

## RcsF, sentinelle hyperconnectée de l'enveloppe bactérienne

Neo Debouvere<sup>1\*</sup>, Ana Martinez Calvo<sup>1\*</sup>, Lara Ouaked<sup>1\*</sup>, Alice Pontet<sup>1\*</sup>, Laurent Aussel<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Master 2 Microbiologie intégrative et Fondamentale, Aix Marseille Université, Marseille, France.

<sup>2</sup>Aix Marseille Université, CNRS, LCB UMR7283, IMM, Marseille, France.

[neo.debouvere@etu.univ-amu.fr](mailto:neo.debouvere@etu.univ-amu.fr)

[ana.martinez-calvo@etu.univ-amu.fr](mailto:ana.martinez-calvo@etu.univ-amu.fr)

[lara.ouaked@etu.univ-amu.fr](mailto:lara.ouaked@etu.univ-amu.fr)

[alice.pontet@etu.univ-amu.fr](mailto:alice.pontet@etu.univ-amu.fr)

[aussel@imm.cnrs.fr](mailto:aussel@imm.cnrs.fr)

\*Ces quatre auteurs ont contribué de façon égale au travail

> Hans Christian Gram, bactériologiste danois, a mis au point en 1884 une technique de coloration révolutionnaire, permettant de classer les bactéries selon les propriétés de leur enveloppe [1]. Les bactéries Gram négatives, aussi appelées didermes, possèdent une enveloppe composée de deux membranes séparées par une paroi composée majoritairement de peptidoglycane (PG). Cette paroi est essentielle pour maintenir la forme cellulaire des micro-organismes et les protéger contre la pression osmotique [1]. Elle peut être la cible de certains antibiotiques comme les  $\beta$ -lactamines, qui inhibent la synthèse du PG, ce qui compromet l'intégrité de l'enveloppe et la viabilité cellulaire. En réponse à la pression exercée par les antibiotiques, les bactéries ont développé, par mutations ou transfert de gènes, un large éventail de mécanismes de défense, à l'origine d'une résistance à ces antibiotiques. Ces mécanismes favorisent une réponse rapide des bactéries tout en préservant l'intégrité de leur enveloppe. Ainsi, les traitements antibiotiques se révèlent de moins en moins efficaces, (→) Voir *m/s* n° 11, 2010, page 895 créant un grave problème de santé publique [2] (→). Comprendre le fonctionnement de l'enveloppe bactérienne à l'échelle moléculaire est donc indispensable pour décrire les réponses adaptatives des bactéries pathogènes à leur environnement et ainsi concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques, contournant cette antibiorésistance.

Lorsqu'un stress est perçu au niveau de l'enveloppe, comme une altération

de la biogenèse ou de la structure du PG ou des lipopolysaccharides (LPS), le système Régulateur de la Synthèse de la Capsule (Rcs) est activé. La protéine senseur RcsF détecte ce stress et initie une cascade régulatrice impliquant la protéine de membrane interne IgaA et l'ensemble du système Rcs (Figure 1), permettant une réponse cellulaire adaptée [3]. Bien que les stimuli environnementaux et les changements physiologiques en lien avec le système Rcs soient caractérisés, les mécanismes moléculaires d'activation de RcsF et de transduction du signal restent à élucider. Cette nouvelle regroupe les travaux de l'équipe de Jean-François Collet, qui étudie l'ensemble du système Rcs chez la bactérie modèle *Escherichia coli*, de la perception du signal à sa transduction jusqu'à la mise en place de la réponse adaptative [3].

