

Inhiber pour mieux régner

Les systèmes anti-bactériens d'*Acinetobacter baumannii*

Quentin Boussau, Estée Grandidier, Yazid Makmani

École normale supérieure de Lyon,
Département de biologie, Master biologie,
Lyon, France.

quentin.boussau@ens-lyon.fr

estee.grandidier@ens-lyon.fr

yazid.makmani@ens-lyon.fr

► Les systèmes d'inhibition de croissance contact-dépendants (CDI) sont des armes mises en place par de nombreuses bactéries Gram négatives pour attaquer d'autres bactéries compétitrices [1]. Ils sont composés de trois protéines : CdiA, CdiI et CdiB. CdiA est composée d'une partie N-terminale conservée, d'un domaine de liaison à un récepteur et d'un effecteur toxique dans sa partie C-terminale (CT). CdiI, quant à elle, est l'antitoxine de CdiA-CT [1]. Les deux molécules associées sont donc inactives. Enfin, CdiB est une protéine transmembranaire jouant le rôle de transporteur pour la toxine CdiA-CT vers la bactérie cible [2]. CdiB est ainsi assimilé à un système de sécrétion de type Vb [3]. L'ensemble des protéines produites par ces systèmes sont notées CdiABI.

Parmi les bactéries Gram négatives multi-résistantes, *Acinetobacter baumannii* est devenue un problème sanitaire récurrent en étant à l'origine de nombreuses infections nosocomiales. L'étude des mécanismes impliqués dans ces infections est donc primordiale.

Roussin *et al.* s'intéressent à cette bactérie dans une étude du journal *Frontiers in Microbiology*, parue en 2019 [4]. Les auteurs ont identifié deux systèmes d'inhibition de croissance contact-dépendant (CDI) chez *Acinetobacter baumannii*, réduisant la formation de biofilms et l'adhérence sur la cellule cible des bactéries environnantes.

***Acinetobacter baumannii* possède deux CDI différents**

Par une approche bioinformatique de comparaison de séquences génomiques, Roussin *et al.* ont découvert deux CDI présents

dans le génome de la souche DSM30011 d'*A. baumannii*, appelés Cdi₁ et Cdi₂. Ils ont ensuite cherché à savoir si ces deux paires de toxines-antitoxines étaient interchangeable, c'est-à-dire si l'antitoxine CdiI₁ pouvait inhiber la toxine CdiA₂ et inversement. Pour cela, Roussin *et al.* ont transformé une souche d'*Escherichia coli* n'exprimant aucun CDI avec des plasmides permettant l'expression des différentes combinaisons possibles de couples toxines-antitoxines. Les bactéries *E. coli* exprimant la toxine CdiA₁-CT ou la toxine CdiA₂-CT montrent bien une inhibition de croissance, indiquant l'effet toxique de ces toxines. Seule l'antitoxine CdiI₁ restaure une croissance normale chez les bactéries exprimant CdiA₁-CT et seule CdiI₂ chez les bactéries exprimant CdiA₂-CT, démontrant que les deux paires de toxines-antitoxines ne sont pas interchangeables.

Les CdiA ont un effet toxique lorsqu'ils sont exprimés chez *E. coli* et jouent un rôle primordial dans la compétition bactérienne

La protéine CdiA₂ possède sur sa partie C-terminale (CT) un domaine similaire à une endonucléase, c'est-à-dire une enzyme dégradant l'ADN. Afin de vérifier que ce domaine a bien une activité endonucléasique, les chercheurs l'ont exprimé dans une bactérie modèle, *E. coli*, puis ont suivi en temps réel l'état du nucléoïde (ensemble du matériel génétique de la bactérie). Pour cela, ils ont visualisé l'ADN grâce à la microscopie à fluorescence en utilisant des bactéries exprimant des protéines HU, similaires aux histones eucaryotes, fusionnées avec une protéine fluorescente rouge.

