



HAL
open science

CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET STRUCTURALE DE BACTERIOCINES CIBLANT LE METABOLISME DU PEPTIDOGLYCANE BACTERIEN, ALTERNATIVE POTENTIELLE AUX ANTIBIOTIQUES.

Dimitri Cherier

► **To cite this version:**

Dimitri Cherier. CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET STRUCTURALE DE BACTERIOCINES CIBLANT LE METABOLISME DU PEPTIDOGLYCANE BACTERIEN, ALTERNATIVE POTENTIELLE AUX ANTIBIOTIQUES.. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris-Saclay, 2017. Français. NNT : 2017SACLS529 . tel-01828072

HAL Id: tel-01828072

<https://theses.hal.science/tel-01828072>

Submitted on 3 Jul 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Caractérisation biochimique et structurale de bactériocines ciblant le métabolisme du peptidoglycane bactérien, alternative potentielle aux antibiotiques.

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
Préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°569 : Innovation thérapeutique :
du fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : Biochimie et Biologie structurale

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 14 Décembre 2017, par

Dimitri Chérier

Composition du Jury :

Nicolas Bayan Professeur, Université Paris-Sud (-UMR9198-I2BC)	Président
Ivo Gomperts Boneca Directeur de recherche INSERM, Institut Pasteur	Rapporteur
Jean-Emmanuel Hugonnet Maître de conférences, Université Pierre et Marie Curie (-UMRS 1138)	Rapporteur
Didier Hilaire Expert confirmé en biologie, Direction Générale de l'Armement (-DGA Maîtrise NRBC)	Examineur
Sylvie Rebuffat Professeur, Muséum National d'Histoire Naturelle (- UMR 7245 CNRS-MNHN)	Examinatrice
Hélène Barreteau Maître de conférences, Université Paris-Sud (- UMR9198-I2BC)	Directrice de thèse
Dominique Mengin-Lecreux Directeur de recherche CNRS (- UMR9198-I2BC)	Invité

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Ivo Gomperts Boneca et Monsieur Jean-Emmanuel Hugonnet d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Je remercie également Madame Sylvie Rebuffat et Messieurs Nicolas Bayan et Didier Hilaire d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens également à adresser ces remerciements à la Direction Générale de l'Armement, qui m'a permis de réaliser ce doctorat en m'accordant un financement de 3 ans.

Je tiens ensuite à remercier vivement le Dr. Dominique Mengin-Lecreux de m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche Enveloppes Bactériennes et Antibiotiques. « Merci Chef » comme j'ai eu si souvent l'occasion de te le dire au cours de ma thèse. Merci pour l'ensemble des conseils que tu as pu me prodigier, que ce soit au niveau scientifique ou autre (en mécanique notamment !). Merci pour ta disponibilité et pour le soutien que tu m'as pu m'apporter, plus particulièrement durant cette longue période qu'a constitué la rédaction de ce manuscrit. J'espère que nos chemins se recroiseront à l'avenir, pourquoi pas à La ferme du bout des prés autour d'un cochon grillé pour commencer ? Ou bien encore au bord d'un terrain de rugby ?

Je tiens également à remercier le Dr. Hélène Barreteau. Hélène, un immense merci pour tout ! Sans toi la réalisation de cette thèse n'aurait pas été possible. C'est à toi qu'est revenue la lourde tâche de m'encadrer, de m'aiguiller et de me conseiller durant ces trois années, ce que tu as fait à la perfection ! Merci de m'avoir offert la possibilité de réaliser cette expérience qu'est la thèse ! Merci pour tous les moments partagés (pizzas, sushis, bières, concours de sudoku... Tu veux un moshi ?). Merci de ne m'avoir jamais fait de remarques le lundi matin quand j'arrivais un peu trop fatigué suite à victoire sur le pré et la troisième mi-temps qui l'avait accompagnée. Merci pour ta joie de vivre et ta bonne humeur permanentes ! Merci pour tout ! Le petit scarabée, comme tu m'as surnommé, te remercie du fond du cœur.

Je tiens également à remercier tous les autres membres de l'équipe. Merci mon Rodolphe pour les moments de franche rigolade, merci pour ta gentillesse et ta bienveillance. Ton caractère de cochon va me manquer, mais je suis sûr que nous nous reverrons très prochainement autour d'une bière avec Kanello ! Je tiens également à remercier Delphine Patin, ma voisine de bureau. Merci pour l'aide que tu as pu m'apporter, pour tes conseils et pour les manip que tu as réalisées pour moi. Tes « ça me gave, ça me gave, ça me gave » resteront gravé dans ma mémoire ! Je remercie également Thierry Touzé. Merci pour tes suggestions, tes idées de manip qui m'ont permis d'avancer dans ce travail. Merci également pour nos débats enflammés qui ont animés de nombreuses pauses café ! Je tiens également à remercier Xudong Tian. Merci Xudong pour ta gentillesse, ta sympathie et tout le reste, parce qu'avec toi « y'a pas de problème ». Cette chambre commune au Portugal nous aura permis de mieux nous connaître ! Ne change pas ! Je te souhaite le meilleur pour la fin de ta thèse ; J'assisterai avec un vif plaisir à ta soutenance ! Je tiens également à remercier le Dr. Didier Blanot. Tes passages hebdomadaires au laboratoire ont toujours été très enrichissants. Merci pour ton expertise et ta gentillesse. Merci pour la relecture que tu as faite de ce manuscrit et pour les corrections que tu as pu y apporter. Je tiens également à saluer Victorien Decoin avec qui j'ai partagé de très bons moments lors son passage au laboratoire en tant que « post-doc ». Merci d'être venu me voir à Marcoussis lors des Championnats de France de 7 malgré une chaleur accablante et une absence totale d'endroits ombragés !

Je tiens également à remercier particulièrement Inès Gallay ainsi que Stéphane Plancqueel pour leur gentillesse et leur disponibilité lors de la réalisation des expériences de cristallographie. Merci à vous deux, maintenant nous n'avons plus qu'à croiser les doigts pour avoir une structure exploitable prochainement.

Je tiens également à remercier Magalie Aumont-Nicaise pour son aide, ses conseils et par-dessus tout sa bonne humeur ! Merci de m'avoir permis de réaliser les tests d'interactions sur cette belle plateforme !

Je remercie tout particulièrement Marie-Hélène Sarda et Martine Denis pour leur gentillesse et le travail formidable qu'elles effectuent.

Je tiens également à remercier mes collègues enseignants, Moussa, Fred, Boris, Marianne...

Je tiens également à remercier toutes les personnes avec qui j'ai pu échanger au sein de l'institut : Agathe, Marielle, Agnès, Dominique, Michel (merci pour le dépannage !), Olivier, Corentin, Sébastien, Jean, Ahmed, Herman, Sylvie, Noureddine...

Merci à Simon Bossi pour les pauses que l'on a partagées pendant la rédaction du manuscrit ! Change pas beau gosse !

Je tiens à remercier chaleureusement Margarida Gomes et Adeline Pichard-Kostuch. Un immense merci à vous deux ! Merci de me supporter depuis le Master, ça ne doit pas être facile tous les jours ! Merci d'avoir été là pour moi dans les bons comme dans les mauvais moments ! Merci pour ces nombreux jeudis soirs que l'on a passé ensemble, en compagnie de Clément Madru, que je salue également. Merci ma petite Maggie, Beijinhos ! Merci Petit Faron, merci de m'avoir épaulé dans la dernière ligne droite de la rédaction, notamment de m'avoir évité de perdre un temps fou dans les méandres d'ADUM ! Petit faron « you're eating my food's food and i don't appreciate that ».

Je tiens à adresser un hommage tout particulier à Monsieur Thomas Ducrocq aka « Sustanon » qui figure dans ces remerciements en partie grâce à un « pour combien » mais également parce que t'es un chic type ! Ce défi de te faire apparaître dans mes remerciements, tu me l'as lancé pendant une de nos fameuses séances de bibis avec Bruno et je tenais à le coucher sur le papier pour me le remémorer dans quelques années !

Merci également à la famille du CA.ORSAY.RC. J'ai passé des saisons formidables à vos côtés et jouer en votre compagnie m'a permis de garder un certain équilibre essentiel pour pouvoir mener à bien ce travail de thèse.

Je tiens également à remercier Romaric Jumetz, mon copain de toujours. Je n'ai pas besoin d'en dire beaucoup plus. Merci pour ton soutien, et dans quelques semaines, je pourrai de nouveau servir de co-pilote et rattraper le temps perdu ! Par la même occasion, je tiens à remercier Ludovic Sotoca, qui m'a encouragé depuis l'autre bout du globe, en Nouvelle-Zélande. Merci mon Lulu et ne t'en fais pas pour ta calvitie, la science progresse à grands pas !

Merci à mes nouveaux colocs : Léo, La Bapt, Alexis et Alexis ! Merci de m'avoir fait à manger quand je rentrais tard le soir après une longue journée de rédaction. Merci de m'avoir accepté aux Lulus !

Je tiens également à remercier mes parents du fond du cœur ! Merci de m'avoir toujours poussé à continuer mes études. Je crois que je ne peux pas aller beaucoup plus loin maintenant ! Merci Maman, merci papa, merci Garf !

Enfin, je tiens à remercier Charlene Devilleger d'avoir eu la patience et le courage de me supporter, surtout pendant la période de rédaction ! Merci beaucoup, car sans toi ça aurait été beaucoup plus dur ! Je remercie également tes parents et ton frère pour leur accueil chaleureux à chaque fois que je suis venu chez vous.