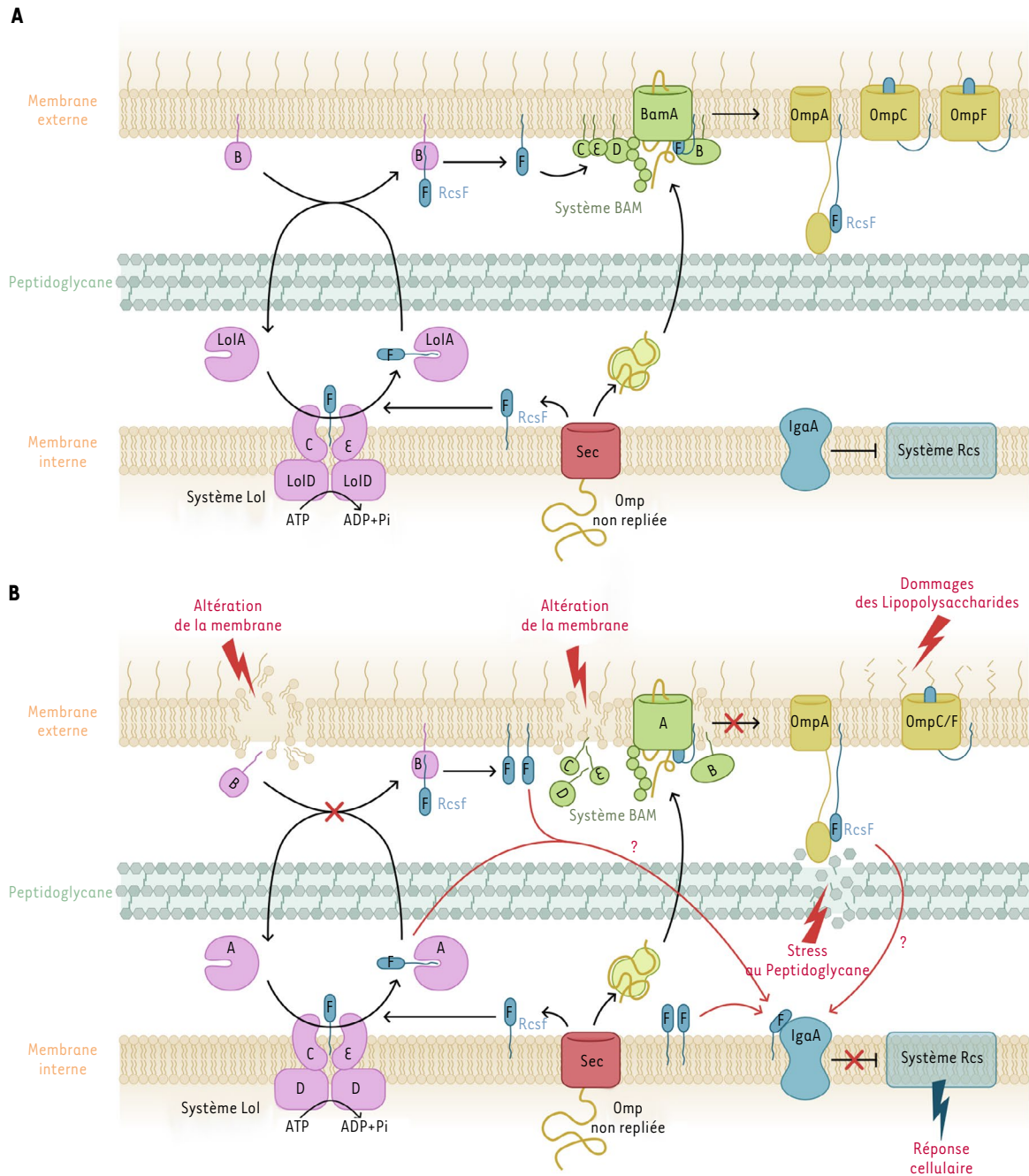
### La voie Lol : un prérequis pour la fonction de RcsF

Pour comprendre le rôle de RcsF dans la détection de dommages de l'enveloppe bactérienne, il faut d'abord suivre son export depuis la membrane interne jusqu'à la membrane externe, où elle s'associe aux protéines de membrane externe (OMPs). RcsF est une lipoprotéine composée de trois domaines : une ancre lipidique en N-terminal qui positionne RcsF dans la membrane interne, un domaine globulaire en C-terminal et une région intrinsèquement désordonnée (IDR) (Figure 2). Par des expériences de délétion et substitution de l'IDR, il a été montré que sa taille et sa nature