Ils observent alors que l'expression du gène codant CdiA₂-CT chez *E. coli* induit une désorganisation du nucléoïde, puis une filamentation, conséquence de l'arrêt des divisions cellulaires. Cette désorganisation n'est pas observée si CdiI₂, l'inhibiteur spécifique, est lui aussi produit dans la bactérie. Par ailleurs, les auteurs observent la formation d'agrégats de RecA, une protéine connue pour polymériser en cas de dommages à l'ADN, lorsque CdiA₂ est produite seule, ce qui confirme le lien entre désorganisation du nucléoïde et dommages à l'ADN et renforce l'hypothèse d'une activité endonucléasique de CdiA₂.

CdiA₁-CT n'induit quant à elle aucun dommage à l'ADN. En revanche, les auteurs ont mis en évidence une inhibition de la division bactérienne lorsque la toxine est exprimée chez *E. coli*. Les bactéries produisant CdiA₁-CT seule sont en effet 25 % plus grandes que celles exprimant CdiA₁-CT et CdiI₁, et ne se divisent quasiment pas, contrairement aux bactéries sauvages qui se divisent généralement 4 fois plus.

Ainsi, ces deux toxines ont un effet antibactérien, soit par l'induction de dommages à l'ADN (CdiA₂), soit par inhibition de la division des bactéries (CdiA₁).

Les auteurs ont ensuite étudié l'action de ces systèmes lors d'expériences de compétitions *in vivo*. En conditions de laboratoire, les gènes du locus CDI₁ (région du chromosome comprenant le gène *cdiI*, c'est-à-dire permettant l'expression de l'ensemble des protéines CdiABI) s'expriment fortement alors que les gènes du locus CDI₂ s'expriment très peu. Cette différence d'expression pourrait être expliquée par la présence, dans la région

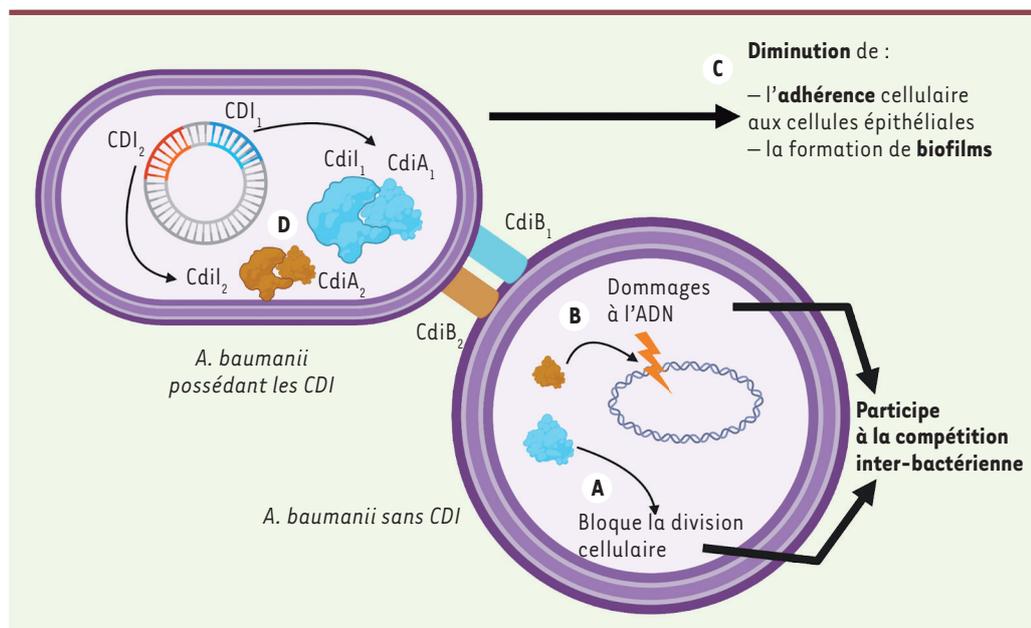


Figure 1. Effet des CDI d'*Acinetobacter baumannii* lors d'une compétition contact-dépendante. **A.** La sécrétion de CdiA₁-CT à travers CdiB₁ bloque la division de la bactérie ciblée sans induire de dommages à l'ADN. **B.** La sécrétion de CdiA₂-CT à travers CdiB₂ provoque des dommages à l'ADN. **C.** L'expression de ces gènes provoque une diminution de la formation de biofilms et de l'adhérence aux cellules épithéliales. **D.** La présence de CdiI₁ et CdiI₂

dans la bactérie émettrice la protège en cas d'attaque par une autre *A. baumannii* possédant le système et la protège de ses propres protéines.

