec Éric Cascales mené par les auteurs de la Nouvelle



Éric Cascales est directeur de recherche au CNRS et travaille sur les systèmes de sécrétion bactériens au Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires (LISM) à Marseille. Son équipe est à l'origine de nombreuses avancées sur la structure et l'assemblage du système de sécrétion de type VI, découvert en 2006. Eric Cascales est également éditeur pour différents journaux scientifiques. Il a reçu plusieurs distinctions dont la médaille de bronze du CNRS en 2011 et le prix Bettencourt « Coups d'élan pour la recherche française » en 2018.

Pourriez-vous vous présenter en quelques mots ?

Éric Cascales

Je suis directeur de recherche au CNRS et je dirige une équipe qui est actuellement composée d'une quinzaine de membres. Dans cette équipe, il y a des chercheurs statutaires, des ingénieurs, des techniciens, des post-doctorants français et étrangers et des doctorants.

Est-ce que vous pouvez nous présenter les différentes thématiques sur lesquelles travaille votre équipe ?

EC : Nous travaillons sur les mécanismes qui permettent de contrôler et réguler les communautés bactériennes. Ce qui nous intéresse, c'est de comprendre comment les bactéries vont interagir les unes avec les autres. Actuellement, deux projets principaux sont développés. Le premier projet porte sur le système de sécrétion de type VI qui est l'une des armes utilisées par les bactéries pour en tuer d'autres. Bien entendu, la compétition bactérienne fait partie du contrôle des communautés microbiennes. Plus récemment, nous avons débuté un nouveau projet sur un autre système de sécrétion : le système de sécrétion de type IX dont le rôle est la sécrétion de toxines, mais également la propulsion des bactéries.

Le SST6, c'est un sujet où il y a beaucoup de compétition. Comment vous situez-vous par rapport à cela ? Est-ce plutôt motivant ou, à l'inverse, une source de stress ?

EC : C'est une source de motivation bien évidemment car on sait qu'il y a des équipes dans le monde qui travaillent sur des choses très similaires aux nôtres. Ça veut dire qu'on ne peut pas se permettre d'attendre, il faut être pro-actif et c'est une source de motivation. C'est aussi une source de stress puisque quand on a bien avancé une étude, on se dit qu'on peut se faire « *scooper* » à n'importe quel moment. Parfois on passe devant un concurrent, parfois ce sont eux qui nous passent devant, c'est ainsi… Mais le plus souvent, on discute avec ces équipes pour se tenir au courant de ce qu'elles font, parfois même on collabore. Actuellement, il y a une grosse quinzaine d'équipes dans le monde qui travaillent sur le SST6. Nous savons qu'il y a des risques que nos projets se chevauchent. On va donc essayer d'engager la conversation et de voir comment on peut le faire de manière « intelligente » pour tout le monde.

Est-ce que vulgariser est un exercice que vous avez souvent l'occasion de faire et qui vous plaît ?

EC : On n'a pas eu souvent l'occasion de le faire mais chaque fois que nous l'avons fait, cela a été avec grand plaisir. Nous sommes souvent invités à faire des conférences ou des séminaires dans des instituts scientifiques ou dans des congrès. On s'adresse alors à un public de spécialistes. Dans un article scientifique, on décrit des faits et on ne vulgarise pas tellement. Quelquefois, il arrive qu'une télé passe au laboratoire pour faire un reportage. On a eu aussi *Sciences & Vie Junior* qui voulait faire un article et on a dû faire de la vulgarisation. Le SST6 s'y prête plutôt bien car même pour des enfants, on peut comparer le tube interne et la pointe avec les toxines à une flèche, comme une sarbacane. Pour le fourreau contractile, on peut parler d'un ressort. Le complexe membranaire serait une meurtrière par laquelle la flèche va être éjectée. Donc oui, c'est plutôt simple de vulgariser nos projets actuels.

À un niveau un peu plus personnel, est-ce que vous pourriez nous parler de votre parcours ?

EC : Je ne me destinais pas du tout à faire de la science. Je suis violoniste ; j'ai commencé le violon quand j'avais 4 ans. Pour faire court, après des études poussées en violon, j'avais l'appréhension de faire de la musique toute ma vie ou de me retrouver professeur de musique. Et en cherchant ce qui pourrait m'intéresser, j'ai trouvé la biochimie et du coup, j'ai fait un bac technique en biochimie (STL). Après, je suis allé à la fac et j'ai continué là-dedans. Chaque année, je me disais que l'année d'après, j'allais arrêter. Finalement, le parcours a été extrêmement linéaire à partir du moment où je suis rentré à la fac, même s'il n'était pas du tout prévu dans ma tête. C'est comme ça que je me suis retrouvé en post-doctorat aux États-Unis. À mon retour, j'ai obtenu un poste au CNRS où j'ai pu monter mon équipe.

C'est comme ça qu'est venu le système de sécrétion de type 6 ?