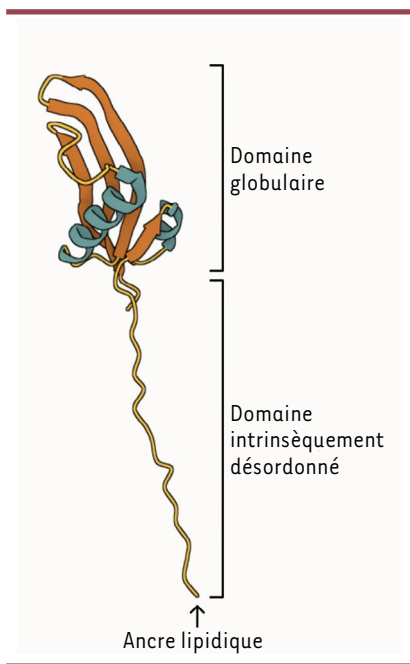
désordonnée étaient nécessaires pour un export efficace, indépendamment de sa séquence [4]. Cette IDR est requise pour la prise en charge de RcsF par le système de localisation des lipoprotéines (Lol), qui permet le transport des lipoprotéines de la membrane interne vers la membrane externe. L'export se fait en trois étapes (Figure 1A) : le recrutement de la protéine au niveau de la membrane interne par le complexe LolCDE, l'export du périplasma vers la membrane externe par LolA, et la formation du complexe RcsF-LolB au niveau de la membrane externe [3]. Lorsqu'un stress au niveau de l'enveloppe empêche le recrutement de RcsF par LolA, RcsF s'accumule dans la membrane interne et peut interagir avec IgaA, l'inhibiteur du système Rcs [3]. Cette interaction lève l'inhibition et initie une cascade de phosphorylation avec RcsC et les autres protéines du système Rcs (Figure 1B). Ainsi, une altération de l'enveloppe peut impacter le fonctionnement du système Lol tout comme d'autres systèmes d'assemblage localisés dans l'enveloppe.

### RcsF et le complexe BAM : de l'assemblage membranaire à la détection du stress

Le bon fonctionnement du système Rcs implique d'autres systèmes d'assemblage tels que la machinerie d'assemblage des protéines formées de tonneaux  $\beta$  (BAM). RcsF est ainsi capable d'interagir de façon stable avec BamA, protéine du complexe BAM, comme démontré par des études de cristallographie aux rayons X [5]. La machinerie



**Figure 1. Une altération de l'enveloppe bactérienne d'*E. coli* perturbe les protéines de membrane et active le système Rcs. A.** Le système Sec transloque à travers la membrane interne les protéines destinées à la membrane externe, telles que les protéines de membrane externe (OMPs) et les lipoprotéines. Le système de localisation des lipoprotéines (Lol) assure l'export de la lipoprotéine RcsF vers la membrane externe. La machinerie d'assemblage des protéines formées de tonneaux  $\beta$  (BAM) replie et insère dans la membrane externe les OMPs, tout en les associant à RcsF. RcsF est enchâssée dans le tonneau  $\beta$  de OmpC et OmpF, et interagit avec le domaine globulaire d'OmpA. En absence de stress, IgaA interagit avec le système Régulateur de la Synthèse de la Capsule (Rcs) et inhibe son activité. **B.** Des stress à l'enveloppe tels qu'une perturbation de la biogenèse ou de la structure de la membrane externe ou des lipopolysaccharides perturbent le fonctionnement des systèmes Lol et BAM. Si RcsF n'est plus adressée à la membrane externe ou si elle n'est plus associée aux OMPs, elle interagit alors avec IgaA. Jusqu'à présent, les mécanismes moléculaires de la transition de l'interaction entre RcsF et les OMPs à celle de RcsF avec IgaA restent inconnus et sont représentés avec un « ? ». Une perturbation dans la synthèse du peptidoglycane déstabilise l'interaction entre OmpA et RcsF, interagissant alors avec IgaA. Cela lève l'inhibition du système Rcs, qui initie une réponse cellulaire : la synthèse de la capsule. Figure réalisée avec *Inkscape* (logiciel open source, <https://inkscape.org>).