Table des matières

Table des matières	4
Liste des Figures	8
Liste des tableaux	12
Liste des abréviations	13
Introduction Bibliographique	15
I. Le Peptidoglycane :	16
1. Structure et fonction du peptidoglycane :.....	17
2. Biosynthèse du peptidoglycane :.....	19
2.1. Les étapes cytoplasmiques :.....	19
2.2. Les étapes membranaires :.....	26
2.3. Polymérisation du peptidoglycane :.....	30
3. Recyclage du peptidoglycane :	33
4. Variabilité du peptidoglycane :.....	34
4.1. Variabilité des chaînes de glycanes :	34
4.2. Variabilité de la partie peptidique :.....	35
II. Les antibiotiques :	38
1. Les différentes cibles des antibiotiques :	38
2. Les antibiotiques qui ciblent la biosynthèse de la paroi bactérienne :	39
2.1. Exemple de la fosfomycine qui cible une étape cytoplasmique de la biosynthèse du peptidoglycane :	40
2.2. Exemple de la bacitracine qui cible une étape du métabolisme de l'undécaprényl phosphate :.....	40
2.3. Les antibiotiques ciblant les étapes de polymérisation du peptidoglycane :.....	40
2.4. Les molécules antimicrobiennes ciblant le lipide II :	41
3. La résistance aux antibiotiques :	44
III. Les bactériocines :	48
1. Définition :.....	48
2. Les bactériocines des bactéries à Gram positif :	48
3. Les bactériocines des bactéries à Gram négatif :	49
3.1. Les bactériocines de faible masse moléculaire des bactéries à Gram négatif :	50
3.2. Les bactériocines de haute masse moléculaire des bactéries à Gram négatif :	52
IV. Les colicines :	53
1. Classification des colicines :.....	53
2. Organisation génétique des colicines :.....	54
3. Organisation structurale des colicines :.....	55
4. Mode d'action des colicines :	57
4.1. Libération des colicines :	57
4.2. Liaison à la cellule cible :	58
4.3. Translocation à travers la membrane externe :	60

4.4.	Maturation des colicines :	68
4.5.	Activité cytotoxique des colicines :	69
5.	La protéine d'immunité :	73
5.1.	Protéines d'immunité des colicines ionophoriques :	73
5.2.	Protéines d'immunité des colicines nucléasiques :	73
V.	La colicine M et ses homologues :	75
1.	La colicine M :	75
1.1.	Caractéristiques de la colicine M :	75
1.2.	Structure tridimensionnelle de la colicine M :	75
1.3.	Mode d'action de la colicine M :	77
2.	Les homologues de la colicine M :	88
2.1.	Les homologues issus de <i>Pseudomonas</i> spp. :	88
2.2.	Les homologues issus de <i>Burkholderia</i> spp. :	94
2.3.	Les homologues issus de <i>Pectobacterium carotovorum</i> :	95
VI.	Objectifs de l'étude :	99
Matériels et Méthodes.....		102
1.	Produits et réactifs :	103
2.	Souches bactériennes, plasmides et conditions de culture :	103
2.1.	Souches :	103
2.2.	Milieus de culture :	104
2.3.	Plasmides :	104
3.	Techniques de biologie moléculaire :	106
3.1.	Oligonucléotides :	106
3.2.	PCR :	107
3.3.	Extraction d'ADN plasmidique :	107
3.4.	Restriction et ligation des fragments d'ADN :	108
3.5.	Construction des plasmides :	108
3.6.	Mutagenèse dirigée :	109
3.7.	Préparation des cellules compétentes et transformation :	109
4.	Surproduction, extraction et purification des protéines recombinantes :	110
4.1.	Surproduction :	110
4.2.	Extraction :	111
4.3.	Purification par chromatographie d'affinité :	111
4.4.	Purification par chromatographie d'exclusion stérique :	111
4.5.	Purification par chromatographie échangeuse de cations :	112
4.6.	Purification des protéines produites en corps d'inclusion :	113
5.	Dosage des protéines :	113
5.1.	Détermination de la concentration protéique par spectrophotométrie microvolume :	114
5.2.	Détermination de la concentration protéique par analyse en acides aminés :	114
6.	Protéolyse ménagée :	114
7.	Synthèse de substrats lipidiques et production d'un analogue du produit de réaction :	114
7.1.	Synthèse et purification de C ₅₅ -PP-MurNAC(-pentapeptide)-[¹⁴ C]GlcNAc :	115
7.2.	Synthèse et purification de lipides II solubles :	115
7.3.	Préparation et purification du 1-PP-MurNAC-pentapeptide :	116
8.	Spectrométrie de masse MALDI-TOF :	117
8.1.	Analyses du lipide II en C ₁₅ et du 1-PP-MurNAC-pentapeptide	117
8.2.	Analyse de la protéine PcaM1 :	118
9.	Détermination des activités enzymatiques et cytotoxiques des protéines purifiées :	118

9.1.	Evaluation de l'activité enzymatique :	118
9.2.	Recherche de ligand de la protéine PaeM :	119
9.3.	Evaluation de l'activité cytotoxique :	119
10.	Analyses physiologiques :	120
10.1.	Suivi d'incorporation de l'A ₂ pm dans le peptidoglycane :	120
10.2.	Analyse de la distribution cellulaire du meso-A ₂ pm :	120
10.3.	Quantification des pools de pré-nols dans les membranes :	120
10.4.	Observations microscopiques :	121
11.	Cristallogénèse :	121
11.1.	Principe :	121
11.2.	Criblage automatisé :	123
11.3.	Optimisation des conditions de cristallisation :	123
11.4.	Micro-ensemencement :	123
11.5.	Essais de co-cristallisation et trempage des cristaux :	124
11.6.	Collecte des données de diffraction et résolution de structure :	124
12.	Microcalorimétrie :	124
12.1.	Titration par microcalorimétrie isotherme (ITC) :	125
12.2.	Calorimétrie différentielle par balayage (DSC) :	127

Résultats et Discussion 128

I. Synthèse de substrats solubles : 129

1.	Synthèse de lipides II solubles :	129
2.	Détermination de l'activité catalytique des protéines ColM, PaeM et PcaM1 vis-à-vis des lipides II solubles :	132
3.	Optimisation des conditions de synthèse du lipide II en C ₁₅ :	135
4.	Purification et confirmation de l'identité du lipide II en C ₁₅ :	136
5.	Synthèse, purification et confirmation de l'identité du 1-PP-MurNAC-pentapeptide :	138

II. Etudes structurales et biochimiques de la protéine PaeM et de deux variants : . 140

1.	Production et purification de la PaeM :	140
2.	Identification d'un ligand potentiel de la PaeM :	141
2.1.	Par le test de détection d'activité enzymatique :	141
2.2.	Par microcalorimétrie :	142
3.	Essais de co-cristallisation de la PaeM avec le C ₁₅ -PP :	144
4.	Essais de cristallogénèse de la protéine PaeM D241A :	148
4.1.	Production et purification de la PaeM D241A :	148
4.2.	Cristallogénèse de la protéine PaeM D241A :	150
5.	Etude structurale d'une forme tronquée en N-terminal de la PaeM :	157
5.1.	Genèse d'une forme tronquée par protéolyse ménagée :	158
5.2.	Construction de la protéine PaeM Δ1-30 :	159
5.3.	Production et purification de la PaeM Δ1-30 :	159
5.4.	Surproduction et purification de la PaeM Δ1-30 :	161
5.5.	Détermination de l'activité enzymatique de la PaeM Δ1-30 :	163
5.6.	Cristallogénèse de la PaeM Δ1-30 :	163
6.	Mise en évidence d'une certaine cytotoxicité de la PaeM vis-à-vis d' <i>E. coli</i> :	169
6.1.	Confirmation de la cytotoxicité réelle de la PaeM :	169
6.2.	Dépendance de la cytotoxicité de la PaeM vis-à-vis de partenaires protéiques :	171
6.3.	Recherche d'une cytotoxicité identique de la part des autres homologues de la ColM : ...	174

III.	Etude de la cytotoxicité de la PcaM1 vis-à-vis d'<i>E. coli</i> :	175
1.	Contexte de l'étude :	175
2.	Article :	176
3.	Résumé des principaux résultats obtenus :	199
4.	Expériences complémentaires :	200
4.1.	Etude de la cytotoxicité de la PcaM1 D222N vis-à-vis d' <i>E. coli</i> :	200
4.2.	Etude de la cytotoxicité des homologues de la ColM issus de <i>Pseudomonas</i> spp. vis-à-vis d' <i>E. coli</i> par le biais de l'expression périplasmique :	203
IV.	Création de colicines chimères ciblant spécifiquement <i>E. coli</i> :	206
1.	Conception des colicines chimères :	206
2.	Construction des vecteurs permettant l'expression des colicines chimères :	208
3.	Détermination des conditions d'expression et purification des colicines chimères :	209
4.	Purification des colicines chimères à partir des corps d'inclusion :	212
5.	Evaluation de l'activité <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des colicines chimères :	214
6.	Evaluation de la cytotoxicité des colicines chimères vis-à-vis d' <i>E. coli</i> par le biais d'une expression périplasmique :	217
6.1.	Construction des vecteurs d'expression périplasmique :	217
6.2.	Expression périplasmique des colicines chimères :	218
6.3.	Analyse du contenu en pré-nols des membranes des cellules traitées par les colicines chimères :	219
	Conclusions et Perspectives	223
	Références Bibliographiques	232

Liste des Figures

Figure 1 : Représentation schématique des différents types de parois bactériennes	17
Figure 2 : Structure du peptidoglycane chez <i>Escherichia coli</i>	18
Figure 3 : Schéma de la voie de biosynthèse du peptidoglycane chez <i>E. coli</i>	19
Figure 4 : Formation de l'UDP- <i>N</i> -acétylglucosamine.	20
Figure 5 : Structure cristallographique des protéines GlmS, GlmM et GlmU	21
Figure 6 : Synthèse de l'acide UDP- <i>N</i> -acétylmuramique.	22
Figure 7 : Réaction catalysée par les Mur ligases (d'après Barreteau <i>et al.</i> , 2008).	24
Figure 8 : Structures tridimensionnelles des Mur ligases	25
Figure 9 : Topologie membranaire et structure cristallographique de <i>MraY</i> d' <i>Aquifex aeolicus</i>	27
Figure 10 : Structure du lipide II d'une bactérie à Gram négatif.....	28
Figure 11 : Structure cristallographique de <i>MurJ</i> de <i>Thermosiphon africanus</i> et mécanisme putatif de la translocation du lipide II.....	30
Figure 12 : Polymérisation du peptidoglycane.....	31
Figure 13 : Voies de transpeptidation.....	32
Figure 14 : Schéma de la biosynthèse et du recyclage du peptidoglycane.....	33
Figure 15 : Variabilité des chaînes de glycanes.....	35
Figure 16 : Variabilité de la partie peptidique	36
Figure 17 : Cibles cellulaires des antibiotiques	39
Figure 18 : Homologie structurale entre la pénicilline et le dipeptide terminal D-Ala-D-Ala	41
Figure 19 : Structure primaire de la nisine.....	42
Figure 20 : Structure tridimensionnelle de la nisine en complexe avec le lipide II.....	42
Figure 21 : Le lipide II, cible de nombreux antibactériens	44
Figure 22 : Illustration de l'acquisition d'une résistance à un antibiotique au sein d'une culture bactérienne.	45
Figure 23 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques	46
Figure 24 : Schéma général de maturation des bactériocines de faible masse moléculaire.....	51
Figure 25 : Classification des colicines	53
Figure 26 : Organisation génétique des colicines	55
Figure 27 : Schéma général de l'organisation modulaire en trois domaines des colicines	56
Figure 28 : Exemples de structures tridimensionnelles de colicines	57
Figure 29 : Structure des complexes <i>BtuB</i> - <i>ColE3</i> et <i>Cir</i> - <i>Colla</i>	60

