

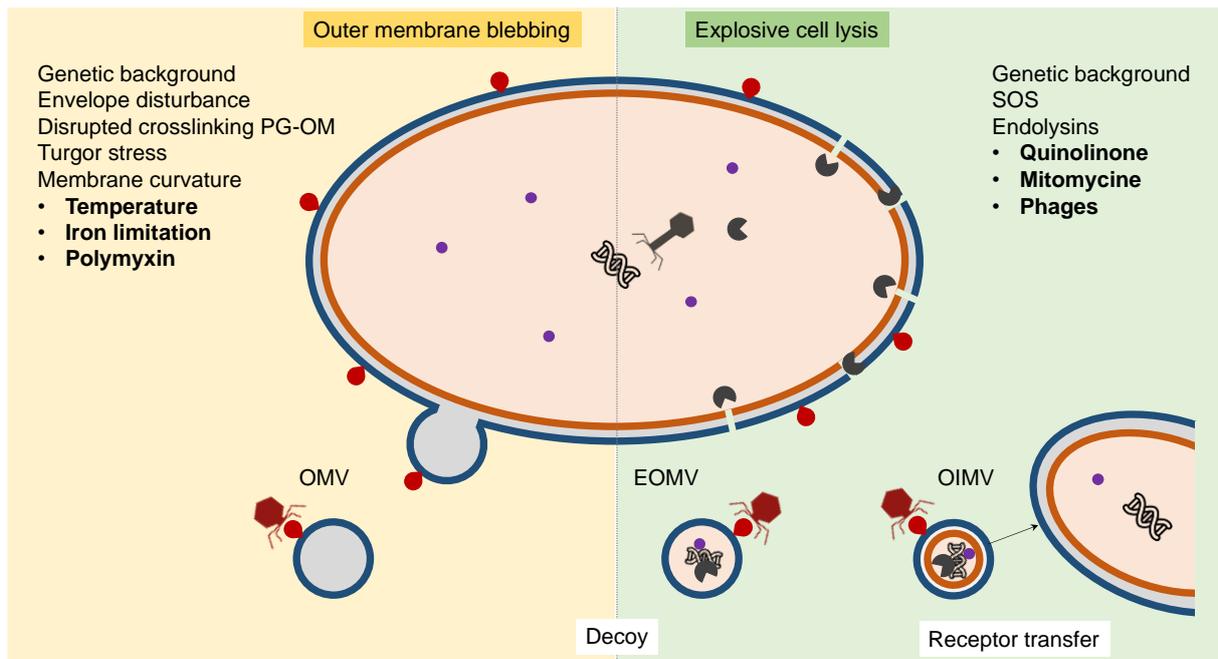
Rôle des vésicules membranaires dans le contrôle des interactions phage-bactérie

Marylise Duperthuy & Frédérique Le Roux
Département de microbiologie, infectiologie et immunologie
Faculté de Médecine, UdeM

En 2050, les bactéries multi-résistantes aux antibiotiques pourraient causer 10 millions de décès par an. Il est urgent de développer de nouveaux antibactériens. Les bactériophages, prédateurs viraux naturels des bactéries, constituent une alternative éco-responsables aux antibiotiques. Avant d'envisager l'utilisation des bactériophages en phagothérapie, **il est crucial** de comprendre les mécanismes impliqués dans l'infection et la résistance des bactéries. L'infection implique l'adsorption du bactériophage à la membrane, l'injection de son génome dans le cytoplasme, la réplication, la production et la libération de particules virales. Si la résistance bactérienne peut théoriquement cibler chacune de ces étapes, pléthore des travaux récents se concentrent sur les mécanismes intracellulaires de défense, délaissant les premières phases du cycle infectieux, fixation au récepteur à la surface des cellules et passage transmembranaire du génome du phage.

Afin de combler ce manque de connaissance, **l'objectif de ce projet** est d'étudier le rôle des vésicules membranaires dans le contrôle de l'infection par le bactériophage (**voir le résumé graphique**). La plupart des bactéries libèrent des vésicules membranaires dans le milieu par des procédés plus ou moins détritimentaires pour la cellule. Ces vésicules peuvent exposer à leur surface le récepteur d'un phage et donc potentiellement titrer les particules virales du milieu, au profit des cellules bactériennes (effet anti-phage). Un type de vésicule composé d'une double couche lipidique (Outer-Inner Membrane vesicles, OIMV) peut fusionner avec les membranes d'une cellule n'exprimant pas le récepteur au phage. Le transfert du récepteur, rend alors possible les premières étapes d'infection (effet sur la spécificité du phage). Les OIMV constituent de plus un modèle simplifié pour explorer les mécanismes d'injection du génome du phage. **Un verrou majeur** à l'étude du rôle des vésicules membranaires dans le contrôle de l'infection par le bactériophage est la connaissance des paramètres clé de la vésiculation, lié d'une part au génotype de l'hôte, d'autre part à l'action de facteurs environnementaux comme la température, la limitation de Fer, l'action de certains antibiotiques et l'infection par des phages.