**Figure 2. Organisation structurale de la lipoprotéine RcsF chez *E. coli*.** RcsF est une lipoprotéine composée de trois domaines : une ancre lipidique en N-terminal, un domaine globulaire en C-terminal et une région intrinsèquement désordonnée (IDR). Le domaine globulaire de RcsF assure les interactions avec ses partenaires. Sa région intrinsèquement désordonnée participe à sa prise en charge par le système de localisation des lipoprotéines (Lol), et son adressage à la membrane externe. Une ancre lipidique est présente à l'extrémité de la région désordonnée. Figure réalisée avec *Inkscape* (logiciel open source, <https://inkscape.org>) et *Mol\** (logiciel open source, <https://molstar.org/>).

d'assemblage BAM, permettant d'insérer les OMPs dans la membrane externe, est composée de BamA. Cette protéine est constituée d'un domaine en tonneau  $\beta$  enchâssé dans la membrane externe et d'un domaine périplasmique. BamA interagit avec des substrats protéiques destinés à la membrane externe et les replie correctement sous forme de tonneaux  $\beta$ . Le tonneau  $\beta$  de BamA est le cœur du mécanisme de repliement des protéines, adoptant différentes conformations en fonction des substrats qu'il

reconnaît. Le domaine périplasmique de BamA reconnaît, lie et positionne les précurseurs des OMPs [6]. BamA agit en coopération avec les protéines BamB, BamC, BamD et BamE, formant le complexe Bam (BamBCDE) qui stabilise et facilite le repliement de ses substrats (Figure 1A). Il a été proposé que lors du repliement des OMPs, RcsF, insérée dans BamA, est transférée à la nouvelle OMP assemblée (Figure 1A), permettant ainsi l'exposition de RcsF à la surface cellulaire [3].

L'interaction BamA-RcsF correspond à un état de transition précédant l'assemblage de RcsF avec une OMP, comme démontré chez *E. coli* par la surproduction de BamA [3], qui empêche l'accumulation de RcsF dans le périplasm. Dans le périplasm, RcsF peut interagir avec IgaA, l'inhibiteur du système Rcs, levant la répression et déclenchant ainsi la réponse Rcs [3]. En cas de stress entraînant un dysfonctionnement de la machinerie BAM, suite à la perturbation de la biogénèse de la membrane externe par exemple, la capacité de BamA à transloquer RcsF et les OMPs dans la membrane externe est limitée, provoquant une accumulation de RcsF dans le périplasm (Figure 1B). Cette situation contraste avec l'état normal où RcsF est majoritairement associé aux OMPs et où IgaA inhibe la réponse Rcs. Cette interaction pose la question de la capacité de RcsF à détecter des formes de stress de l'enveloppe autres que le dysfonctionnement de la machinerie BAM.

#### La détection du stress membranaire via les OMPs

Des expériences de pontage chimique chez *E. coli* ont montré que trois OMPs (OmpA, OmpC et OmpF) pouvaient interagir avec RcsF. L'analyse des complexes protéiques pontés, par chromatographie en phase liquide à ultra-haute performance couplée à de la spectrométrie de masse (UPLC-MS), a montré que lorsque RcsF est associée avec OmpC ou OmpF, son IDR se trouve dans leur tonneau  $\beta$

(Figure 1A) [5,7]. En revanche, avec OmpA, pouvant adopter deux conformations, cette interaction diffère. La première se caractérise par un large tonneau  $\beta$  dans la membrane externe alors que la seconde, majoritaire chez *E. coli*, présente deux domaines : l'un globulaire et périplasmique se liant en partie au PG et l'autre sous forme d'un tonneau  $\beta$  plus étroit, ne permettant pas l'insertion d'une chaîne polypeptidique [8]. L'interaction entre OmpA et RcsF n'est observée que lorsque OmpA possède une conformation à deux domaines, les domaines globulaires des deux protéines se liant l'un à l'autre (Figure 1A), en maintenant le système Rcs sous forme inactive.

La localisation périplasmique de l'interaction entre OmpA et RcsF suggère une compétition entre OmpA et IgaA pour se lier à RcsF. Lorsque IgaA interagit avec RcsF dans le périplasm, le système Rcs est activé. Des expériences de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont confirmé que l'interaction RcsF-IgaA présente une forte affinité contrairement à celle entre RcsF et OmpA [8]. On retrouve 100 fois plus de copies d'OmpA que d'IgaA dans une cellule, ce qui rend la probabilité d'interaction RcsF-OmpA supérieure à celle de RcsF-IgaA et empêche l'activation du système Rcs [8]. Puisque OmpA interagit avec le PG, s'il est endommagé cela pourrait perturber l'interaction OmpA-RcsF, libérant RcsF. Cela permettrait ainsi l'interaction entre RcsF et son inhibiteur IgaA, entraînant l'activation de la cascade de phosphorylation du système Rcs (Figure 1B).