Figure 30 : Homologies entre les systèmes de translocation TonB et Tol	61
Figure 31 : Superposition des structures tridimensionnelles des domaines C-terminaux de TolA et TonB	62
Figure 32 : Représentation schématique du translocon formé par la ColE9 avec les protéines BtuB et OmpF	63
Figure 33 : Modèle de translocation pour les colicines du groupe A.....	64
Figure 34 : Présentation des deux modèles de translocation proposés pour la colicine Ia à travers le récepteur Cir.....	66
Figure 35 : Modèle de translocation de la colicine B à travers son récepteur FepA.	67
Figure 36 : Modèle général de translocation pour les colicines du groupe B.....	68
Figure 37 : Modèle de translocation des colicines nucléasiques	69
Figure 38 : Structures tridimensionnelles des domaines ionophoriques isolés des colicines A, N, B, Ia et E1	70
Figure 39 : Représentation schématique des deux modèles d'insertion d'un domaine ionophorique au sein de la membrane interne	71
Figure 40 : Modèle putatif de formation du pore pour la ColA	71
Figure 41 : Topologie membranaire des protéines d'immunité de types A et E1 associées aux colicines ionophoriques.	73
Figure 42 : Structures tridimensionnelles de domaines nucléasiques de colicines en complexe avec leurs protéines d'immunité.....	74
Figure 43 : Organisation génétique des colicines B et M.....	75
Figure 44 : Structure tridimensionnelle de la colicine M	76
Figure 45 : Structure du complexe formé entre FhuA et TonB.....	78
Figure 46 : Structure tridimensionnelle de FkpA sous sa forme dimérique	80
Figure 47 : Morphologie cellulaire d'une souche d' <i>E. coli</i> K-12 ROW/V/22.1 traitée par la colicine M.	82
Figure 48 : Mode d'action de la colicine M.....	83
Figure 49 : Localisation des résidus du site actif à la surface de la ColM	84
Figure 50 : Structure tridimensionnelle de la Cmi.	86
Figure 51 : Alignement de séquence de la ColM avec ses homologues	88
Figure 52 : Structure tridimensionnelle de la PsyM.....	90
Figure 53 : Structure tridimensionnelle de la PaeM	91
Figure 54 : Comparaison de l'orientation des chaînes latérales des résidus essentiels à l'activité de ColM et PaeM.....	92

Figure 55 : Topologie membranaire des différentes protéines d'immunité associées aux homologues de la ColM.....	93
Figure 56 : Structure tridimensionnelle du récepteur de membrane externe FusA.....	96
Figure 57 : Structure tridimensionnelle de la PcaM2.....	97
Figure 58 : Modèle de liaison de la PcaM2 à la surface de FusA	98
Figure 59 : Oxydation de l'UDP-MurNAC-pentapeptide par le métapériodate de sodium pour l'obtention de l'analogue de produit de réaction 1-PP-MurNAC-pentapeptide	117
Figure 60 : Diagramme de phase	122
Figure 61 : Schéma d'un appareil d'ITC.....	126
Figure 62 : Schéma d'une expérience d'ITC	126
Figure 63 : Essai de synthèse de C ₁₀ -lipide II avec les enzymes MraY _{Bs} et MurG _{Ec}	129
Figure 64 : Suivi de synthèse du lipide II en C ₁₀	130
Figure 65 : Suivi de synthèse du lipide II en C ₁₅	131
Figure 66 : Isomérisation du C ₁₀ -P, du C ₁₅ -P et du C ₅₅ -P.....	132
Figure 67 : Dégradation <i>in vitro</i> des lipides II en C ₁₀ et C ₁₅ par les enzymes ColM, PaeM et PcaM1..	133
Figure 68 : Synthèse de lipide II en C ₁₅	135
Figure 69 : Synthèse de lipide II en C ₁₅ en présence d'un excès de C ₁₅ -PP	136
Figure 70 : Spectre de masse du lipide II en C ₁₅ purifié	137
Figure 71 : Spectre de masse du 1-PP-MurNAC-L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala purifié.....	138
Figure 72 : Profil de purification de la protéine PaeM.....	140
Figure 73 : Thermogramme de la PaeM seule	143
Figure 74 : Thermogramme de la PaeM en absence ou en présence de 1-PP-MurNAC-pentapeptide.	144
Figure 75 : Cinétique d'apparition des cristaux au sein de la condition H04 du kit « Classics » en présence (A) ou en absence (B) de C ₁₅ -PP.....	147
Figure 76 : Profil de purification de la protéine PaeM D241A	149
Figure 77 : Images des cristaux de la PaeM D241A	152
Figure 78 : Structure tridimensionnelle du mutant catalytique PaeM D241A	152
Figure 79 : Comparaison des sites actifs des protéines PaeM et PaeM D241A.....	154
Figure 80 : Site actif de la PaeM.....	155
Figure 81 : Mécanisme putatif de coupure du lipide II en deux étapes par la PaeM.	156
Figure 82 : Profils de digestion de la PaeM par les protéases trypsine, chymotrypsine et protéinase K.	158
Figure 83 : Profil de purification de la PaeM à l'issue de la protéolyse ménagée par la protéinase K..	159

Figure 84 : Profils de purification de la protéine PaeM Δ 1-30 (étiquette histidine en C-terminal)....	160
Figure 85 : Profils de purification de la protéine PaeM Δ 1-30 possédant l'étiquette His ₆ en N-terminal	161
Figure 86 : Profil de purification de la protéine PaeM Δ 1-30.	162
Figure 87 : Dégradation du lipide II <i>in vitro</i> par la PaeM Δ 1-30.....	163
Figure 88 : Image de cristaux de PaeM Δ 1-30.....	165
Figure 89 : Délimitation des différents domaines de la PaeM.....	167
Figure 90 : Evaluation de la cytotoxicité de la PaeM vis-à-vis d'une souche d' <i>E. coli</i> BW25113.....	169
Figure 91 : Evaluation de l'activité cytotoxique de différentes préparations de PaeM purifiées sur une souche d' <i>E. coli</i> (BW25113).....	170
Figure 92 : Détermination de la quantité minimale de protéine PaeM nécessaire pour induire la lyse d' <i>E. coli</i>	170
Figure 93 : Evaluation de l'activité cytotoxique de la PaeM D241A sur une souche d' <i>E. coli</i> BW25113.	171
Figure 94 : Dépendance de la cytotoxicité de la PaeM sur <i>E. coli</i> vis-à-vis des protéines FhuA, TonB et FkpA.....	171
Figure 95 : Inhibition de l'activité cytotoxique de la PaeM par la protéine Cmi.....	173
Figure 96 : Evaluation de l'activité cytotoxique des protéines PfiM, PsyM et PcaM1 sur une souche d' <i>E.</i> <i>coli</i> BW25113.....	174
Figure 97 : Effet de l'expression périplasmique de la PcaM1 D222N sur la croissance d' <i>E. coli</i>	201
Figure 98 : Effet de l'expression périplasmique des homologues issus de <i>Pseudomonas</i> spp. sur la croissance d' <i>E. coli</i>	204
Figure 99 : Analyses par HPLC du contenu en pré-nols des membranes des cellules d' <i>E. coli</i> traitées par les différents homologues issus de <i>Pseudomonas</i> spp.	205
Figure 100 : Représentation schématique des différentes colicines chimères construites	208
Figure 101 : Profil de purification des chimères CCA1, CCA3 et de la ColM ¹²¹ QM ¹²² :: ¹²¹ EF ¹²²	210
Figure 102 : Cytotoxicité de la ColM ¹²¹ QM ¹²² :: ¹²¹ EF ¹²² vis-à-vis d'une souche d' <i>E. coli</i> BW25113 ...	211
Figure 103 : Profils de purification des chimères CCA1 et CCC2 renaturées à partir des corps d'inclusion	213
Figure 104 : Profils électrophorétiques des différentes chimères renaturées et purifiées.....	214
Figure 105 : Dégradation du lipide II <i>in vitro</i> par les colicines chimères.....	215
Figure 106 : Effet de l'expression périplasmique des différentes colicines chimères sur la croissance d' <i>E. coli</i>	218
Figure 107 : Analyse par HPLC du contenu en pré-nols des membranes des cellules traitées par les différentes colicines chimères.....	220

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des bactériocines.....	48
Tableau 2 : Activité <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de différents mutants de la colicine M.....	84
Tableau 3 : Activité de la ColM vis-à-vis des lipides II ramifiés.....	85
Tableau 4 : Activités spécifiques de la ColM et de ses homologues.....	89
Tableau 5 : Liste des souches d' <i>E. coli</i> utilisées.	103
Tableau 6 : Liste des plasmides.....	104
Tableau 7 : Oligonucléotides utilisés	106
Tableau 8 : Identités, masses moléculaires et temps de rétention des composés utilisées pour la calibration de la colonne Hi-Load 16/600 Superdex S200	112
Tableau 9 : Activité résiduelle (en pourcentage) de la PaeM en présence des différentes molécules testées	141
Tableau 10 : Température de demi-dénaturation et enthalpies de dénaturation de la PaeM en absence ou en présence de 1-PP-MurNAC-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala.	143
Tableau 11 : Conditions de cristallisation obtenues pour la PaeM seule.	145
Tableau 12 : Conditions de cristallisation de la PaeM en présence de C ₁₅ -PP.....	146
Tableau 13 : Conditions de cristallisation de la PaeM D241A.....	150
Tableau 14 : Liste des conditions de cristallisation de la PaeM Δ 1-30	163
Tableau 15 : Optimisation des conditions de cristallisation de la PaeM Δ 1-30.....	166
Tableau 16 : Conditions d'expression optimales des cinq colicines chimères et de la ColM ¹²¹ QM ¹²² :: ¹²¹ EF ¹²²	210

Liste des abréviations

- 2YT : Milieu yeast-tryptone
- M63 : Milieu minimum
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- AHT : Anhydrotétracycline
- Amp : Ampicilline
- ARN : Acide ribonucléique
- ATP : Adénosine triphosphate
- C₁₀-P : Néryl phosphate
- C₁₅-P : Farnésyl phosphate
- C₁₅-PP : Farnésyl pyrophosphate
- C₅₅-OH : Undécaprénol
- C₅₅-P : Undécaprényl phosphate
- C₅₅-PP : Undécaprényl pyrophosphate
- Cam : Chloramphénicol
- CCA : Chimère coli-aeruginosa
- CCC : Chimère coli-carotovorum
- Cmi : Protéine d'immunité associée à la colicine M
- ColM : Colicine M
- Da : Dalton
- DDM : *n*-dodecyl-β-D-maltopyranoside
- DO : Densité optique
- DSC : Differential scanning calorimetry / Calorimétrie différentielle par balayage
- E : Fraction d'élution
- EB : Extrait brut
- FT : Flow through / Fraction non retenue
- GlcNAc : *N*-acétylglucosamine
- ITC : Isothermal titration calorimetry / Titration par calorimétrie isotherme
- Kan : Kanamycine
- MALDI-TOF : Matrix assisted laser desorption ionisation – Time of flight
- *meso*-A₂pm : acide *meso*-diaminopimélique
- Mray_{Aa} : Mray d'*Aquifex aeolicus*
- Mray_{Bs} : Mray de *Bacillus subtilis*
- MurG_{Ec} : MurG d'*Escherichia coli*
- MurNAc : acide *N*-acétylmuramique
- Ni²⁺-NTA : nickel-nitrilotriacétate
- PaeM : homologue de la colicine M issu de *Pseudomonas aeruginosa*
- PcaM : homologue de la colicine M issu de *Pectobacterium carotovorum*
- PflM : homologue de la colicine M issu de *Pseudomonas fluorescens*
- Pi : Phosphate inorganique
- PsyM : homologue de la colicine M issu de *Pseudomonas syringae*

