



Résumé

L'Organisation mondiale de la santé a incluse *Pseudomonas aeruginosa* dans la liste des "pathogènes prioritaires" qui exigent une attention renforcée en termes de développement de nouvelles approches thérapeutiques. *P. aeruginosa* est une bactérie gram - pathogène et opportuniste qui se retrouve dans un nombre élevé d'infections nosocomiales notamment chez les personnes immunodéprimés. De plus, elle est réputée pour sa haute capacité à développer des mécanismes de multi-résistance qui rendent le traitement des infections extrêmement difficile et rapidement obsolètes. De ce fait, une compréhension fine des mécanismes de défense de *P. aeruginosa* doit permettre la mise au point de nouvelles approches thérapeutiques robuste. Pour se protéger contre l'hôte, *P. aeruginosa* a la capacité de former un biofilm ou de s'internaliser dans les cellules de l'hôte. Ces deux stratégies bloquent l'accès par les cellules immunitaires et les antibiotiques aux bactéries individuelles. De plus, les bactéries intériorisées sont particulièrement toxiques pour la cellule hôte car elles y libèrent de nombreuses toxines. Ainsi, une voie les plus prometteuses de lutte contre *P. aeruginosa* est de limiter cette capacité à coloniser les cellules de l'hôte. La première étape de l'internalisation est le franchissement de la membrane plasmique de la cellule hôte -la barrière semi-perméable entre le cytosol et l'environnement extracellulaire-. La membrane plasmique contient sous forme d'une bicouche lipidique, différents domaines lipidiques associés à des protéines. Pour traverser cette membrane, la bactérie exploite certaines protéines ou récepteurs membranaires afin de plier directement la membrane ou/et d'activer une voie d'endocytose. Ces processus nécessitent au préalable une forte réorganisation des lipides et des protéines membranaires par les toxines bactériennes au niveau des points d'entrées. Les glycosphingolipides membranaires plasmiques (GMPs) sont d'importants composants membranaires impliqués dans l'adhésion cellulaire, la signalisation et l'endocytose. Ils se composent d'un squelette d'acide gras hydrophobe incorporé dans la bicouche lipidique et du groupe de tête glucidique, exposé à l'environnement extracellulaire. Ces GMPs sont souvent détournés par les pathogènes tels les virus et les bactéries qui se lient aux extrémités glucidiques à l'aide des protéines appelées "lectines". Cette interaction lectine/GMP est généralement forte et très spécifique et permet aux pathogènes à se fixer solidement à la membrane plasmique de l'hôte, facilitant leur l'internalisation dans les cellules hôtes. Ce type de liaison peut à elle seule être suffisamment forte pour induire la nucléation des tubules membranaires et permettre une internalisation de la lectine sur des systèmes de membranes artificielles. De tels résultats ont été mis en évidence avec de nombreuses lectines soit isolées soit en association avec des bactéries (Eierhoff et al.). C'est notamment le cas de la lectine de surface (LecA) de *P. aeruginosa*. Cette lectine se lie le GMP globotriaosylcéramide (Gb3). Cette interaction a été caractérisées sur des vésicules unilamellaires géantes (GUV) contenant 5 % mol de Gb3. Ainsi, sur ces GUVs avec Gb3, les résultats ont mis en évidence une fixation des *P. aeruginosa* produisant du LecA, se lient aux GUVs avec Gb3. De plus, après fixation sur les GUVs, ces bactéries induisent la formation d'invagination tubulaire appelée "lipid zipper". L'absence de LecA empêche l'internalisation bactérienne dans les systèmes membranaires artificiels ainsi que dans les cellules vivantes. LecA est donc cruciale pour *P. aeruginosa*. Les études ont mis en évidence que LecA se lie spécifiquement à l'extrémité glucidique de Gb3 et plus spécifiquement aux résidus galactose. Toutefois, les mécanismes de réorganisation de la membrane plasmique suite à liaison de LecA n'avait pas encore fait l'objet d'étude. Dans cette thèse, nous étudions les effets de *P. aeruginosa* et plus spécifiquement l'action de LecA sur la réorganisation des membranes plasmiques. Les travaux portent tout particulièrement sur le rôle de l'interaction LecA/Gb3 et de la bactérie au niveau de l'organisation et la diffusion latérales des lipides au sein de membranes modèles. Nous avons également étudié l'influence de la composition du Gb3 notamment lipidique sur la liaison

