

Mieux comprendre l'infection bactérienne en couplant un AFM avec la microscopie de fluorescence

Coupling AFM and fluorescence microscopy to better understand the bacterial infection mechanism

CICZORA Yann^{1*}, JANEL Sébastien², WERKMEISTER Elisabeth² et LAFONT Frank^{1,2}

¹*Microbiologie et physique Cellulaire de l'infection, Lille, France*

²*BiolmagingCenter Lille, Lille, France*

La première étape de l'infection bactérienne est l'adhésion entre le pathogène et la cellule hôte. Puis vient l'étape de l'entrée de la bactérie dans la cellule. Découpler ces deux étapes permet de mieux comprendre les mécanismes mis en place lors de l'adhésion et de suivre les toutes premières étapes qui conduisent à l'activation des voies de signalisation. Nous avons développé une approche permettant d'étudier à la fois les interactions et la dynamique de la signalisation cellulaire lors de l'adhésion. Pour cela nous avons développé une nouvelle approche : la microscopie à force atomique axée sur la mesure de force et la fluorescence. (AFFM : **A**tomical-force-microscopy-driven **F**orce and **F**luorescence **M**easurement).

L'AFM est l'outil de choix lorsque l'on souhaite regarder de manière individuelle des interactions entre un récepteur et des ligands. En liant une bactérie sous le levier AFM nous pouvons caractériser les interactions entre la cellule hôte et le pathogène.

Nous utilisons des *Yersinia pseudotuberculosis*, qui sont des bactéries Gram positives. Nous avons étudié l'adhésion de ces bactéries sur des cellules HeLa en comparant des bactéries dans différentes conditions physiologiques de façon corrélée à leur capacité à infecter les cellules.

En couplant l'AFM avec de la microscopie à fluorescence (y.c. TIRF, PALM ou STED) on peut également suivre la réponse de la cellule (recrutement des marqueurs de voies de signalisation) dès le contact de la bactérie à la membrane plasmique.

Les domaines RAFT sont importants pour l'infection des *Yersinia pseudotuberculosis*. En utilisant des protéines présentes dans ces domaines, nous avons pu valider notre outil et suivre le recrutement de ces protéines au niveau du site d'entrée des bactéries. Nous montrons également que certains marqueurs des voies de signalisations cellulaires sont aussi très rapidement recrutés au niveau du site d'entrée.

L'approche permet donc de combiner des mesures de forces avec l'AFM avec une dimension spatio-temporelle de la dynamique fonctionnelle du recrutement de molécules de signalisation pendant l'étape d'adhésion. Ces informations jusque là inaccessibles permettent d'apporter un éclairage nouveau sur la compréhension des mécanismes de signalisation cellulaire initiés à la membrane plasmique.

The first step of bacterial infection is the contact between pathogens and host cells; only afterwards the bacteria enter into the cell. By decoupling these two steps one can better understand the mechanisms taking place during the adhesion and secondly, follow the cell signaling early events. To this aim, we have developed a new approach called **A**tomical-force-microscopy-driven **F**orce and **F**luorescence **M**easurement (AFFM).

Atomic force microscope (AFM) is a powerful tool to study ligand-receptor interactions. By attaching a bacterium to the AFM cantilever we can characterize the cell-host/pathogen interactions.

We use the Gram-negative bacterium *Yersinia pseudotuberculosis* as a model. We have studied adhesion of those bacteria to HeLa cells under several physiologic conditions and we have correlated it to their ability to infect cells.

By coupling AFM to fluorescence microscopies (TIRF, PALM or STED) we gain access to the direct visualization of cell response during the controlled contact of the bacteria to the cell plasma membrane.

RAFT domains are described to play an important role during *Yersinia pseudotuberculosis* infection. We have validated our procedure by following the recruitment of the proteins present in RAFT domain during adhesion. Using this approach, we identified several proteins that are recruited directly after contact and before the entry of the bacteria. Those results confirm that the contact between pathogens and cell-host is the key point where cell signaling is initiated.

AFFM combines the force measurement to a spatio-temporal dimension of the functional dynamic of recruitment of cell signaling molecules during the adhesion. The information provided by our study give a better knowledge on how cells signaling mechanisms take place during the infection.