- RMSD : Root mean square deviation
- SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis
- TCA : acide trichloroacétique
- TLC : Thin layer chromatography / Chromatographie sur couche mince
- UDP : Uridine diphosphate
- W : Fraction de lavage

Introduction Bibliographique

I. Le Peptidoglycane :

Le peptidoglycane (ou muréine) est une macromolécule biologique essentielle et spécifique de la paroi de la plupart des eubactéries (Neidhardt, 1996; Rogers *et al.*, 1980; Vollmer *et al.*, 2008a). Il s'agit d'un polymère continu localisé à la périphérie de la membrane plasmique. Sa principale fonction est de protéger la bactérie contre les effets de la pression osmotique interne exercée par le cytoplasme sur la membrane cytoplasmique. Le peptidoglycane est également responsable du maintien d'une forme cellulaire définie. Il est aussi associé aux processus de croissance et de division cellulaire (Nanninga, 1998; Vollmer *et al.*, 2008b). L'absence de peptidoglycane dans un milieu hypotonique conduit à la mort de la bactérie suite à la rupture de sa membrane cytoplasmique. Dans certaines conditions, des bactéries dépourvues de peptidoglycane, appelées « formes L », peuvent survivre sous forme de protoplastes ou sphéroplastes. Cependant, la forme caractéristique de la bactérie est perdue et la division cellulaire est fortement altérée (Smith, 1968; Errington, 2017). Le peptidoglycane sert également de point d'ancrage pour d'autres constituants majeurs de la paroi bactérienne tels que les acides teichoïques (Baddiley, 1972) ou la lipoprotéine de Braun (Braun, 1975).

Chez les bactéries à Gram positif, la paroi est caractérisée par la présence d'une épaisse couche de peptidoglycane qui entoure la membrane cytoplasmique et qui se retrouve en contact direct avec le milieu extérieur. Cette couche atteint une épaisseur comprise entre 20 et 50 nm et peut représenter jusqu'à 50% de la paroi (**Figure 1A**) (Shockman et Barrett, 1983). Chez les bactéries à Gram négatif, la couche de peptidoglycane est beaucoup plus fine, avec une épaisseur comprise entre 3 et 6 nm (Gan *et al.*, 2008). Chez ces bactéries, le peptidoglycane représente 10 à 20% de la paroi bactérienne et est situé dans l'espace périplasmique, entre la membrane cytoplasmique et la membrane externe. Cette dernière est une membrane asymétrique dont la face extérieure est composée exclusivement de lipopolysaccharides dont la longueur de la chaîne glucidique varie en fonction des espèces bactériennes (Kamio et Nikaido, 1976; Op den Kamp, 1979) (**Figure 1B**).

Les corynébactéries et les mycobactéries présentent une paroi atypique dont certains aspects sont communs à la fois aux bactéries à Gram positif et aux bactéries à Gram négatif. Ainsi, leur membrane cytoplasmique est entourée par une couche de peptidoglycane liée de façon covalente par des liaisons phosphodiester à un polymère d'arabinogalactane. Cette couche d'arabinogalactane est elle-même estérifiée par des acides mycoliques. Cette structure constitue le complexe « mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan » (*mAGP complex*) (Brennan, 2003). Au-dessus de ce complexe repose une deuxième couche de lipides de nature diverse. Ces lipides sont dits « libres » car ils sont liés de façon non covalente à la couche d'acides mycoliques. Cet ensemble lipidique forme une pseudo-bicouche lipidique appelée mycomembrane et est traversé par des porines. Enfin, la couche la plus externe de cette paroi particulière est constituée majoritairement de polysaccharides et de protéines. Cette partie est appelée capsule chez les espèces pathogènes (Zuber *et al.*, 2008).

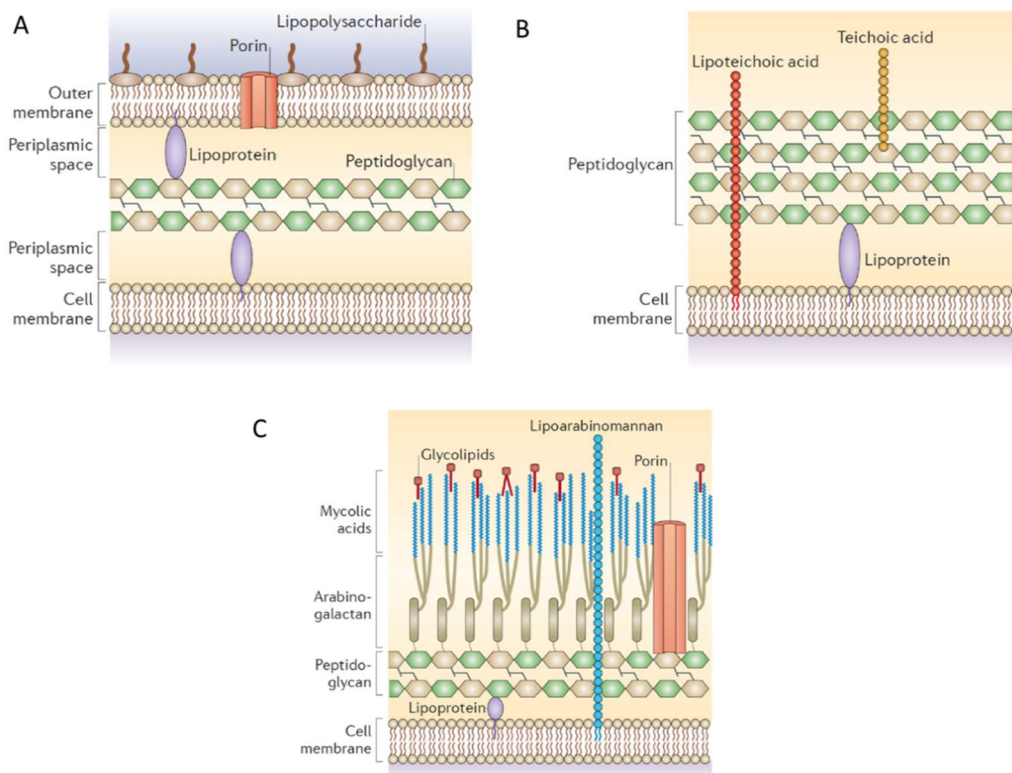


Figure 1 : Représentation schématique des différents types de parois bactériennes. A : Représentation de la paroi des bactéries à Gram négatif. B : Représentation de la paroi des bactéries à Gram positif. C : Représentation de la paroi des mycobactéries. (D'après (Brown *et al.*, 2015).

1. Structure et fonction du peptidoglycane :

Le peptidoglycane est un hétéropolymère constitué de longues chaînes de sucres reliées entre elles par de courts peptides (Schleifer et Kandler, 1972; van Heijenoort, 2001; Vollmer *et al.*, 2008a). La partie osidique est composée d'une alternance d'acide *N*-acétylmuramique (MurNAc) et de *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) reliés par des liaisons β -(1 \rightarrow 4). La fonction acide carboxylique du motif lactoyl en C3 de chaque MurNAc est substituée par un pentapeptide. Au sein du peptidoglycane naissant, la séquence de ce pentapeptide est dans la majorité des cas L-alanyl- γ -D-glutamyl-*meso*-diaminopimelyl(ou L-lysyl)-D-alanyl-D-alanine (**Figure 2**). Dans le peptidoglycane mature, la partie peptidique est délestée de l'un voire des deux résidus de D-alanine terminaux. La connexion entre deux chaînes osidiques est assurée par ces sous-unités peptidiques. En effet, la liaison entre deux chaînes de glycanes s'établit généralement entre la fonction amine libre de l'acide diaminé en position 3 d'une sous-unité accepteuse et la fonction carboxylique de la D-alanine en position 4 d'une sous-unité donneuse appartenant à une chaîne voisine. Cette condensation est responsable de la perte du cinquième résidu (D-alanine) de la sous-unité donneuse. La réticulation entre deux chaînes osidiques peut se faire soit de façon directe, comme mentionné précédemment, soit de façon indirecte par l'intervention d'un polypeptide court de composition variable, comme par exemple un penta-glycine chez *Staphylococcus aureus* (Vollmer *et al.*, 2008a).

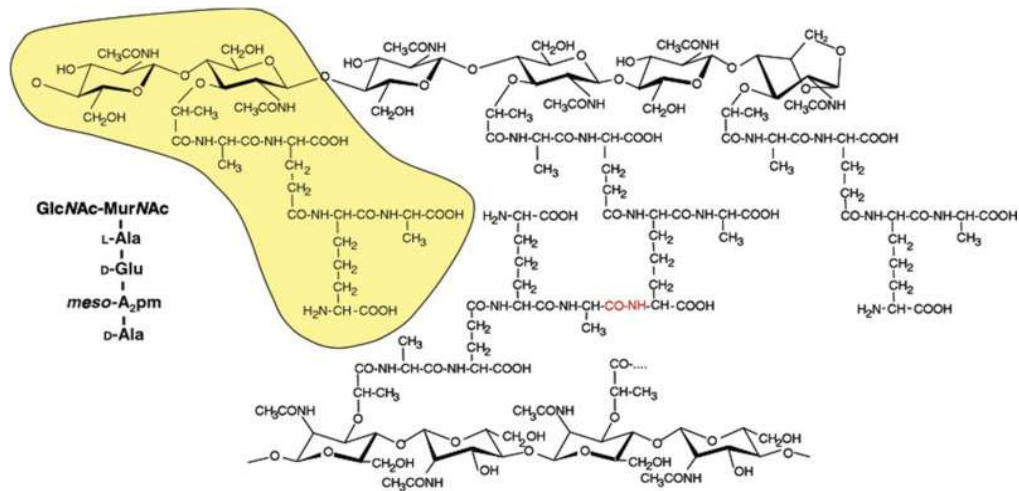


Figure 2 : Structure du peptidoglycane chez *Escherichia coli*. La composition de l'unité monomérique au sein du peptidoglycane mature est représentée en gras. La structure de cette même unité est représentée sur fond jaune. La liaison peptidique entre deux chaînes voisines est représentée en rouge (d'après Mengin-Lecreulx et Lemaitre, 2005).

Le peptidoglycane est une structure essentielle qui est retrouvée chez presque toutes les bactéries. Il est le produit d'une voie de biosynthèse complexe faisant intervenir un grand nombre d'enzymes. Cette voie, très conservée au sein du monde bactérien, se décompose toujours en trois étapes principales qui se déroulent successivement au niveau du cytoplasme, de la membrane interne et enfin du périplasma (Barreteau *et al.*, 2008; Bouhss *et al.*, 2008; Sauvage *et al.*, 2008).