promotrice de CdiB₂, d'une boîte pho (à l'origine d'un mécanisme de régulation des gènes en fonction de la présence de phosphate), suggérant que son expression pourrait être régulée par la concentration en phosphate du milieu comme cela a déjà été observé chez *Pseudomonas aeruginosa* [5]. Le reste des expériences porte sur CDI₁, qui est facilement observable en conditions de laboratoire.

Pour caractériser le fonctionnement *in vivo* de ce CDI, deux expériences de compétition inter-bactérienne ont été comparées. Des bactéries *A. baumannii* sans CDI₁ mais portant une cassette de résistance à la kanamycine ont été mises en compétition soit avec les bactéries d'une souche dont le CDI₁ est actif, soit avec les bactéries d'une souche dont le CDI₁ a été délété. Après quelques heures d'incubation, les bactéries sont placées sur milieu contenant de la kanamycine : seule la souche ayant la cassette se développe, et ce d'autant mieux que la compétition avec les souches sans cassette a été faible.

Le résultat obtenu montre que les bactéries de la souche avec cassette survivent 10 fois plus quand elles ont été incubées en présence des bactéries de la souche au CDI₁ délété. Les souches mutantes

sont bien viables, montrant ainsi les différences de viabilité entre les deux expériences ne sont dues qu'à la compétition bactérienne. Par conséquent, les auteurs concluent que le locus CDI₁ est impliqué dans la compétition bactérienne *in vivo* chez *A. baumannii*. Les auteurs se sont ensuite intéressés à la virulence des souches ayant ces CDI.

Les CdiA semblent diminuer la formation de biofilms ainsi que les capacités d'adhérence d'*Acinetobacter Baumannii*

Roussin *et al.* se sont alors demandés quel était le rôle de ce système dans la virulence d'*A. Baumannii*. Les protéines CdiA produites par différentes bactéries pathogènes étant connues pour leur rôle dans la formation de biofilms bactériens [6], les auteurs se sont intéressés à la formation de biofilms par *A. Baumannii* exprimant ou non CDI₁. Ils ont alors observé que les bactéries *A. baumannii* au CDI₁ délété formaient significativement plus de biofilms par rapport aux bactéries sauvages. Ce système semble donc agir différemment chez *A. baumannii* !

De plus, ces protéines CdiA sont aussi connues pour leur rôle dans l'adhérence

bactérienne aux cellules épithéliales [6]. Les auteurs ont donc analysé le pourcentage d'adhérence de bactéries exprimant ou non le CDI₁ par microscopie confocale. Étonnamment, les bactéries au CDI₁ délété ont une adhérence trois fois plus importante que la souche sauvage, indiquant que le CDI₁ de *A. baumannii* limite l'adhérence bactérienne.

Ainsi, les auteurs concluent que le locus CDI₁ présent chez *A. baumannii* ne promeut pas seulement la compétition bactérienne, mais qu'il diminue également la propension des bactéries à créer des biofilms et leur capacité à adhérer aux cellules épithéliales.

Conclusion et perspectives

Les deux CDI mis en évidence chez cette souche d'*A. baumannii* promeuvent tous deux la compétition bactérienne, mais chacun par un mécanisme différent. Pour CDI₁, le domaine C-terminal de la toxine bloque la division cellulaire sans endommager l'ADN (Figure 1A). Selon les auteurs, plusieurs hypothèses permettraient d'expliquer cela : la toxine pourrait dégrader les ARNt ou les ARNr comme c'est le cas pour d'autres CdiA [7], ou dissiper la force proton-motrice, ce qui diminuerait la quantité

d'ATP disponible, comme c'est le cas pour le CdiA^{EC93} d'*E. coli* [8]. La toxine de CDI₂ cause quant à elle des dommages à l'ADN (Figure 1B). Les paires toxines-antitoxines des deux systèmes n'étant pas interchangeables, cela pourrait suggérer une origine différente pour chaque système.

