

DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **16 juillet 2025**

Nom de famille et prénom de l'auteur. e : **Madame Lison CANCADE--VEYRE**

Titre de la thèse : Caractérisation biochimique et fonctionnelle de deux effecteurs de *Brucella abortus* : NyxA et NyxB

Résumé



Un aspect clé de la pathogénicité de *Brucella* est sa capacité à se multiplier dans les cellules de l'hôte, facilitée par un système de sécrétion qui libère des protéines effectrices dans les cellules hôtes. Ces protéines contribuent à moduler les fonctions cellulaires et à maintenir le compartiment intracellulaire de la bactérie, favorisant ainsi sa multiplication. Dans ce projet, nous nous sommes concentrés sur deux effecteurs récemment identifiés chez *B. abortus* : NyxA et NyxB. Les effecteurs NyxA et NyxB présentent une identité de séquence de plus de 80 % et ciblent les mêmes compartiments cytoplasmiques et nucléaires lors de l'infection. Des approches biochimiques ont permis d'identifier la dé-SUMOylase SENP3 comme leur cible cellulaire. Bien que SENP3 soit localisée dans un compartiment nucléaire spécifique, le nucléole, en présence des effecteurs Nyx, elle est délocalisée et recrutée dans des structures nucléaires ponctuelles. D'autres protéines nucléolaires, telles que NVL et RPL5, sont également délocalisées, suggérant qu'une forte réponse au stress nucléolaire est déclenchée au cours de l'infection. Cependant, la fonction de ces effecteurs reste inconnue, et de nombreuses questions doivent encore être abordées : Comment atteignent-ils le noyau ? Quel est l'impact de leur localisation nucléaire sur les fonctions cellulaires ? Au cours de ma thèse, j'ai tenté de répondre à ces questions, avec pour objectif de comprendre le rôle de NyxA et NyxB. Le premier axe de mes recherches s'est articulé autour de l'étude structurale des effecteurs Nyx. Pour mieux comprendre leur fonction, leurs structures ont été étudiées, et la structure cristalline de NyxB a été résolue à 2,5 Å et celle de NyxA a été obtenue par homologie. Des analyses par SEC-MALS ont révélé que NyxA et NyxB forment des dimères en solution. Mon premier objectif était donc de déterminer si la dimérisation était

essentielle à leur fonction. Pour cela, j'ai généré plusieurs mutants au niveau de l'interface de dimérisation afin de stabiliser la forme monomérique. Mes résultats ont montré qu'en présence de NyxA ou NyxB monomériques, SENP3 était moins délocalisée du nucléole, bien que les deux effecteurs interagissent toujours avec SENP3. Cela démontre que la dimérisation est cruciale pour la fonction des Nyx lors de l'infection. Le deuxième axe de recherche a porté sur l'élucidation de la fonction de ces effecteurs. Les résultats préliminaires obtenus lors de mon stage de Master 2 ont révélé que NyxA et NyxB étaient présents dans la fraction chromatiniennne, suggérant des interactions potentielles avec l'ADN. Des expériences *in vitro* menées par A. Blanco ont confirmé que les protéines NyxA et NyxB purifiées se lient à l'ADN. En combinant des méthodes d'extraction *in vitro* et des approches de microscopie, j'ai pu établir que Nyx et la chromatine font partie du même complexe. Une immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) a validé la liaison des Nyx à des séquences génomiques, et pour cartographier précisément ces sites, j'ai réalisé un ChIC/CUT&RUN. Le séquençage a identifié de multiples cibles, dont des acteurs clés de la voie WNT, impliquée dans le maintien des jonctions adhérentes et serrées. Ces résultats sont particulièrement intéressants, car ces composants sont essentiels à l'intégrité du placenta et des testicules, deux organes ciblés par Brucella lors de l'infection. J'ai confirmé que l'expression de NyxA et NyxB induit une augmentation significative des inhibiteurs de WNT et une diminution de la β -caténine, un effet également observé dans les cellules infectées. En conclusion, j'ai pu mettre en évidence un nouveau rôle des effecteurs Nyx de B. abortus dans la régulation des protéines d'adhérence et des jonctions serrées pendant l'infection, une cible majeure de l'infection par Brucella, qui pourrait contribuer à provoquer l'avortement et la stérilité.

Mots-clés : Brucella, Effecteurs, Caractérisation,