2. Biosynthèse du peptidoglycane :

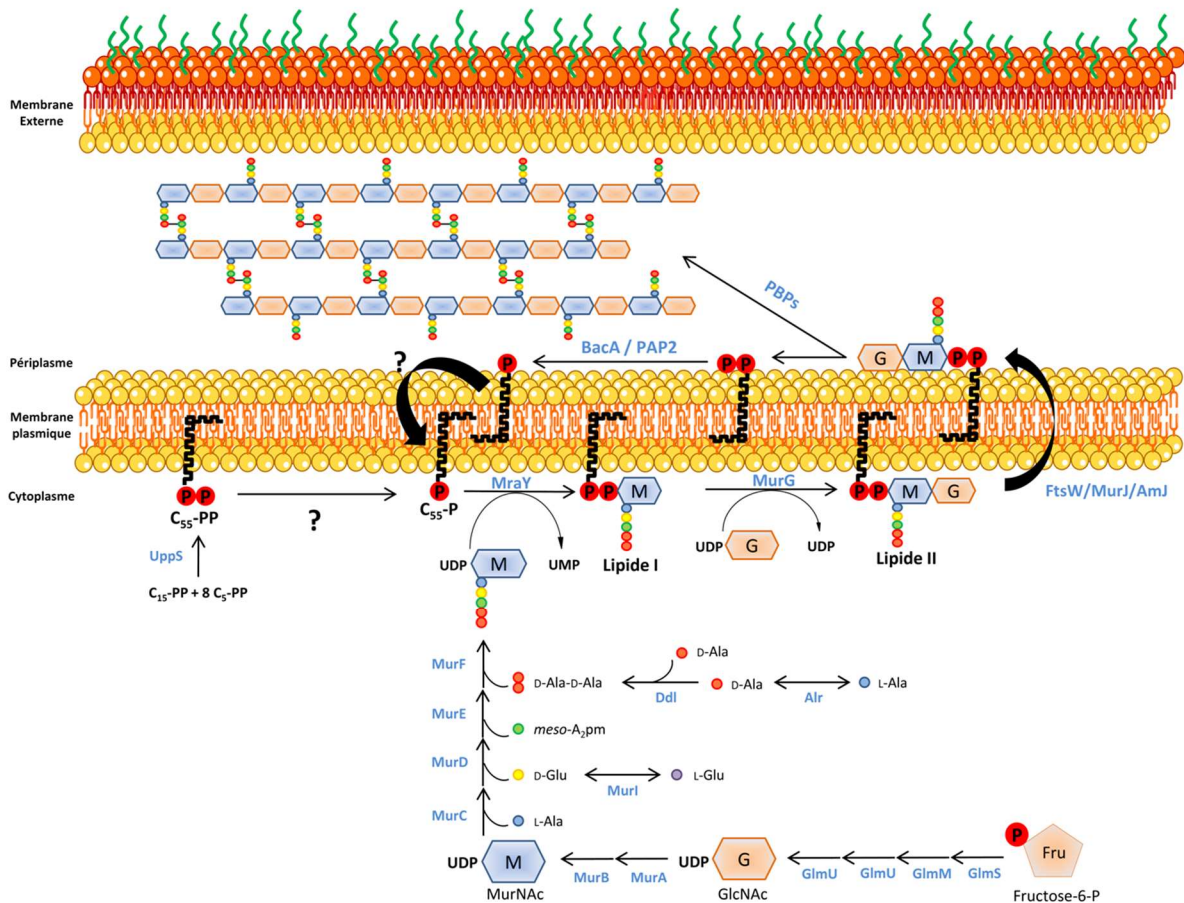


Figure 3 : Schéma de la voie de biosynthèse du peptidoglycane chez *E. coli*. La biosynthèse du peptidoglycane se déroule au niveau de trois compartiments cellulaires. Les premières étapes de synthèse se déroulent au niveau du cytoplasme et aboutissent à la formation des deux principaux précurseurs cytoplasmiques : l'UDP-GlcNAc (hexagone orange) et l'UDP-MurNAc (hexagone bleu) porteur de sa chaîne pentapeptidique. La biosynthèse se poursuit ensuite au niveau de la membrane interne. Le motif phospho-MurNAc-pentapeptide est tout d'abord ajouté sur l'undécaprényl phosphate pour former le lipide I. Le motif GlcNAc est par la suite ajouté sur le lipide I pour former le lipide II. Ce dernier est ensuite translocué du côté périplasmique par une flipase. Il est alors pris en charge par les « penicillin-binding proteins » (PBPs) qui sont responsables de l'ajout de l'unité disaccharide-pentapeptide au sein du peptidoglycane mature. Le point d'interrogation désigne des enzymes encore non identifiées.

2.1. Les étapes cytoplasmiques :

La synthèse du peptidoglycane débute toujours au niveau du cytoplasme par la formation de deux principaux précurseurs nucléotidiques : l'UDP-*N*-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc) et l'acide UDP-*N*-acétylmuramoyl-pentapeptide (UDP-MurNAc-pentapeptide). La formation de ces deux précurseurs peut se diviser en quatre étapes : (i). formation de l'UDP-GlcNAc à partir du fructose-6-phosphate, (ii). formation de l'UDP-MurNAc à partir de l'UDP-GlcNAc, (iii). assemblage de la sous-unité peptidique pour former l'UDP-MurNAc-pentapeptide, (iv). synthèses annexes permettant la formation de l'acide *D*-glutamique et du dipeptide *D*-alanyl-*D*-alanine (**Figure 3**).

2.1.1. Synthèse de l'UDP-*N*-acétylglucosamine :

L'UDP-GlcNAc est synthétisé à partir du fructose-6-phosphate en quatre étapes faisant intervenir trois enzymes différentes (**Figure 4**) : GlmS, GlmM et GlmU.

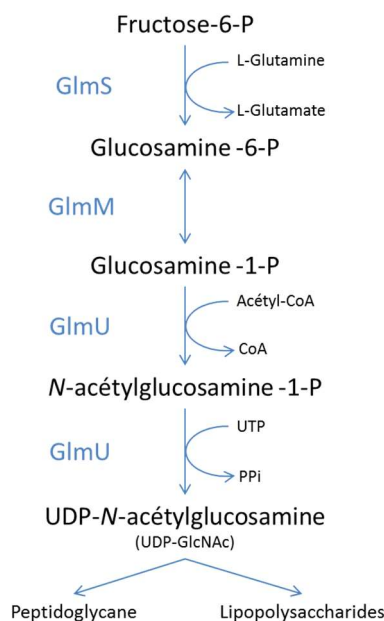


Figure 4 : Formation de l'UDP-*N*-acétylglucosamine.

La première étape est responsable de la transformation du fructose-6-phosphate en glucosamine-6-phosphate sous l'action de la glucosamine-6-phosphate synthase (GlmS). La L-glutamine est utilisée comme source d'azote par GlmS (Badet *et al.*, 1987). Cette réaction suit un mécanisme réactionnel de type « bi-bi » ordonné au cours duquel la fixation du fructose-6-phosphate est toujours suivie par celle de la L-glutamine (Badet *et al.*, 1988; Mouilleron *et al.*, 2011). Il s'agit d'une enzyme dimérique où chaque monomère est composé de deux domaines indépendants à la fois au niveau structural et au niveau fonctionnel (Teplyakov *et al.*, 2001 ; Mouilleron *et al.*, 2011) (**Figure 5A**). En effet, le domaine N-terminal de GlmS est responsable de la fixation et de l'hydrolyse de la glutamine en glutamate et en ammoniac. Le domaine C-terminal est quant à lui responsable de la transformation du fructose-6-phosphate en glucosamine-6-phosphate. C'est l'ammoniac produit au niveau du domaine N-terminal qui est utilisé comme source d'azote pour l'amination du sucre. Il est transporté du domaine N-terminal au domaine C-terminal par un système de « *channelling* » faisant intervenir des résidus hydrophobes. D'autre part, la dimérisation de la protéine GlmS est essentielle pour l'orientation des domaines N-terminal et C-terminal l'un par rapport à l'autre, ce qui permet la fermeture du domaine de liaison du fructose-6-phosphate ainsi que la formation du système de « *channelling* » nécessaire à l'activité (Floquet *et al.*, 2007).

Dans la deuxième étape, la glucosamine-6-phosphate formée par GlmS est transformée en glucosamine-1-phosphate sous l'action de la phosphoglucosamine mutase (GlmM). Cette protéine appartient à la famille des hexose-phosphate mutases. Elle possède en effet au niveau de sa structure primaire un motif consensus typique de cette famille d'enzymes : (GA)(LIVM)X(LIVM)(ST)(PGA)S*HXPX4(GN) (Mengin-Lecreulx et van Heijenoort, 1996). Cette séquence caractéristique contient la sérine catalytique (S*) dont la phosphorylation est nécessaire pour l'activité

enzymatique. Il a été montré qu'il s'agissait de la sérine 102 pour GlmM d'*E. coli* (Jolly *et al.*, 1999). La transformation de la glucosamine-6-phosphate en glucosamine-1-phosphate se fait selon un mécanisme ping-pong nécessitant l'intervention d'un intermédiaire catalytique, la glucosamine-1-6-diphosphate, qui est à la fois le premier produit et le second substrat de la réaction catalysée par cette enzyme (Jolly *et al.*, 1999). Le transfert du groupement phosphate sur la glucosamine-1-phosphate pour former la glucosamine-1-6-diphosphate nécessite que la sérine catalytique soit phosphorylée. GlmM est capable de s'autophosphoryler *in vitro* en présence d'ATP ou d'un autre nucléotide triphosphate pour pouvoir effectuer cette réaction de transfert (Jolly *et al.*, 2000). Pour réaliser cette réaction, GlmM doit être sous forme dimérique. La structure tridimensionnelle de l'homodimère a par ailleurs été résolue (**Figure 5B**) (Mehra-Chaudhary *et al.*, 2011a, 2011b).