Le CDI le plus exprimé chez *A. baumannii* DSM30011, CDI₁, diminue l'adhérence des bactéries aux cellules épithéliales et la formation de biofilms (Figure 1C), contrairement à d'autres CDI déjà connus [6]. Néanmoins, ces CDI sont connus pour être multifonctionnels et avoir une régulation complexe, et certaines de leurs fonctions restent probablement à découvrir. Cela pourrait expliquer les effets surprenants du CDI₁ de *A. baumannii* observés par Roussin *et al.*

De nouvelles pistes sont à explorer. Ainsi, il serait intéressant de comprendre quel est le rôle du système CDI dans le contexte d'une infection nosocomiale. Ce système est un modèle épithélial des voies respiratoires humaines qui permet-

trait d'observer l'infection en conditions similaires à celles *in vivo*, c'est-à-dire en présence de différentes cellules épithéliales et d'autres bactéries possiblement déjà présentes. En effet, connaître le rôle exact de CDI₁ lors d'une infection permettrait d'améliorer les traitements contre *A. baumannii*. Par ailleurs, comprendre quels paramètres de l'environnement sont susceptibles d'activer ces CDI, par exemple en plaçant les bactéries dans des milieux aux concentrations de phosphate différentes, rendrait l'expression de ces systèmes en laboratoire plus aisée. Cela permettrait d'élargir notre compréhension de ces derniers afin de saisir leurs fonctions et leur dynamique, et d'appréhender leur rôle complet chez les bactéries. ♦

Inhibit for ruling: *Acinetobacter baumannii* systems against bacteria

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

- Ikryannikova LN, Kurbatov LK, Gorokhovets NV, *et al.* Contact-dependent growth inhibition in bacteria: do not get too close! *Int J Mol Sci* 2020 ; 21 : 7990.
- Ruhe ZC, Subramanian P, Song K, *et al.* Programmed secretion arrest and receptor-triggered toxin export during antibacterial contact-dependent growth inhibition. *Cell* 2018 ; 175 : 921-33.
- Meuskens I, Saragliadis A, Leo JC, *et al.* Type V Secretion systems: an overview of passenger domain functions. *Front Microbiol* 2019 ; 10 : 1163.
- Roussin M, Rabariloelina S, Cluzeau L, *et al.* Identification of a contact-dependent growth inhibition (cdi) system that reduces biofilm formation and host cell adhesion of *Acinetobacter baumannii* DSM30011 Strain. *Front Microbiol* 2019 ; 10 : 2450.
- Faure LM, Llamas MA, Bastiaansen KC, *et al.* Phosphate starvation relayed by PhoB activates the expression of the *Pseudomonas aeruginosa* σ rel ECF factor and its target genes. *Microbiology* 2013 ; 159 : 1315-27.
- Garcia EC, Perault AI, Marlatt SA, *et al.* Interbacterial signaling via burkholderia contact-dependent growth inhibition system proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016 ; 113 : 8296-301.
- Willett JLE, Ruhe ZC, Goulding CW, *et al.* Contact-dependent growth inhibition (CDI) and CdiB/CdiA two-partner secretion proteins. *J Mol Biol* 2015 ; 427 : 3754-65.
- Aoki SK, Webb JS, Braaten BA, *et al.* Contact-dependent growth inhibition causes reversible metabolic downregulation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2009 ; 191 : 1777-86.



Avec m/s, vivez en direct
les progrès et débats
de la biologie et de la médecine

CHAQUE MOIS / AVEC LES ARTICLES DE RÉFÉRENCE DE M/S
CHAQUE JOUR / SUR WWW.MEDECINESCIENCES.ORG

Abonnez-vous sur
www.medecinesciences.org