Dans le cas où RcsF se trouve dans le tonneau  $\beta$  d'autres OMPs, telles que OmpC et OmpF, la détection du stress membranaire par RcsF a lieu en amont de l'interaction, décrite comme irréversible, avec les tonneaux  $\beta$  (Figure 1A) [7]. L'incapacité de la machinerie BAM à assembler correctement OmpC/F serait le signal permettant à RcsF de se lier à IgaA et ainsi d'activer le phosphorelais (Figure 1B).

## Du modèle à la cible contre les pathogènes

L'intégrité de l'enveloppe est essentielle pour la viabilité cellulaire et nécessite des systèmes de contrôle comme Rcs pour la maintenir. Dans ce système, RcsF, exportée vers la membrane externe et intégrée dans différentes OMPs, possède une fonction de contrôle qualité des protéines et de la membrane, deux aspects perturbés lors d'un stress de l'enveloppe. Le phosphorelais Rcs et son senseur RcsF représentent plus qu'un simple mécanisme de défense d'*E. coli* : ils constituent un paradigme des stratégies d'adaptation bactérienne face au stress. La présence de systèmes homologues chez de nombreux pathogènes, comme des bactéries du genre *Klebsiella* ou *Salmonella* [9,10], renforce l'hypothèse de leur rôle dans la plasticité cellulaire, la virulence et

la tolérance aux stress antimicrobiens. Dans un contexte d'antibiorésistance, comprendre les mécanismes de reconnaissance et d'adaptation aux stress permettrait d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques afin de concevoir les antibiotiques de demain. ♦

### RcsF, hyperconnected sentinel of the bacterial envelope

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt.

#### RÉFÉRENCES

1. Rohde M. The gram-positive bacterial cell wall. *Microbiol Spectr* 2019 ; 7.
2. Gutmann L, Lortholary O. Coexister avec la résistance aux antibiotiques : une réalité internationale en 2010. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 895-6.
3. Cho SH, Szweczyk J, Pesavento C, et al. Detecting envelope stress by monitoring  $\beta$ -barrel assembly. *Cell* 2014 ; 159 : 1652-64.
4. El Rayes J, Szweczyk J, Deghelt M, et al. Disorder is a critical component of lipoprotein sorting in Gram-negative bacteria. *Nat Chem Biol* 2021 ; 17 : 1093-100.
5. Rodríguez-Alonso R, Létouart J, Nguyen VS, et al. Structural insight into the formation of lipoprotein- $\beta$ -barrel complexes. *Nat Chem Biol* 2020 ; 16 : 1019-25.
6. Csoma N, Machin JM, Whitehouse JM, et al. Molecular insights into how the motions of the  $\beta$ -barrel and POTRA domains of BamA are coupled for efficient function. *Nat Commun* 2025 ; 16 : 8832.
7. Konovalova A, Perlman DH, Cowles CE, et al. Transmembrane domain of surface-exposed outer membrane lipoprotein RcsF is threaded through the lumen of  $\beta$ -barrel proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014 ; 111 : E4350-8.
8. Dekoninck K, Létouart J, Laguri C, et al. Defining the function of OmpA in the Rcs stress response. *eLife* 2020 ; 9 : e60861.
9. Eriksson J, Eriksson OS, Maudsdotter L, et al. Characterization of motility and piliation in pathogenic *Neisseria*. *BMC Microbiol* 2015 ; 15 : 92.
10. Xu L, Li J, Wu W, et al. *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide: Mechanism in regulation of synthesis, virulence, and pathogenicity. *Virulence* 2024 ; 15 : 2439509.

### Entretien avec Jean-François Collet

Jean-François Collet est professeur à la Faculté de Médecine de l'Université Catholique de Louvain en Belgique. Il est directeur de l'Institut de Duve à Bruxelles où il est responsable d'une équipe de recherche. Il est également membre de l'Académie Royale de Médecine de Belgique depuis 2022, ainsi qu'investigateur au WEL Research Institute (WELRI) depuis 2011. Les travaux de recherche de son équipe se focalisent sur les mécanismes moléculaires permettant aux bactéries Gram négatives de détecter et s'adapter aux stress environnementaux, notamment les mécanismes de résistance au stress oxydant et le maintien de l'intégrité de l'enveloppe bactérienne.