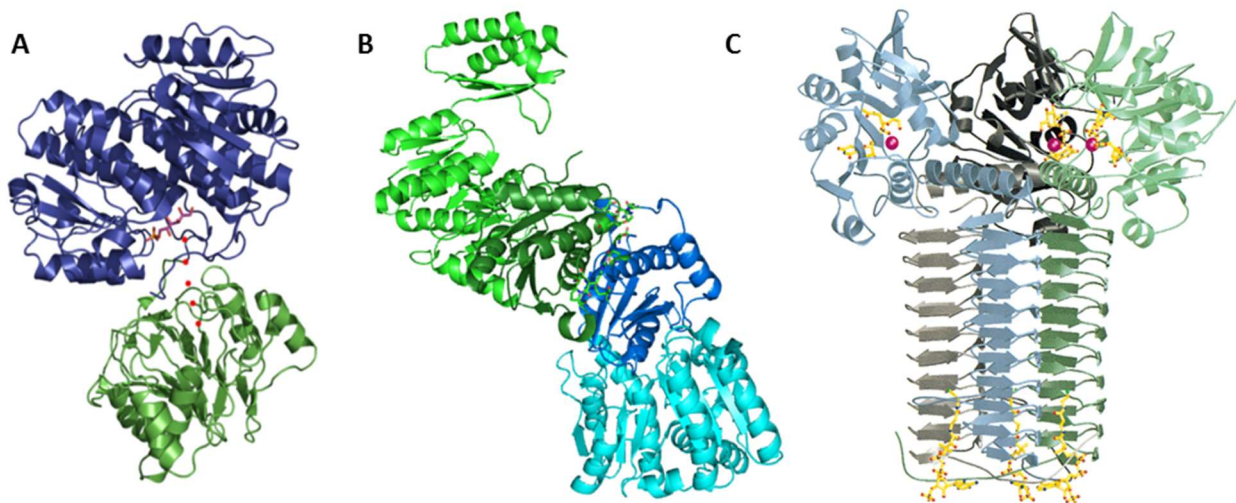


Figure 5 : Structure cristallographique des protéines GlmS, GlmM et GlmU. A : Structure tridimensionnelle de GlmS sous forme monomérique en présence de fructose-6-phosphate (magenta). Les domaines glutaminase et isomérase sont représentés respectivement en vert et bleu. Les points rouges représentent le trajet emprunté par l'ammoniac (code PDB : 1JXA) (D'après Barreteau *et al.*, 2008). B : Structure tridimensionnelle de GlmM sous forme dimérique (code PDB : 3PDK). C : Structure tridimensionnelle de GlmU sous forme trimérique en présence de CoA et d'UDP-GlcNAc (en jaune) ainsi qu'en présence d'ions cobalt (en rose) (code PDB : 1HV9) (Olsen et Roderick, 2001).

La dernière étape aboutissant à la formation de l'UDP-GlcNAc à partir de la glucosamine-1-phosphate est catalysée par la *N*-acétylglucosamine-1-phosphate uridylyltransférase ou GlmU (Mengin-Lecreux et van Heijenoort, 1993). GlmU est une enzyme trimérique et bifonctionnelle responsable de l'acétylation et de l'uridylation de la glucosamine-1-phosphate (Mengin-Lecreux et van Heijenoort, 1994). Ainsi, GlmU catalyse au niveau de son domaine C-terminal le transfert du groupement acétyl provenant de l'acétyl-CoA sur la glucosamine-1-phosphate (GlcN-1-P) pour former la *N*-acétylglucosamine-1-P (GlcNAc-1-P). Enfin, l'uridylation de la GlcNAc-1-P, permettant la formation de l'UDP-GlcNAc à partir d'UTP, se fait au niveau du domaine N-terminal. Ces deux réactions se font de manière ordonnée, l'acétylation précédant l'uridylation, même si une certaine capacité du domaine N-terminal à pouvoir transférer directement l'UMP sur la GlcN-1-P a été démontrée *in vitro* et dans certains contextes particuliers *in vivo* (Pompeo *et al.*, 2001). Il a par ailleurs été établi que le transfert du GlcNAc-1-P du domaine C-terminal vers le domaine N-terminal ne faisait pas intervenir de système de « channelling ». Ce produit intermédiaire est en effet relargué dans le milieu puis capté par le domaine N-terminal (Gehring *et al.*, 1996). La résolution de la structure tridimensionnelle de GlmU en présence de CoA et de GlcN-1-P a permis de mettre en évidence la nécessité de la trimérisation pour

la réaction d'acétylation. En effet, le site catalytique responsable de l'addition du groupement acétyl sur la GlcN-1-P se situe à l'interface de deux monomères. De plus, l'extrémité C-terminale du dernier monomère est impliquée dans la liaison de la partie 3'-5' ADP du CoA. La protéine GlmU sous sa forme trimérique contient donc trois sites d'acétylation indépendants (Olsen et Roderick, 2001; Olsen *et al.*, 2007) (**Figure 5C**). En revanche, la trimérisation n'est pas essentielle pour la réaction d'uridylation (Pompeo *et al.*, 2001).

L'UDP-GlcNAc est donc produit à partir du fructose-6-phosphate suite aux actions successives des enzymes GlmS, GlmM et GlmU. Il est ensuite utilisé comme substrat par deux enzymes impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane : MurA, au niveau cytoplasmique, pour permettre *in fine* la formation d'UDP-MurNAc, et MurG, au niveau de la membrane cytoplasmique, pour former le lipide II, dernier précurseur de la voie de biosynthèse du peptidoglycane (Barreteau *et al.*, 2008; Bouhss *et al.*, 2008). Il est important de noter que l'UDP-GlcNAc intervient également dans la synthèse d'autres macromolécules bactériennes telles que les lipopolysaccharides (LPS), les acides teichoïques ou l'antigène commun aux entérobactéries (ECA). Il intervient également dans la synthèse du poly- β -(1-6)-*N*-acétyl-D-glucosamine (PNAG), polymère impliqué dans la formation de biofilms chez *E. coli* (Konopka, 2012).

2.1.2. Synthèse de l'acide UDP-*N*-acétylmuramique :

La formation de l'acide UDP-*N*-acétylmuramique (UDP-MurNAc) à partir de l'UDP-GlcNAc se fait en deux étapes et nécessite l'intervention de deux enzymes distinctes : MurA et MurB (**Figure 6**).

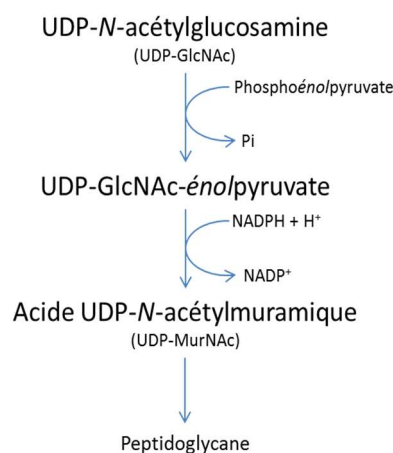


Figure 6 : Synthèse de l'acide UDP-*N*-acétylmuramique.

Lors de la première étape, catalysée par MurA, un groupement énoypyruvate provenant du phosphoénolpyruvate (PEP) est transféré sur le groupement hydroxyle en position 3 de l'UDP-GlcNAc. Cela aboutit à la formation de l'UDP-GlcNAc-énoypyruvate (Brown *et al.*, 1994). Cette réaction enzymatique est la première directement impliquée dans la voie de biosynthèse du peptidoglycane. MurA a fait l'objet de nombreuses études biochimiques et structurales qui ont permis de proposer un mécanisme catalytique d'addition-élimination faisant intervenir un intermédiaire tétraédrique (Skarzynski *et al.*, 1998). La résolution de structures tridimensionnelles de MurA seule ou en présence de différents ligands (UDP-GlcNAc, PEP ou analogues de PEP) a permis de mettre en évidence les différents changements conformationnels que subit la protéine au cours de son cycle réactionnel. En effet, la liaison des substrats permet le passage de l'enzyme d'une forme ouverte à une forme fermée,

favorable au transfert du groupement *énol*pyruvate (Schönbrunn *et al.*, 1998). Le type de réaction catalysée par MurA est un processus biochimique rare qui est uniquement retrouvée pour la protéine AroA intervenant dans le métabolisme de l'acide shikimique (Byczynski *et al.*, 2003).

La seconde étape permettant la formation de l'UDP-MurNAc est catalysée par l'enzyme MurB qui est responsable de la réduction du groupement *énol*pyruvate de l'UDP-GlcNAc-*énol*pyruvate. MurB est une flavoprotéine qui adopte un mécanisme catalytique de type ping-pong bi-bi mettant en jeu deux demi-réactions successives. Elle catalyse dans un premier temps la réduction du FAD en FADH₂ à l'aide des ions hydrures du NADPH. Le FADH₂ ainsi formé est ensuite utilisé lors de la deuxième demi-réaction pour réduire l'UDP-GlcNAc-*énol*pyruvate afin de former l'UDP-MurNAc (Benson *et al.*, 1993). Cette dernière étape de réduction conduit à la formation d'un groupement lactoyl sur lequel viendra se fixer le pentapeptide. Les études structurales de protéines MurB provenant de différentes espèces ont permis de mettre en évidence une structure commune en trois domaines. Les domaines 1 et 2 sont responsables de la fixation du FAD alors que le domaine 3 permet quant à lui la fixation du NADPH et de l'UDP-GlcNAc-*énol*pyruvate (Benson *et al.*, 1996 ; Kim *et al.*, 2007).

Les protéines MurA et MurB permettent donc, par leurs actions successives, de produire à partir de l'UDP-GlcNAc, l'UDP-MurNAc sur lequel va être fixé le pentapeptide qui permettra la réticulation du peptidoglycane.

2.1.3. Synthèse de l'UDP-MurNAc-pentapeptide :

L'UDP-MurNAc-pentapeptide est synthétisé à partir de l'UDP-MurNAc suite aux actions consécutives de quatre enzymes hautement spécifiques appelées Mur ligases ou Mur synthétases : MurC, MurD, MurE et MurF (**Figure 3**) (van Heijenoort, 2001; Barreteau *et al.*, 2008). Ces quatre enzymes permettent les ajouts successifs de la L-Ala, du D-Glu, d'un acide diaminé tel que le *meso*-A₂pm - essentiellement retrouvé chez les bactéries à Gram négatif - ou la L-Lys - essentiellement retrouvée chez les bactéries à Gram positif - et enfin d'un dipeptide dont la séquence est en général D-Ala-D-Ala. Ce pentapeptide est greffé au niveau du groupement D-lactoyl de l'UDP-MurNAc. Chez *E. coli*, les gènes codant pour ces quatre protéines sont situés au sein d'un même opéron : l'opéron *mra* (« *murein region A* ») qui contient à la fois des gènes responsables de la biosynthèse du peptidoglycane, mais aussi des gènes impliqués dans la division cellulaire (Mengin-Lecreux *et al.*, 1998). Ces enzymes ont été très étudiées chez *E. coli* et leurs gènes (*murC*, *murD*, *murE* et *murF*) ont été clonés, séquencés et caractérisés comme étant uniques et essentiels à la survie cellulaire. Il existe d'autre part chez *E. coli* une autre Mur ligase, Mpl, enzyme non essentielle qui catalyse l'addition en bloc du tripeptide L-Ala-γ-D-Glu-*meso*-A₂pm sur l'UDP-MurNAc lors du processus de recyclage du peptidoglycane (Mengin-Lecreux *et al.*, 1996).