de LecA avec la membrane plasmique modèle ou cellulaire. Au sein des membranes plasmiques, les GMPs s'associent généralement avec la sphingomyéline (SM) et le cholestérol (Chol) pour former des nano-domaines très ordonnés (parfois appelés "radeaux lipidiques"). L'assemblage et la réorganisation de ces sous-domaines s'avèrent importants dans les premières étapes de la transduction des signaux cellulaires et de l'endocytose. Toutefois, l'étude de ces domaines directement dans les cellules vivantes est une tâche exigeante car ils sont de dimensions réduites et très dynamiques. Une approche alternative consiste à produire des membranes synthétiques avec une composition mimant la composition des différents sous-domaines. Nous en avons utilisé de deux types : les vésicules unilamellaires géantes (GUVs) et les bicouches lipidiques supportées (SLBs). Dans de tels systèmes, les domaines lipidiques sont stables et de taille microscopique ce qui permet de les étudier en utilisant différentes techniques de microscopie conventionnelles. Il est à noter que ces domaines microscopiques ne ressemblent que partiellement aux nano-domaines des membranes cellulaires vivantes et que seules certaines caractéristiques du processus d'assemblage des domaines peuvent être étudiées. Par contre, la maîtrise de tous les composants de ces membranes synthétiques permet d'élucider le rôle associé à chaque composant et leur implication dans la formation et la réorganisation du domaine lipidique. Afin d'étudier la réorganisation des domaines lipidiques induite par *P. aeruginosa*, nous avons utilisé des SLBs contenant 5 % mol de récepteurs Gb3. Nous avons créé des bicouches lipidiques avec deux types de domaines de phase séparés dans l'espace coexistant en utilisant un mélange lipidique à trois composants (DOPC, Chol et de SM). Cette bicouche lipidique est communément admise comme un modèle représentatif du feuillet externe de la membrane plasmique à l'échelle microscopique. L'interaction forte entre la SM et le Chol induit la formation de micro-domaines serrés (analogue synthétique des nano-domaines de la membrane plasmique que nous appellerons Lo). La structure lipidique des GMPs tel le Gb3 favorise leur présence dans les nano-domaines de la membrane plasmique et ils se retrouvent majoritairement dans les domaines Lo de nos systèmes synthétiques. Mes travaux ont mis en évidence que le type sauvage de *P. aeruginosa* (exprimant LecA) adhère efficacement à la surface des bicouches lipidiques modèles contenant de Gb3. Nous avons notamment mis en évidence que les bactéries s'agrègent et forment des grappes bactériennes sur ces bicouches lipidiques supportée. D'un point de vue organisationnel, lors de l'agrégation, *P. aeruginosa* séquestrent la matière lipidique de la membrane synthétique et modifie l'organisation spatiale des domaines Lo dans la bicouche lipidique. Lo deviennent plus petits et disparaissent. La délétion LecA des bactéries (*PA ΔLecA*) n'adhère pas efficacement à la surface de la membrane et ne forme plus d'agrégats bactériens. Ainsi, la dissolution des domaines Lo et l'accumulation du matériel lipidique sur la surface bactérienne ne sont plus observées avec *PA Δ LecA*. Pour approfondir, le rôle des interactions LecA/Gb3 sur l'organisation membranaires, nous avons exploré l'action de LecA isolé sur les SLBs modèles. A l'instar des observations avec la *P. aeruginosa* sauvage, LecA isolé induit la dissolution des domaines Lo. En outre, LecA extrait le matériau de la membrane d'origine afin de former les multicouches lipidiques. Progressivement LecA, appauvrit la membrane en lipides qui finit par se désintégrer. Nous avons comparé nos travaux avec LecA avec une autre toxine se liant à Gb3, la sous-unité B de la toxine Shiga de *S. dysenteriae* (StxB). Les études comparées sur les systèmes membranaires synthétiques (GUVs et SLBs) ont mis en évidence que StxB se lie préférentiellement aux Gb3 présents dans les domaines Lo ainsi que le regroupement efficace des molécules Gb3 induit par la liaison multivalente du StxB. Ainsi, les interactions StxB/Gb3 rétrécissent les domaines Lo et induisent la formation de nouveaux domaines Lo dans les SLBs. Ce clustering de Gb3 est induit par les sites de liaisons à Gb3 sur StxB (15 et orientées dans une seule direction). Contrairement au StxB, la structure de LecA ne contient que 4 sites de liaison spécifiques au Gb3 et, en outre, la distance entre eux est significativement plus grande que sur StxB (Schubert and Römer, 2015). Cette géométrie des sites de liaison de LecA n'est pas adaptée au regroupement des glycolipides contrairement à StxB et ce que nos résultats ont confirmé. Ainsi, nous avons mis en évidence que la grande distance entre les Gb3 fixés par LecA induit la dissolution des domaines Lo par homogénéisation de la membrane plasmique. Contrairement à StxB, LecA fixe préférentiellement les Gb3 au niveau

