

Marseille, 21 Novembre 2023

Rapport sur le manuscrit intitulé " Adaptation de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques ciblant FASII dans l'hôte et stratégies de potentialisation des activités antibiotiques " déposé par Paprapach WONGDONTREE en vue de l'obtention d'une Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay.

La thèse, présentée de manière classique, est rédigée en anglais avec une introduction générale d'une cinquantaine de pages. L'introduction commence par deux chapitres qui présentent brièvement la bactérie utilisée comme modèle d'étude, un pathogène humain opportuniste, *S. aureus*. Le troisième chapitre détaille le métabolisme des acides gras et des lipides chez *S. aureus*: les voies de biosynthèse, leur régulation et leur importance comme cible de traitements antibiotiques. Les mécanismes permettant à *S. aureus* de résister aux antibiotiques ciblant la voie de biosynthèse des acides gras de type II (FAII) sont également détaillés. Le quatrième et dernier chapitre de l'introduction questionne l'importance des acides lipotéichoïques pour l'intégrité de l'enveloppe des bactéries à Gram positif. Cette partie est destinée à être publiée sous la forme d'un article de revue. Le chapitre introductif est complet et donne un aperçu très clair de l'état de l'art. De l'abondante littérature sur le sujet, Paprapach WONGDONTREE a extrait la juste quantité d'informations permettant de comprendre clairement les enjeux liés à son sujet de thèse, et de conserver une lecture fluide. Les figures sont tirées d'articles de la bibliographie qui ont été parfaitement adaptées pour illustrer les concepts développés par Paprapach WONGDONTREE. Il s'agit principalement de schémas récapitulatifs, très clairs et pédagogiques.

L'objectif global de la thèse est clairement exposé dès le début du manuscrit et dans les encarts « Boîtes à idées 1 & 2 ». Il s'agit d'élucider et comprendre les mécanismes permettant à *S. aureus* de résister aux antibiotiques ciblant la voie FAII, sans qu'il y ait apparition de mutations génétiques. Cette étude a un intérêt médical puisqu'elle pourrait permettre de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques associant les anti-FASII à d'autres molécules empêchant l'adaptation de *S. aureus* aux anti-FASII.

Les résultats sont exposés sous la forme de deux articles de recherche que Paprapach WONGDONTREE signe en premier et co-premier auteur. L'un dont le titre est « Oxidative Stress is Intrinsic to Staphylococcal Adaptation to Fatty Acid Synthesis Antibiotics » est déposé dans bioRxiv et le second devrait l'être prochainement.

Dans le premier chapitre, Paprapach WONGDONTREE a développé une approche protéomique afin de comprendre comment, en présence de sérum et d'acides gras exogènes, *S. aureus* s'adapte aux antibiotiques ciblant les molécules anti-FASII. Dans ces conditions, lorsque *S. aureus* est traité avec un anti-FASII, un changement massif du protéome a été mis en évidence (la Table S1 correspondante n'est pas jointe au manuscrit, mais est disponible sur bioRxiv). Parmi les protéines dont la quantité est modifiée, Paprapach WONGDONTREE s'est focalisée sur trois catégories de protéines, les régulateurs, les facteurs de virulence et les protéines de réponse au stress.

Une analyse phosphoprotéomique a mis en évidence que profil de phosphorylation de 5 régulateurs est modifié lors de l'adaptation à l'anti-FASII. De façon intéressante, les simple mutants

délétés des gènes correspondants aux régulateurs XdrA et CshA présentent un retard dans leur adaptation à l'anti-FASII.

Concernant les facteurs de virulence, les résultats obtenus, par l'analyse protéomique, les tests d'adhésion et les mesures d'activités hydrolytiques, convergent pour suggérer qu'une conséquence inattendue de l'adaptation à l'anti-FASII pourrait être une diminution de la virulence. Cette conclusion est soutenue par les résultats montrant que dans les larves d'insectes le traitement par un anti-FASII n'éradique pas *S. aureus* mais diminue la virulence.

Parmi les protéines de résistance au stress, dont la quantité est augmentée dans les cellules adaptées à l'anti-FASII, plusieurs sont impliquées dans la lutte contre le stress oxydatif. En accord avec ce résultat, Paprapach WONGDONTREE montre que la population adaptée à l'anti-FASII est plus résistante à un stress H₂O₂. De plus, un prétraitement avec un agent générant un stress oxydatif permet à *S. aureus* de reprendre plus rapidement sa croissance en présence de l'anti-FASII. Paprapach WONGDONTREE a recherché les bases moléculaires de cet effet. Les résultats obtenus montrent que l'augmentation de l'incorporation d'acide gras exogènes, qui se produit lors de l'adaptation à l'anti-FASII, est un mécanisme contrôlé positivement par PerR, un régulateur de la réponse au stress oxydatif.