EC : C'est comme ça qu'est venu le système de sécrétion de type 4 ! À l'époque, le type 6 n'était pas encore identifié. Mais, à vrai dire, ce n'était même pas le système de type 4 qui m'intéressait, j'étais amoureux de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*, et je me demandais « *Comment une bactérie peut-elle avoir des gènes avec des signaux d'expression eucaryotes ?* ». J'avais trouvé ça absolument fascinant, en termes d'évolution et je voulais vraiment travailler là-dessus.

Le système de sécrétion de type 6 est venu plus tard. À mon retour au CNRS, j'ai commencé à travailler sur le système de sécrétion de type 4. Mais quand le système de sécrétion de type 6 a été identifié par une équipe américaine, je me suis dit « *Allons-y !* ». En réalité, je désirais repartir avec la thématique sur laquelle je travaillais durant mon post-doctorat et continuer des choses qui ont été développées, mais cela a été compliqué. Du coup, quand l'opportunité du système de sécrétion de type 6 s'est présentée, je suis parti directement dessus en me disant que ça me faisait commencer quelque chose de nouveau et à un endroit où je pouvais faire ma niche.

Après ce parcours, de quelle réussite êtes-vous particulièrement fier ?

EC : Il n'y a pas un résultat particulier qui va me faire dire « *Je suis fier de ça* », parce qu'en fait c'est une succession de petits plaisirs. Je dirais qu'il y a deux choses qui m'importent et que je regarde avec fierté.

La première, c'est la continuité. Quand on regarde et on se dit qu'on a réalisé un joli travail pour essayer de bien décortiquer toute cette machine, son assemblage et son mode de fonctionnement. C'est plutôt la globalité que je trouve intéressante, c'est de se dire « *Ça fait douze ans qu'on travaille sur ça et, petit à petit, par petites briques, on a construit quelque chose.* », que ce soit nous ou des contributions d'autres équipes, on peut être fier de ce qu'on a construit, de ce qu'on a apporté à la connaissance scientifique dans ce domaine.

La seconde, c'est la fierté quand on voit les doctorants qui partent après avoir fait un beau travail. On peut être fier de la thèse, mais c'est encore plus de fierté quand ils réussissent en post-doctorat. Je suis fier d'eux quand ils publient un article dans leur nouveau laboratoire, et encore plus quand ils reviennent et qu'ils ont obtenu un poste. Par exemple, la première étudiante que j'ai eue en thèse sur le système de sécrétion de type 6 au laboratoire est partie faire un post-doctorat aux États-Unis, puis elle a eu un poste dans un institut prestigieux en Suède. Quand elle est arrivée au laboratoire, en master 2, elle a appris à pipeter ; et maintenant, elle va diriger une équipe au Karolinska Institutet à Stockholm. S'il y a une véritable source de fierté, c'est plutôt cela.