Nous utilisons comme système modèle l'espèce *Vibrio crassostreae*, pathogène d'invertébrés marins. Le génome de 157 souches génétiquement diversifiées et des phages qui les infectent sont disponibles. **Au cours de ce stage**, nous évaluerons la capacité de chaque souche à produire des vésicules dans différents milieux de culture (pauvre ou riche en nutriments, déplété en fer), à différentes températures (15, 20, 25°C), en présence d'antibiotique (polymyxine, mitomycine, quinolinone) et en présence d'un phage virulent. Pour ce faire, les *Vibrio* seront cultivés dans des plaques de 96 puits, et le surnageant sera récupéré après centrifugation. Les vésicules seront quantifiées à l'aide d'un intercalant lipidique fluorescent au moyen d'un lecteur de plaques à fluorescence. Les résultats les plus contrastés d'absence et hyper vésiculation seront confirmés par i) purifiées des vésicules par ultracentrifugation ; ii) dosage des lipopolysaccharides et des protéines ; iii) visualisation en microscopie à force atomique. Cette approche a été utilisée avec succès dans le laboratoire de Dre Duperthuy, pour étudier les mécanismes moléculaires de vésiculation chez d'autres espèces de *Vibrio*. L'origine et les conséquences de la vésiculation, en lien avec l'infection par les phages, seront étudiés au cours d'un stage de **maitrise** puis d'un **doctorat** *i.e.* déterminisme génétique de la vésiculation (génomique comparative et/ou transcriptomique), type de vésicules produites (biochimie, microscopie), portage de récepteur de phage (MS, génétique), effet anti-phage, élargissement du spectre d'hôte.



Résumé graphique. Chez les bactéries à Gram- (e.g. les vibrios) les vésicules membranaires sont produites par deux mécanismes. **1- Le bourgeonnement de la membrane externe** (Outer membrane blebbing) produit des vésicules composées uniquement de membrane externe (Outer Membrane vesicles, OMV), sans contenu cytoplasmique. Il résulte d'une déstabilisation de la membrane externe (OM) et de son interaction avec le peptidoglycane (PG). Ce mécanisme dépend du génotype et peut être induits par des facteurs environnementaux, parmi lesquels nous testerons la température, la limitation en fer et le traitement par un peptide antimicrobien cationique, la polymyxine, en raison de leur pertinence pour notre modèle de bactérien. **2- La lyse cellulaire** (Explosive cell lysis) produit des vésicules composées uniquement de membrane externe (Explosive Outer Membrane vesicles, EOMV) ou des vésicules composées de membrane externe et interne (Outer-Inner Membrane vesicles, OIMV), toutes deux contenant potentiellement du matériel cytoplasmique (protéine, ADN, petites molécules). La lyse cellulaire résulte de l'action d'antibiotiques (Quinolone, Mitomycine) capables d'induire des altérations de l'ADN, la réponse SOS, l'induction de prophage et/ou d'endolysines. Cette lyse cellulaire est aussi provoquée lors de l'infection par un phage virulent au moment de la libération des particules virales. En conséquence la modulation de ce type de vésiculation implique le contexte génétique (e.g. présence de systèmes de défense anti-phage) et des facteurs environnementaux comme la présence de certains antibiotiques ou de phages. **Concernant la question centrale** du rôle des vésicules dans le contrôle des interactions phage-bactérie, les trois types de vésicules, OMV, EOMV et OIMV peuvent potentiellement exposer à leur surface le récepteur d'un phage et conduire à la titration de celui-ci (decoy). De plus, les OIMVs peuvent être utilisées comme modèle pour disséquer non seulement le mécanisme d'adsorption du phage mais aussi d'injection de son génome dans le cytoplasme, étape méconnue du cycle biologique. Enfin, dans une communauté microbienne, les OIMVs peuvent fusionner avec une cellule bactérienne n'exprimant pas ce récepteur et la convertir en un hôte sensible, porteuse du dit récepteur. Ce mécanisme permet alors une expansion du spectre d'hôte du phage.

Bibliographies de référence

Tyofuku et al. 2019. Types and origins of bacterial membrane vesicles. 2019. Nature Reviews Microbiology.

Luthe et al. 2023. Bacterial multicellular behavior in antiviral defense. Current Opinion in Microbiology.

Reyes-Robles et al. 2018 *Vibrio cholerae* Outer Membrane Vesicles Inhibit Bacteriophage Infection. Journal of Bacteriology.

Piel et al. 2022. Phage-host coevolution in natural populations. Nature Microbiology.