Dans le deuxième chapitre des résultats, Paprapach WONGDONTREE décrit un nouveau phénotype observé durant le processus d'adaptation aux anti-FASII, qui dépend de l'utilisation d'acides gras exogènes. En effet, par microscopie électronique en transmission, Paprapach WONGDONTREE montre que l'enveloppe de *S. aureus* est drastiquement affectée. De manière très intéressante, ceci corrèle avec l'absence d'acides lipotéichoïques, un polymère anionique ancré à un glycolipide dans la membrane de *S. aureus*, et avec une diminution de l'enzyme qui participe à la synthèse de cette ancre glycolipidique, UgtP. Ainsi, Paprapach WONGDONTREE met en évidence une interrelation complexe entre la voie FASII et la synthèse d'acides lipotéichoïques. Si le mécanisme moléculaire sous-jacent reste à déterminer, certaines hypothèses ont néanmoins été éliminées. De plus, ces résultats ont permis à Paprapach WONGDONTREE d'établir une première preuve de concept pour l'efficacité d'une bithérapie contre *S. aureus* en combinant anti-FASII et molécules agissant sur la membrane.

L'ensemble des résultats présentés montre clairement que l'objectif de la thèse a été atteint avec succès.

Dans les chapitres de discussion, grâce aux nombreux résultats obtenus, Paprapach WONGDONTREE décrit l'ampleur des changements qui se produisent lorsque *S. aureus* arrête de synthétiser des acides gras endogènes pour utiliser ceux exogènes. Paprapach WONGDONTREE souligne également les nouvelles questions soulevées par son travail et propose des pistes pour la suite à donner à ce travail.

Enfin, par une approche génétique, Paprapach WONGDONTREE a aussi exploré la connexion entre FASII et la synthèse des phospholipides. Ces résultats sont présentés en annexe, vraisemblablement parce qu'ils ne sont pas dans le droit fil de l'objectif premier de la thèse, mais ils restent néanmoins dans le cadre des études sur le métabolisme des acides gras et sont très complets. Ainsi, Paprapach WONGDONTREE a identifié des mutations gain de fonction chez *S. aureus* qui restaurent la croissance lorsque *plsX*, un gène considéré comme essentiel pour la synthèse des phospholipides et la croissance bactérienne, est délété. Les supprimeurs identifiés illustrent une flexibilité remarquable des enzymes FadF et FadM, lorsqu'une pression de sélection est imposée par

l'absence de Plx et d'acides gras exogènes. Outre la très belle histoire de génétique, ces résultats ouvrent de nouvelles stratégies d'antibiothérapie contre *S. aureus*.

Compte tenu de la quantité et de la qualité du travail de thèse de Paprapach WONGDONTREE, il sera sûrement valorisé par la publication de plusieurs articles d'importance dans le domaine. Je donne donc sans réserve un avis très favorable à la soutenance de la thèse de Paprapach WONGDONTREE.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'BPy', with a horizontal line underneath.

Béatrice Py
DR CNRS

Pr Karen Moreau
Centre International de Recherche en Infectiologie
INSERM U1111 – CNRS UMR5308
Equipe Pathogénie des Staphylocoques
Faculté de médecine Laennec
7 rue Guillaume Paradin
69008 LYON- France
Tél : +33 (0) 4 37 28 74 90
Email : karen.moreau@univ-lyon1.fr



**Report on the manuscript submitted by Miss Paprapach WONGDONTREE for the title of
Doctor from the university of Paris Saclay.**

Title of work: Staphylococcus aureus adaptation to FASII_ targeted antibiotics in host environments and strategies to potentiate antibiotic activities

Supervised by Dr Jamile ANBA-MONDOLONI and Dr Alexandra GRUSS at the MICALIS Institute

During her PhD, Miss WONDONGTREE focused on the metabolism of fatty acids making up the membrane of *Staphylococcus aureus* and more specifically on the adaptation of this bacterial species to molecules inhibiting the de novo fatty acid synthesis pathway, anti-FASII. *S. aureus* is a major pathogen responsible for numerous pathologies, of varying degrees of severity, and is associated with numerous cases of antibiotic resistance. New anti-staphylococcal strategies therefore need to be developed. The fatty acid synthesis pathway has emerged as a target of choice, but the use of anti-FASII molecules has proved ineffective due to the bacterium's ability to circumvent this inhibition by acquiring exogenous fatty acids. The aim of the work presented here is to gain a better understanding of the impact of these anti-FASII molecules on the physiology of *Staphylococcus aureus*.