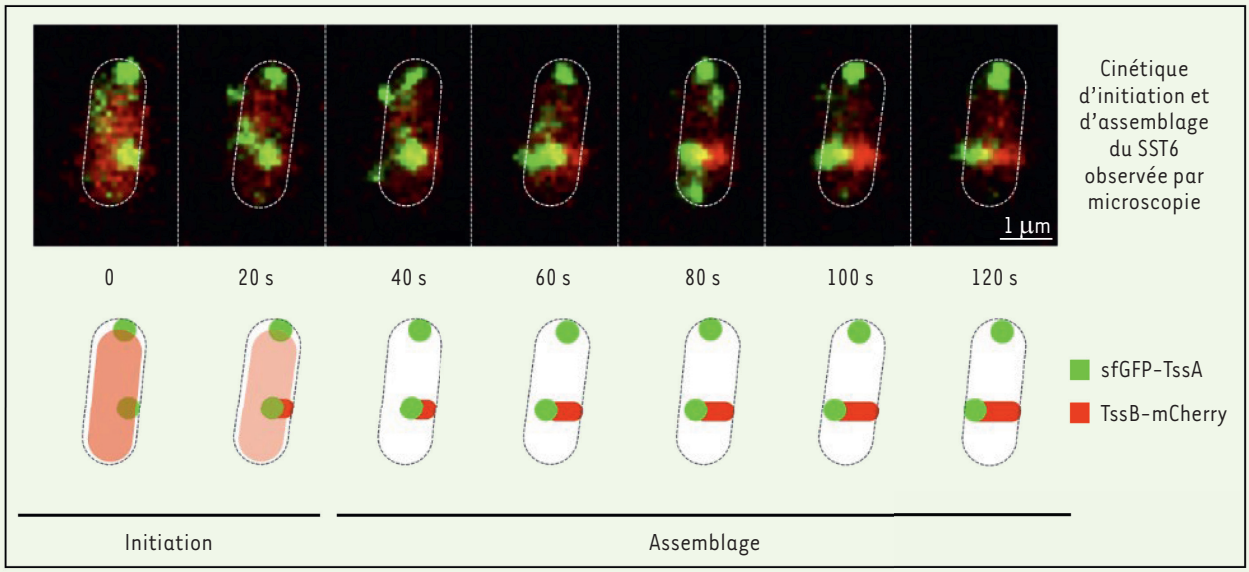


Figure 2. ***Formation d'un système de sécrétion de type VI* in vivo.** Les images ont été prises toutes les vingt secondes dans des cellules d'*Escherichia coli* entéroagrégatives produisant les protéines sfGFP-TssA et TssB-mCherry. sfGFP (vert) et mCherry (rouge) sont des marqueurs fluorescents qui permettent de suivre la localisation cellulaire de TssA et TssB au cours du temps. TssA se localise à l'extrémité distale du fourreau de TssBC durant l'élongation. Barre d'échelle, 1 µm (images de l'équipe d'Éric Cascales, non publiées).

largeur de la cellule. L'intervention de TagA marque la fin de l'assemblage du SST6 et permet de maintenir le fourreau contractile sous sa forme étendue, énergétiquement défavorable, jusqu'à sa contraction *(Figure 1B)*.

Rôle du SST6 *in vivo*

De la mise en place du complexe membranaire, formé de TssJLM, à la polymérisation d'un long tube de Hcp entouré de son fourreau contractile de TssBC, le SST6 est une nanomachine complexe qui requiert l'intervention de protéines coordinatrices pour sa formation. Ainsi, deux protéines TssA et TagA, jouent des rôles particulièrement importants pour la formation d'un SST6 opérationnel. TssA intervient dès le début de l'assemblage et permet ensuite le recrutement progressif des sous-unités de la structure contractile. Pour remplir cette fonction, TssA se positionne à l'extrémité distale du tube et du fourreau en formation. Cette élongation se poursuit jusqu'à la rencontre de TssA avec TagA, positionnée sur la membrane opposée. La longueur du SST6 est donc régulée par la largeur de la bactérie. Cette longue structure peut ensuite se contracter pour injecter des toxines dans les cellules cibles. Une des finesses de ce système est qu'il permet aux bactéries de la même espèce de ne pas se nuire entre elles. En effet, toutes les bactéries possédant le SST6 produisent également une protéine d'immunité spécifique de la toxine qui agit comme un antidote. Par conséquent, cette espèce bactérienne n'est pas impactée, ce qui permet une multiplication de ces bactéries en parallèle d'une mortalité accrue des espèces ne produisant pas la protéine d'immunité. Le SST6, grâce à ce système ingénieux, permet *in fine* aux bactéries qui le possèdent de prendre l'avantage sur de possibles compétitrices au sein d'une niche écologique [1]. Par ailleurs, d'autres questions restent en suspens comme une meilleure compréhension du mécanisme d'élongation s'effectuant par l'intermédiaire de TssA, notamment son mécanisme d'ouverture permettant l'intégration des Hcp et des blocs TssB et TssC ; ou encore le fonctionnement de la protéine TagA dans l'arrêt de l'élongation et dans quelle mesure son interaction avec TssA empêcherait cette dernière de continuer à recruter Hcp et les blocs de TssBC. Une meilleure connaissance de ces mécanismes pourrait ainsi aider à la compréhension de la dynamique de communautés microbiennes comme le microbiote intestinal. En outre, une compréhension plus fine des mécanismes d'infection mis en place par les bactéries pourrait permettre de proposer de nouvelles solutions thérapeutiques pour lutter plus efficacement contre les microorganismes pathogènes. ◊

Structure and assembly of a bacterial nano-speargun: The type VI secretion system

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Sana TG, Lugo KA, Monack DM. T6SS: the bacterial fight club in the host gut. *PLoS Pathogens* 2018 ; 13 : e1006325.
2. Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, *et al.* The long-term stability of the human gut microbiota. *Science* 2013 ; 341 : 1237439.
3. Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, *et al.* Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* 2004 ; 53 : 1-4.

RÉFÉRENCES

4. Chen C, Yang X, Shen X. Confirmed and potential roles of bacterial T6SSs in the intestinal ecosystem. *Front Microbiol* 2019 ; 10 : 1484.
5. Cherrak Y, Flaugnatti N, Durand E, *et al*. Structure and activity of the type VI secretion system. *Microbiol Spectrum* 2019 ; 7 : 0031.
6. Zoued A, Durand E, Brunet YR, *et al.* Priming and polymerization of a bacterial contractile tail structure. *Nature* 2016 ; 531 : 59-63.
7. Phizicky EM, Fields S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev* 1995 ; 50 : 94-123.
8. Santin YG, Doan T, Journet L, *et al.* Cell width dictates type VI secretion tail length. *Curr Biol* 2019 ; 29 : 3707-13.
9. Santin YG, Doan T, Lebrun R, *et al.* In vivo TssA proximity labelling during type VI secretion biogenesis reveals TagA as a protein that stops and holds the sheath. *Nat Microbiol* 2018 ; 3 : 1304-13.

https://doi.org/10.1051/medsci/2020066