

**FORMULAIRE STAGE Recherche-M2 BBSG  
(période de stage : du 8 janvier 2018 au 29 juin 2018)**

**Titre du stage :** Rôle d'une thiorédoxine atypique (Patrx2) dans la machinerie de sécrétion de type 6 chez *Pseudomonas aeruginosa*.

**Laboratoire (intitulé, adresse, site web) :**

Laboratoire d'ingénierie des systèmes macromoléculaire (LISM), CNRS -IMM,  
Campus Joseph Aiguier 13009 Marseille

**Equipe :** Perception de l'environnement et vie communautaire chez *Pseudomonas aeruginosa*  
**Maitre de stage :** Corinne Kreuzer  
**E-mail :** corinne.kreuzer@imm.cnrs.fr  
**Téléphone :** 04 91 16 44 53

**Descriptif du stage :**

La formation et la réduction des ponts disulfures dans les protéines sont des mécanismes essentiels à de nombreux processus cellulaires. Les thiol-disulfure oxydoréductases (TDORs) cytoplasmiques sont généralement des réducteurs de ponts disulfures, les plus connus sont les thiorédoxines, alors que les TDORs extra-cytoplasmique, vont former les ponts disulfures comme les deux enzymes DsbA (periplasmique) et DsbB (membranaire) (Disulfide bond A et B)<sup>1</sup>. En dehors des TDORs ubiquitaires qui ont une large gamme de substrats, des protéines ont été trouvées avec des caractères atypiques. En effet, le gène PA2694 code pour une thiorédoxine cytoplasmique atypique (Patrx2) chez *Pseudomonas aeruginosa* dont le site actif contient une séquence consensus particulière, "DsbA like" jamais observée chez les thiorédoxines cytoplasmiques.

**Patrx2** apparaît donc être la première protéine capable de former un pont disulfure dans le cytoplasme des bactéries. Nous avons déterminé la structure de cette protéine et caractérisé ses propriétés redox par spectroscopie RMN<sup>2</sup>. Nous avons également identifié les substrats de Patrx2 en utilisant une bibliothèque de fragments génomiques par double-hybride bactérien. La protéine Hcp1, composant de la machinerie de sécrétion de type VI (H1-T6SS), ainsi qu'un effecteur **Tse1**, ont été trouvés comme partenaires de Patrx2. Tse1 est une amidase, injectée dans le périplasma de la cellule hôte bactérienne où elle hydrolyse le peptidoglycane et lyse les cellules<sup>3,4</sup>. Tse1 a 6 cystéines dans sa séquence et un pont disulfure qui relie les deux extrémités de la protéine. Par des études RMN et des expériences de compétition bactérienne, nous avons montré que Patrx2 influence non seulement l'état d'oxydoréduction de Tse1 dans le cytoplasme de la bactérie, mais également sur sa sécrétion ainsi que celle des autres effecteurs du système de sécrétion H1-T6SS via la protéine Hcp1.

Il nous faut maintenant définir par quel mécanisme moléculaire, cette thiorédoxine influe sur la machinerie de sécrétion de type 6. Le stage portera donc sur l'identification des interactions de Patrx2 avec les composés de la machinerie H1-T6SS grâce à différentes approches : interaction protéine-protéine par RMN, double hybride bactérien, pulldown *in vivo*, RMN in-cell ...

Nous rechercherons également le partenaire redox de Patrx2, grâce à une analyse systématique par bioinformatique et par double hybride bactérien des membres de la famille "DsbB like" avec une topologie inversée (cystéines catalytiques dans le cytoplasme)<sup>5</sup>.

Ces études nous permettront de définir une nouvelle voie de régulation de la sécrétion du système H1-T6SS mais également une voie inverse de transfert d'électron chez *Pseudomonas aeruginosa*.

1. Shouldice, S. R.; Cho, S. H.; Boyd, D.; Heras, B.; Eser, M.; Beckwith, J.; Riggs, P.; Martin, J. L.; Berkmen, M., In vivo oxidative protein folding can be facilitated by oxidation-reduction cycling. *Mol Microbiol* **2010**, *75* (1), 13-28.

2. Garcin, E. B.; Bornet, O.; Elantak, L.; Nouailler, M.; Guerlesquin, F.; Sebban-Kreuzer, C., <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N backbone and side-chain chemical shift assignments for reduced unusual thiorédoxin Patrx2 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomol NMR Assign* **2014**, *8* (2), 247-50.

3. Hood, R. D.; Singh, P.; Hsu, F.; Güvener, T.; Carl, M. A.; Trinidad, R. R.; Silverman, J. M.; Ohlson, B. B.; Hicks, K. G.; Plemel, R. L.; Li, M.; Schwarz, S.; Wang, W. Y.; Merz, A. J.; Goodlett, D. R.; Mougous, J. D., A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host Microbe* **2010**, *7* (1), 25-37.
4. Chou, S.; Bui, N. K.; Russell, A. B.; Lexa, K. W.; Gardiner, T. E.; LeRoux, M.; Vollmer, W.; Mougous, J. D., Structure of a peptidoglycan amidase effector targeted to Gram-negative bacteria by the type VI secretion system. *Cell Rep* **2012**, *1* (6), 656-64.
5. Hatahet, F.; Ruddock, L. W., Topological plasticity of enzymes involved in disulfide bond formation allows catalysis in either the periplasm or the cytoplasm. *J Mol Biol* **2013**, *425* (18), 3268-76.