© de Duve Institute

#### Quelles sont vos études en cours et quelle serait la suite de vos recherches sur le système Rcs ?

Nous essayons toujours de comprendre comment RcsF contrôle l'activité du complexe BAM. En 2014, nous avons montré qu'en l'absence d'interaction entre BamA et RcsF, cette dernière était conservée dans le périplasma où elle pouvait interagir avec IgaA au niveau de la membrane interne. La question qui restait en suspens était « Qu'est-ce qu'il va se passer au niveau de BAM quand un stress va bloquer l'interaction avec RcsF ? » Nous y réfléchissons encore et, en parallèle, on essaie de vérifier si les propriétés intrinsèques de la membrane externe, dans sa composition lipidique, ne va pas jouer un rôle sur la conformation de BAM. Et cet impact sur la conformation de BAM ne va-t-il pas empêcher l'interaction entre BamA et RcsF ? Au laboratoire, deux ou trois

personnes travaillent encore sur le système Rcs et les autres personnes travaillent sur d'autres sujets. On utilise aussi RcsF comme outil pour comprendre comment les lipoprotéines sont exportées vers la membrane externe. On connaît relativement bien le système Lol qui permet cet export, mais il reste des questions sur la sélection des lipoprotéines de membrane externe ou de membrane interne qui restent toujours sans réponse.

#### Quelles sont les limites technologiques que vous rencontrez actuellement dans vos recherches ?

Comme on « s'enfoncé » de plus en plus dans les détails du mécanisme, ce qui peut être limitant, c'est la complexité du mécanisme. C'est un peu comme quand des cordes sont entremêlées : il y a des nœuds et il faut les défaire. Ça peut être très compliqué, parfois même quasiment impossible. Peut-être que parfois, la technologie ne permet pas encore d'obtenir les résultats qui nous permettraient de descendre dans les détails des mécanismes. Nous sommes également un facteur limitant, avec notre cerveau : parce qu'il faut imaginer, il faut essayer de bien réfléchir, prendre en compte le mieux possible les données. Puis, sur la base de ces données, émettre des hypothèses, les tester, ne pas être aveuglé par nos préconceptions. Et donc, le facteur humain peut aussi être une limite. Le temps enfin peut être une limite. On a publié le premier article en 2014, il y a déjà plus de 10 ans. Ce sont les limites auxquelles je pense aujourd'hui.

#### Qu'est-ce qui vous a fait choisir ce sujet d'étude par rapport à d'autres ?

C'est une bonne question dont la réponse est à la fois facile et difficile. Je vous répondrai que c'est l'intuition et la chance.



Pourquoi la chance ? Quand je suis rentré en Belgique après avoir fait un post-doctorat centré sur l'étude des ponts disulfures, j'ai lancé mon labo sur cette thématique, et ce sont les premiers articles que l'on a publiés. Pendant ce post-doc, j'ai rencontré une chercheuse américaine avec qui j'ai gardé contact. Je lui avais recommandé un laboratoire où travailler pendant un séjour qu'elle devait faire à l'université de Princeton et là-bas, elle a travaillé sur RcsF. À la fin de son séjour, elle m'a recontacté pour me proposer de reprendre son projet parce qu'elle avait découvert que RcsF possédait des ponts disulfure. Elle m'a expliqué que ce sujet n'intéressait pas son directeur de labo et qu'elle n'allait pas publier dessus. J'ai accepté, elle m'a transmis quelques résultats préliminaires et j'ai confié le projet à une technicienne de mon laboratoire. De fil en aiguille, on a déterminé la structure et publié un article en 2011. Au même moment, un nouveau post-doctorant est arrivé au laboratoire, Seung Hyun Cho, qui allait devenir le premier auteur de l'article dans *Cell*. Il a vu qu'on travaillait sur la formation des ponts disulfures de RcsF et il est venu me voir en me disant : « Cette protéine a l'air vraiment intéressante, elle ressemble à un senseur de stress dans l'enveloppe et on ne sait pas comment elle fonctionne. Est-ce que tu serais d'accord pour que je commence à m'y intéresser ? » Je lui ai répondu : « Oui, c'est génial, c'est une super question. » De là est venue l'intuition. On a commencé à travailler sur cette question et assez vite, on a trouvé une interaction avec le système BAM. Deux ans après sortait l'article dans *Cell* et maintenant, on travaille toujours dessus.