Les Mur ligases sont des enzymes à trois substrats : (i). l'ATP, (ii). l'UDP-MurNAc ou un UDP-MurNAc-acide aminé ou peptide, (iii). un acide aminé ou un dipeptide. Ces enzymes réalisent toutes le même type de réaction aboutissant à la formation d'une liaison amide ou peptidique avec hydrolyse concomitante de l'ATP en ADP et P_i. La formation de cette liaison passe en premier lieu par l'activation du groupement carboxyle présent au niveau du substrat nucléotidique par l'ATP. L'acyl-phosphate formé subit alors une attaque nucléophile de la fonction amine de l'acide aminé ou du dipeptide. Cela conduit à la formation d'un intermédiaire tétraédrique hautement énergétique. Il y a alors élimination du groupement phosphate et formation de la liaison peptidique (**Figure 7**) (Bouhss *et al.*, 2002).

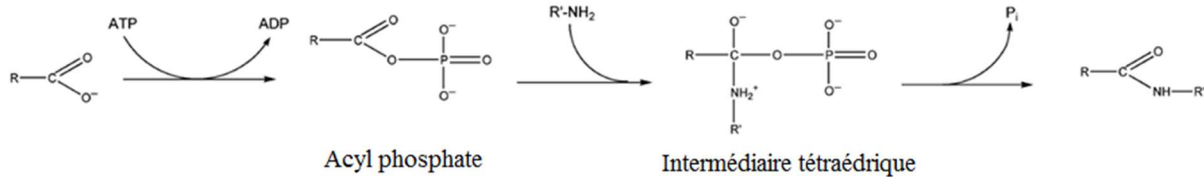


Figure 7 : Réaction catalysée par les Mur ligases (d'après Barreteau *et al.*, 2008).

L'alignement des séquences de différentes Mur ligases a permis d'identifier 6 résidus invariants ainsi qu'une séquence consensus de fixation de l'ATP (Bouhss *et al.*, 1997; Eveland *et al.*, 1997). Ces éléments ont permis de définir la superfamille des Mur ligases. D'autres enzymes non impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane, mais catalysant le même type de réaction, ont été rattachées à la famille des Mur ligases du fait de la présence de ces mêmes acides aminés invariants. Il s'agit de la protéine FolC, impliquée dans le métabolisme du folate (Sheng *et al.*, 2000), de la protéine CapB impliquée dans la synthèse de la capsule de *Bacillus anthracis* (Candela et Fouet, 2006) et de la région C-terminale de la cyanophicine synthétase (Ziegler *et al.*, 1998).

Plusieurs structures tridimensionnelles de Mur ligases ont été obtenues en présence ou absence de différents ligands. L'analyse de ces différentes structures a permis de mettre en évidence la présence d'une architecture commune en trois domaines (**Figure 8**) (Smith, 2006). Le domaine N-terminal est responsable de la fixation du substrat nucléotidique. Sa structure, de type « Rossmann-fold », varie légèrement entre chaque Mur ligase afin de pouvoir accommoder un substrat dont la partie peptidique est de plus en plus longue. Le domaine central qui permet de lier l'ATP possède quant à lui une structure caractéristique des protéines capables de fixer des mononucléotides telles que les ATPases ou les GTPases. Le domaine C-terminal, qui possède comme le domaine N-terminal un repliement de type « Rossmann-fold », est quant à lui responsable de la fixation de l'acide aminé ou du dipeptide. Les six résidus invariants caractéristiques de cette famille d'enzymes sont situés à l'interface des trois domaines. L'analyse des différentes structures en présence et en absence de substrats a permis de montrer que ces enzymes existaient à la fois sous une forme ouverte et une forme fermée. Ce passage de la forme ouverte à la forme fermée semble être provoqué par la liaison des différents substrats (Smith, 2006; Šink *et al.*, 2016).

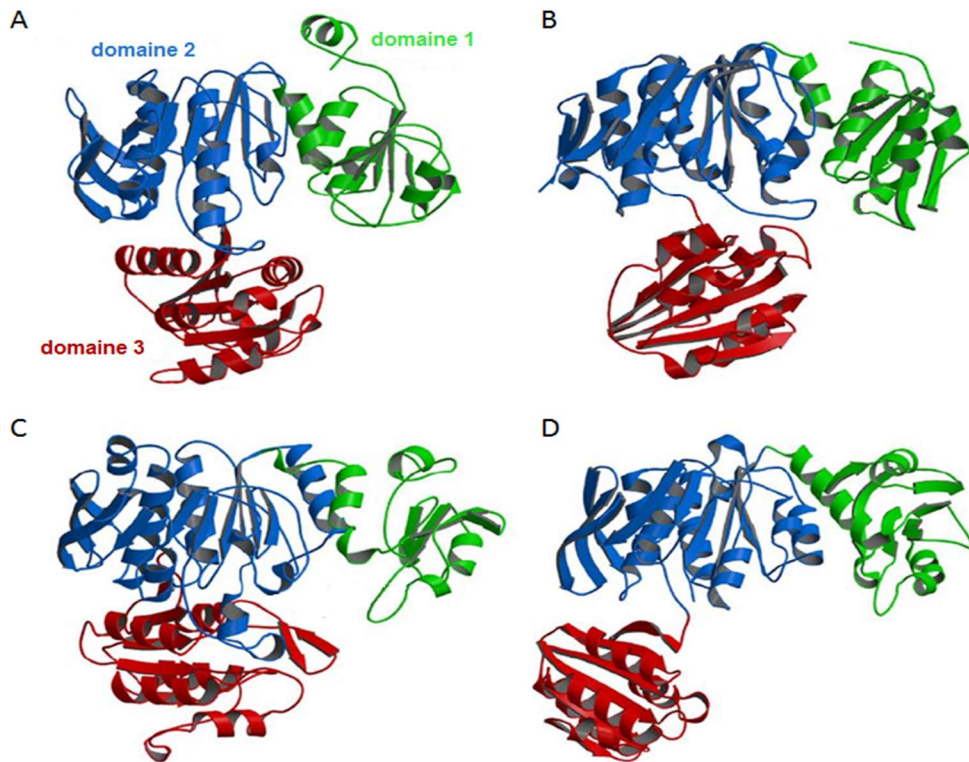


Figure 8 : Structures tridimensionnelles des Mur ligases. Les structures de MurC (A), MurD (B), MurE (C) et MurF (D) sont représentées en « cartoon ». Les différents domaines sont indiqués pour MurC et le code couleur utilisé est identique pour l'ensemble des Mur ligases. Le domaine N-terminal (domaine 1) est coloré en vert, le domaine central (domaine 2) en bleu et le domaine C-terminal (domaine 3) en rouge. Les enzymes MurC, MurD et MurE sont dans une conformation fermée alors que MurF est dans une conformation ouverte (D'après Smith, 2006).

2.1.4. Voies annexes :

On retrouve dans la composition du peptidoglycane des acides aminés de la série D. Ce type d'acide aminé n'est pas fréquemment rencontré et ils sont uniquement synthétisés pour intégrer la voie de biosynthèse du peptidoglycane.

2.1.4.1. Formation de la D-alanine :

La D-alanine est produite, chez *E. coli* et d'autres espèces bactériennes, à partir de la L-Ala sous l'action d'une alanine racémase. En fonction des espèces, on retrouve une ou deux alanine racémases. Chez *E. coli*, deux ont été identifiées, codées respectivement par les gènes *alr* et *dadX*. L'expression de la protéine Alr est constitutive alors que celle de DadX est induite uniquement lorsque la L-Ala est utilisée comme source de carbone et d'énergie (Barreteau *et al.*, 2008).

2.1.4.2. Formation du dipeptide D-Ala-D-Ala :

Le dipeptide D-Ala-D-Ala résulte de la condensation de deux molécules de D-Ala. Cette réaction est catalysée par une ligase et nécessite la consommation d'une molécule d'ATP. Selon les espèces bactériennes, un ou deux gènes codent pour cette fonction (*ddlA* et *ddlB* chez *E. coli*). Le mécanisme réactionnel met en jeu la formation d'un acyl-phosphate ainsi que la formation d'un intermédiaire tétraédrique (Mullins *et al.*, 1990; Healy *et al.*, 2000). Bien que ce mécanisme réactionnel soit proche de celui des Mur ligases, les D-Ala:D-Ala ligases (Ddl) ont été identifiées comme appartenant à la famille des « ATP-grasp » (Galperin et Koonin, 1997).

2.1.4.3. Formation du D-glutamate :

Le D-glutamate rentre dans la composition du peptidoglycane mais il est également un composant de la capsule chez certaines bactéries (Foster et Popham, 2002). Sa formation peut être catalysée par une D-Ala:D-Glu transaminase ou par une glutamate racémase Murl (Doublet *et al.*, 1993; Fotheringham *et al.*, 1998).

2.2. Les étapes membranaires :

Lors des étapes membranaires de la biosynthèse du peptidoglycane, le motif phospho-MurNAc-pentapeptide du précurseur nucléotidique est dans un premier temps ajouté au transporteur lipidique undécaprényl phosphate (C_{55} -P) pour former le lipide I. Le motif GlcNAc de l'UDP-GlcNAc est ensuite fixé sur ce lipide I pour former le lipide II.

2.2.1. Métabolisme de l'undécaprényl phosphate :

L'undécaprényl phosphate (C_{55} -P), également appelé bactoprénol, est un lipide essentiel impliqué dans la biosynthèse du peptidoglycane mais également dans celle d'autres constituants de la paroi bactérienne comme les LPS, les acides teichoïques ou bien l'antigène commun aux entérobactéries (ECA) (Bouhss *et al.*, 2008; Manat *et al.*, 2014; Barreteau *et al.*, 2017). Le C_{55} -P est généré à partir de l'undécaprényl pyrophosphate (C_{55} -PP) suite à une étape de déphosphorylation. Ce C_{55} -PP peut être soit néo-synthétisé, soit issu d'une étape de recyclage. Le C_{55} -PP néo-synthétisé sur la face interne de la membrane plasmique est le produit de l'undécaprényl pyrophosphate synthase (UppS), suite à la condensation d'une molécule de farnésyl pyrophosphate (C_{15} -PP) et de huit molécules d'isopentényl pyrophosphate (C_5 -PP) (**Figure 3**) (Ogura et Koyama, 1998). Le C_{55} -PP recyclé est, quant à lui, libéré au niveau de la face externe de la membrane plasmique suite aux étapes de polymérisation du peptidoglycane. La déphosphorylation du C_{55} -PP permettant de former du C_{55} -P est catalysée par des undécaprényl pyrophosphate phosphatases (UppP). Chez *E. coli*, cette activité essentielle est portée par la protéine BacA, ainsi que par les protéines PgpB, YbjG et LpxT appartenant à la superfamille des PAP2 (Phosphatidic Acid Phosphatases of type 2) (El Ghachi *et al.*, 2004, 2005). Ces quatre phosphatases sont des protéines intégrales de membrane dont le site actif est localisé du côté périplasmique (Tatar *et al.*, 2007; Touzé *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2014; Manat *et al.*, 2015). Cette orientation commune suggère donc que ces protéines sont impliquées uniquement dans la déphosphorylation du C_{55} -PP localisé sur la face externe de la membrane plasmique. En revanche, le mécanisme de déphosphorylation du C_{55} -PP néo-synthétisé reste flou et les acteurs impliqués dans cette étape n'ont pour l'heure pas été identifiés. Deux hypothèses concernant la déphosphorylation du C_{55} -PP néo-synthétisé sont avancées : (i). l'implication d'une phosphatase spécifique active du côté cytoplasmique ; (ii). l'export de ce lipide du côté périplasmique par une flippase où il serait alors déphosphorylé par les phosphatases BacA, PgpB, YbjG ou LpxT, puis réimporté par une autre flippase (**Figure 3**).