des limites domaines lipidiques (Lo/Ld). Cette zone plus fragile de la membrane permet la formation multicouche membranaire. L'interaction LecA-Gb3 est suffisamment forte pour détacher la membrane du support solide former la membrane multicouche avec le LecA concentré entre les couches de membrane ou de l'enrouler autour de *P. aeruginosa*. La dissolution des couches précède la formation des multicouches membranaires. Sur les SLB avec un seul type de domaine lipidique (sans interface entre domaine) le mélange de phase ne peut pas se produire. Il en résulte que l'ajout de LecA les désintègre complètement dans les 5 minutes suivant l'application de LecA. Tandis que sur les expériences en phase séparée (présence de Lo et de Ld), les défauts de membrane bicouches commencent à apparaître plus tardivement (après 15 minutes environ). La présence d'un mélange des phases facilite la formation multicouche de la membrane (par exemple, l'arrachement du matériau lipidique induit par LecA). A partir de ces travaux, nous avons démontré que LecA est une protéine qui permet la fixation de *P. aeruginosa* sur la membrane plasmique contenant du Gb3 mais aussi que cette liaison entraîne une dissolution des domaines Lo de la membrane plasmique qui précède l'internalisation bactérienne. En étudiant plus en détail, la dynamique de la réorganisation des domaines membranaires induite par les lectines, nous avons également exploré le rôle de la valence et de la géométrie des lectines (StxB et LecA) dans ce processus. Nous avons observé non seulement des différences dans la dynamique de réorganisation des domaines lipidiques induite par le StxB et le LecA, mais aussi des variations dans les préférences de liaison aux bicouches lipidiques. Ces variations peuvent provenir de la composition lipidique de la bicouche lipidique et de la structure moléculaire du récepteur Gb3. Ces deux facteurs définissent l'exposition de l'extrémité glucidique de Gb3 à l'environnement extracellulaire et modifier l'affinité des lectines pour les sucres de Gb3. Dans nos expériences précédentes, nous avons toujours utilisé ce que l'on appelle le type sauvage de Gb3 qui est extrait du cerveau porcine et contient un mélange naturel de molécules de Gb3 avec différentes chaînes d'acides gras. Pour déterminer le rôle de ces acides gras sur l'interaction lectine-Gb3, nous avons utilisé des GUVs réalisées avec différents Gb3 (sauvages, Gb3-FSL-DOPE, Gb3 C-24:0 et Gb3 C-24:1). Nous avons également ajusté la composition lipidique afin d'élucider les exigences spécifiques pour la liaison efficace des lectines (StxB et LecA). Dans le cadre que cette étude, nous avons développé la macro FIJI qui permet une analyse quantitative robuste, rapide et non biaisé des données obtenues par microscopie à fluorescence. Nous avons pu ainsi mettre en évidence que le StxB se lie préférentiellement aux Gb3 incorporées dans un environnement ordonné tandis que le LecA se lie plutôt à un Gb3 environnement lipidique moins ordonné sans pour autant être complètement désordonné. L'utilisation de systèmes lipidiques synthétiques (GUV, SLB) est un outil puissant pour l'élucidation des mécanismes moléculaires des toxines bactériennes vis-à-vis de la membrane plasmique. Ainsi lors de mes travaux, nous avons pu caractériser les mécanismes d'interaction de la bactérie pathogène, *P. aeruginosa*, avec la membrane plasmique par l'intermédiaire de l'étude de l'interaction entre la lectine LecA et son récepteur membranaire Gb3. Avec l'utilisation de SLB et de GUV modèles, nous avons identifié le rôle de LecA dans la liaison bactérienne à la membrane plasmique et également mis en évidence l'action de LecA sur la membrane favorisant l'internalisation bactérienne. D'un point de vue moléculaire, l'interaction LecA-Gb3 cause la dissolution des domaines ordonnés de la membrane plasmique et une participation au recouvrement de la bactérie par la membrane plasmique de l'hôte. Ce processus est vraisemblablement nécessaire pour une internalisation réussie de *P. aeruginosa* dans la cellule hôte. De plus, nos études avec le LecA isolé, ont mis en évidence que cette toxine peut à elle seule réorganiser une bicouche lipidique notamment en désorganisant le domaine Lo et parvenant à produire spontanément des multicouches lipidiques. Nous avons comparé l'impact de LecA sur la membrane à la StxB, une autre toxine ciblant spécifiquement Gb3. Ainsi contrairement à LecA, StxB compacte les domaines Lo existants et induit également la formation des nouveaux domaines Lo et cela sans rupture de la bicouche lipidique. Nous avons également mis en évidence le rôle des chaînes grasses des récepteurs Gb3 dans la liaison de LecA et StxB à la bicouche lipidique. Ainsi, par l'utilisation de récepteurs Gb3 avec des chaînes grasses de compositions différentes, nous avons observé que le LecA interagit préférentiellement avec les molécules de Gb3 incorporées dans un environnement lipidique

assez désordonné tandis que l'interaction Gb3/StxB est plus favorisée en milieu ordonné. En perspective, nous envisageons de valider nos observations sur le rôle de la structure de Gb3 dans l'infection à *P. aeruginosa*. Pour cela, les interactions de la bactérie complète seront étudiées sur nos modèles de bicouches lipidiques composées avec les différentes structures de Gb3 et comparées à l'action de la toxine LecA seule.