#### **Avez-vous déjà travaillé sur des sujets plus appliqués sur le système Rcs ?**

Nous travaillons sur des sujets plus appliqués au laboratoire, en lien avec l'enveloppe bactérienne. Nous avons mis au point des souches permettant de cribler de nouveaux antibiotiques en nous intéressant au système Rcs. C'est donc une application concrète. D'autre part, nous nous sommes aussi intéressés à la production de protéines recombinantes et de plasmides en lien avec le stress et l'intégrité de l'enveloppe, mais pas spécifiquement avec le système Rcs.

#### **Est-ce que votre équipe collabore avec des laboratoires qui développent des antibiotiques ?**

Oui, nous faisons partie d'un réseau financé par la Commission européenne qui s'appelle « *Breakthrough* ». Ensemble, nous essayons de trouver des moyens de perturber l'intégrité de l'enveloppe bactérienne en utilisant par exemple de nouveaux antibiotiques. A côté de ça, nous sommes en contact avec plusieurs firmes pharmaceutiques actives dans ce domaine. Il y a enfin un cours « ICARE » organisé à Annecy tous les ans. C'est l'un

des meilleurs cours au monde pour la recherche de nouveaux antibiotiques. J'ai la chance de pouvoir y intervenir chaque année et ça me permet de rencontrer de nombreux acteurs de ce domaine.

#### **Est-ce que vous utilisez l'intelligence artificielle dans vos expériences et dans la vie au laboratoire ?**

Un peu comme tout le monde. S'en priver, ce serait se tirer une balle dans le pied. Maintenant évidemment, c'est nous qui sommes responsables. Donc on ne peut pas tout déléguer à ChatGPT ou Perplexity. C'est notre créativité, c'est notre responsabilité scientifique, notre esprit critique. J'ai fait l'exercice par exemple avec un projet du laboratoire : un gène et une protéine associée sur laquelle nous travaillons depuis des années. Nous avions une liste de résultats, une table de phénotypes et une idée de la fonction de cette protéine. Mais cette idée avait germé après des mois de réflexion. J'ai introduit la liste des phénotypes dans une IA et je lui ai demandé « Qu'en penses-tu ? Quelle va être la fonction potentielle de cette protéine ? » Elle nous a proposé deux ou trois fonctions, dont celle que l'on suspectait et qui est la vraie fonction. Désormais, nous avons pu obtenir la preuve de ça, vous voyez ? À l'avenir, si je me retrouve confronté à un problème similaire avec une succession de phénotypes d'observation, j'irai beaucoup plus rapidement demander l'avis d'une IA. Ce serait un peu stupide de ne pas le faire si l'outil est disponible. Après, c'est chacun, chacune, qui reste responsable de sa recherche et on ne peut pas déléguer notre responsabilité à l'intelligence artificielle.

#### **Est-ce que vous pouvez parler de WELRI et quels sont ses objectifs ?**

Le WEL Research Institute (WELRI), fondé vers 2010-2011 côté francophone de la Belgique, a sauvé mon laboratoire. Il est inspiré du VIB (Vlaams Instituut voor Biotechnologie) flamand, un institut d'excellence soutenant la recherche fondamentale tout en valorisant les brevets et startups. Le WELRI soutient la recherche fondamentale de pointe et sa valorisation. Cela fait 15 ans que cet organisme me soutient avec des financements importants, me permettant de garder des chercheurs expérimentés. C'est un rôle stimulant : tous les 3 mois, je rencontre la directrice pour discuter de nos découvertes et des possibilités de valorisation. Grâce au WELRI, nous avons été mis en contact avec la société japonaise Kaneka (propriétaire d'Eurogentec en Belgique). En 2020, ils ont ouvert un laboratoire de recherche appliquée conjoint avec mon laboratoire et l'université de Louvain. Depuis 6 ans, nous travaillons ensemble à l'optimisation des bactéries pour la production de protéines recombinantes, d'anticorps et de plasmides. Cette collaboration, qui évoluera au printemps, a été très enrichissante pour mon laboratoire.