The manuscript presented in English is very well structured and very pleasant to read, clearly demonstrating the candidate's level of scientific thought. The manuscript is divided into three main sections: a bibliography divided into four chapters presenting a summary of knowledge on the subject, experimental work presented in the form of two scientific articles, and finally a shorter section of general discussion and perspectives.

The first part of the manuscript, entitled "introduction", gives a state of the art of all aspects of the subject of study. This part is divided into four chapters dealing successively with increasingly specific and detailed areas directly related to Miss WONDONGTREE's subject of study. The first two chapters deal with general information on *S. aureus* as a pathogen, followed by a discussion of fatty acid and lipid metabolism in *S. aureus*, and ending with the role and importance of lipid techoic acids. This final chapter provides an interesting insight into the importance of LTAs in the physiology of *S. aureus*, as well as its ability to grow in the absence of LTAs through various adaptation mechanisms. Overall, this bibliographical introduction is very informative for understanding the subject under study. I particularly appreciated the precision of the data presented.

The second part of the manuscript is devoted to Miss WONDONGTREE's research work and takes the form of two scientific articles of which she is first author. These two articles are presented in an almost finalised form and are ready for submission, the first having already been deposited on bioRxiv.

In her first article, Ms WONDONGTREE focused on the adaptation of *S. aureus* to anti -FASII. It has previously been shown that in the presence of an inhibitor of the de novo fatty acid synthesis pathway, *S. aureus* can continue to grow by acquiring exogenous fatty acids present in the bacterial environment. This alternative pathway for acquiring fatty acids profoundly modifies the composition of the bacterial

wall. The question therefore arises as to how this adaptation impacts the physiology of *S. aureus*. Using 'omics' approaches, the work presented showed that adaptation to anti-FASII was not associated with genomic changes, but that there was a significant change in the proteome, with a reduction in the expression of virulence and adhesion factors and an increase in stress response factors, particularly oxidative stress. Interestingly, exposure to oxidative stress accelerated the incorporation of exogenous fatty acids and adaptation to anti-FASII. The manuscript concludes with the identification of a link between oxidative stress and the fatty acid synthesis pathway. This potential link and its consequences in an infectious context could be discussed in greater depth.

The second article explores the impact of anti-FASII on the composition of the bacterial membrane. It shows a complete depletion of lipoteichoic acid, compensated by an increase in cardiolipin and wall teichoic acid. The molecular mechanisms associated with this depletion have not been elucidated, but various hypotheses are put forward for discussion. It will be interesting to extend this discussion and see how these different hypotheses could be tested. The manuscript also explores a strategy of anti-microbial agents combining anti-FASII and anti-WTA and highlights a synergistic effect.

Finally, the manuscript concludes with a general conclusion and perspectives that take up in a pertinent manner the new questions arising from the results obtained. This shows the importance of the results obtained and the new avenues to be explored, both at a fundamental level, such as the link between oxidative stress and fatty acid synthesis, and at an application level, with the exploration of combinations of molecules targeting the synthesis of membrane components.

It is important to note that a third article, co-authored by Ms Wondongtree, is appended to the manuscript. This study appears to emanate from parallel work to the main subject of study. It explores the restoration of growth in *S. aureus* Δ plsX mutants in the absence of exogenous fatty acids and identifies two gain-of-function mutants involving the *fabM* and *fabF* genes. However, neither of these mutants is able to grow in the presence of anti-FASII, even in the presence of exogenous fatty acid. The authors therefore conclude that PlsX could be a target of choice for the development of new inhibitors to be combined with anti-FASII.

The work presented by Miss WONDONGTREE constitutes an original and important contribution to the mechanisms of resistance to anti-FASII and adaptation of the bacterium, and opens up many new avenues of study. Miss WONDONGTREE has accomplished a substantial amount of high-quality scientific work, which has resulted in three scientific articles that should be submitted shortly. In view of the quantity and quality of the work presented, I am issuing a favorable opinion for the oral defense with a view to obtaining a PhD from the University of Paris-Saclay.

Lyon, 30 november 2023

Pr Karen Moreau

A handwritten signature in black ink, reading 'Moreau', with a long horizontal line extending from the end of the name.