2.2.2. Formation du lipide I :

L'enzyme MraY (phospho-N-acétylmuramoyl-pentapeptide transférase) est responsable du transfert du motif phospho-MurNAc-pentapeptide de l'UDP-MurNAc-pentapeptide sur l'undécaprényl phosphate, permettant ainsi la formation du lipide I (C_{55} -PP-MurNAc-pentapeptide) avec libération d'UMP (**Figure 3**). Le gène *mraY* est unique et essentiel à la viabilité cellulaire (Boyle et Donachie,

1998). Comme les gènes *mur* codant pour les Mur ligases, ce gène est situé au sein du cluster *mra* (Ikeda *et al.*, 1991). *MraY* est une protéine intégrale de membrane, qui contient dix segments transmembranaires, quatre boucles périplasmiques et cinq boucles cytoplasmiques. Les séquences correspondant à trois des cinq boucles cytoplasmiques sont relativement conservées et permettent de rattacher *MraY* à la famille des polyisoprényl-phosphate *N*-acétylhexosamine-1-phosphate transférases (Bouhss *et al.*, 2008). Cette topologie semble conservée pour l'ensemble des eubactéries (Bouhss *et al.*, 1999). La structure tridimensionnelle de *MraY* issue d'*Aquifex aeolicus* a récemment été résolue et confirme la topologie membranaire précédemment établie (**Figure 9**) (Chung *et al.*, 2013). Le pool de lipide I a été estimé chez *E. coli* à environ 700 molécules par cellule (van Heijenoort *et al.*, 1992). Cette faible quantité s'explique par le fait que le lipide I est un intermédiaire transitoire dont la synthèse est efficacement couplée avec les réactions situées en aval dans la voie de biosynthèse du peptidoglycane, en particulier avec la synthèse de lipide II. En comparaison, le nombre de molécules de C₅₅-P a été estimé à environ 40 000 par cellule chez *E. coli* (Barreteau *et al.*, 2009a).

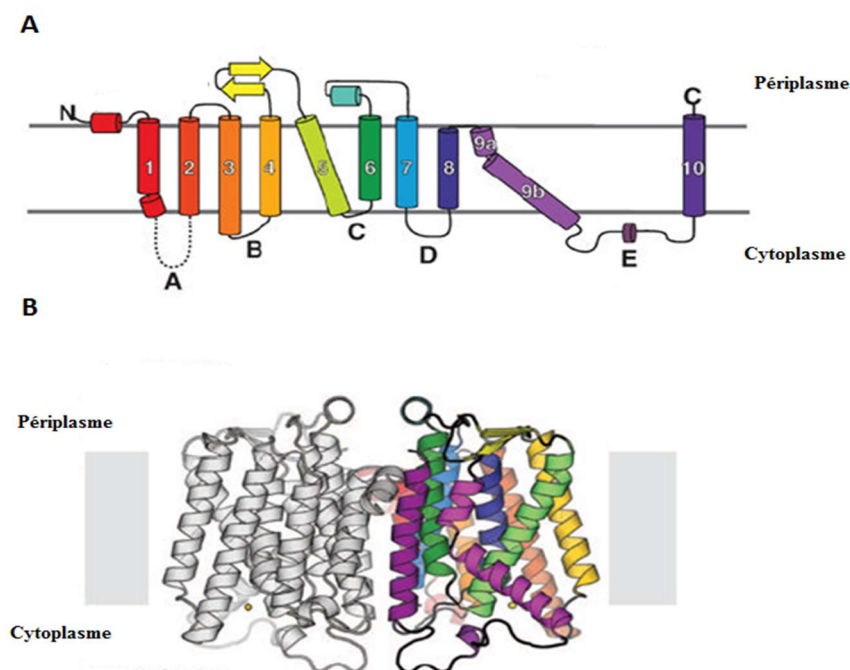


Figure 9 : Topologie membranaire et structure cristallographique de *MraY* d'*Aquifex aeolicus*. A : Topologie membranaire de *MraY*_{Aa}. Les chiffres représentent les numéros des hélices transmembranaires et les lettres les boucles cytoplasmiques. B : Structure cristallographique de *MraY*_{Aa}. Les mêmes couleurs sont utilisées pour identifier les hélices entre la topologie membranaire et la structure. (code PDB : 4J72) (d'après Chung *et al.*, 2013).

2.2.3. Formation du lipide II :

Le lipide II (C₅₅-PP-MurNAc(-pentapeptide)-GlcNAc) constitue le dernier précurseur dans la voie de biosynthèse du peptidoglycane. Il est le résultat de la condensation entre le motif GlcNAc, issu de l'UDP-GlcNAc, avec une molécule de lipide I. Cette condensation a lieu au niveau du groupement hydroxyle en position 4 du MurNAc et du groupement hydroxyle en position 1 de la glucosamine, aboutissant ainsi à la formation d'une liaison β-(1→4) entre ces résidus (**Figure 10**).

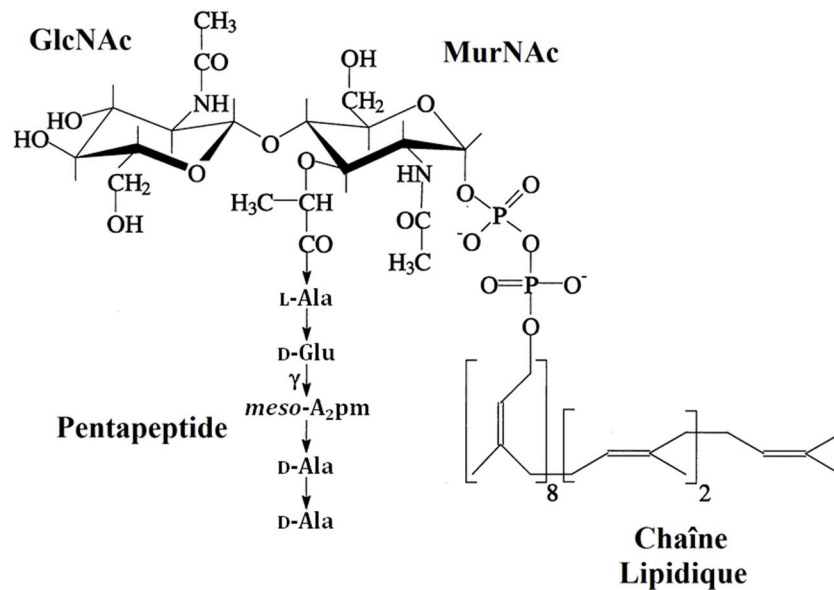


Figure 10 : Structure du lipide II d'une bactérie à Gram négatif.

Cette réaction est catalysée par l'enzyme MurG (également appelée translocase II) et permet ainsi la formation du motif disaccharide-pentapeptide, monomère de base du peptidoglycane, porté par le transporteur lipidique (**Figure 3**). Le gène codant pour la protéine MurG est également localisé au sein du cluster *mra*. Il est unique et essentiel pour la viabilité cellulaire chez *E. coli*, tout comme le gène codant pour MraY (Salmond *et al.*, 1980; Mengin-Lecreulx *et al.*, 1991). MurG est décrite comme une enzyme soluble associée à la face interne de la membrane plasmique. Le fait que MurG soit située du côté cytoplasmique a permis de conclure que le motif disaccharide-pentapeptide était assemblé en amont de la translocation à travers la membrane plasmique (Bupp et van Heijenoort, 1993). La protéine MurG issue d'*E. coli* a été la première à être purifiée (Crouvoisier *et al.*, 1999). Elle est composée de deux domaines séparés par une crevasse au sein de laquelle est situé le site actif (Ha *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2003). Ce dernier est constitué de 13 résidus invariants importants à la fois pour la liaison des différents substrats et pour la catalyse (Crouvoisier *et al.*, 2007).

Le lipide II est synthétisé par MurG sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique. Cependant, la polymérisation du peptidoglycane a lieu au sein du périplasme. Le motif disaccharide-pentapeptide a donc besoin d'être transporté à travers la membrane cytoplasmique pour être pris en charge par les PBPs.

2.2.4. Translocation du lipide II à travers la membrane plasmique :

La translocation du lipide II à travers la membrane plasmique est une étape essentielle dans la voie de biosynthèse du peptidoglycane. A l'heure actuelle, l'identité du ou des différents acteurs impliqués dans ce mécanisme n'a pas été clairement établie.

Il a d'abord été proposé que le lipide II puisse diffuser de manière spontanée à travers la membrane pour atteindre le périplasme (Bugg et Brandish, 1994). Cependant, dans une étude réalisée en 2007, van Dam et ses collaborateurs ont réfuté cette hypothèse en montrant à l'aide d'un lipide II fluorescent qu'une translocation non assistée à travers la membrane n'était pas assez rapide pour subvenir aux besoins de la synthèse du peptidoglycane dans le périplasme. Ils ont également montré que la translocation du lipide II à travers la membrane plasmique faisait intervenir une machinerie

protéique spécialisée ne nécessitant aucune source d'énergie (ATP ou force proton-motrice) (van Dam *et al.*, 2007). C'est dans ce contexte que plusieurs protéines intégrales de membranes ont été proposées comme candidats potentiels au transport du lipide II.

La protéine FtsW ainsi que ses homologues (RodA retrouvée chez *E. coli* et SpoVE chez *B. subtilis*) appartiennent à la famille SEDS (*Shape, Elongation, Division and Sporulation*) et sont depuis longtemps considérés comme des acteurs de ce processus métabolique pour diverses raisons : (i). ces enzymes sont essentielles dans la voie de biosynthèse du peptidoglycane ; (ii). elles sont impliquées dans des complexes multiprotéiques intervenant dans les mécanismes d'élongation et de division (Boyle *et al.*, 1997; Matsushashi *et al.*, 1990) ; (iii). ce sont toutes des protéines intégrales de membrane. Ainsi, FtsW et RodA ont été les premières protéines à avoir été évoquées comme étant potentiellement impliquées dans le transport du lipide II (Höltje, 1998). Par ailleurs, il a été récemment montré que la protéine FtsW d'*E. coli* possédait *in vitro* une activité flippase pour le lipide II au sein de protéoliposomes reconstitués, mais également au sein de vésicules membranaires issues d'une souche d'*E. coli* surexprimant cette même protéine (Mohammadi *et al.*, 2011). Cependant, un autre candidat a également été proposé pour accomplir cette fonction. Il s'agit de la protéine MurJ (ou MviN), qui est une protéine intégrale de membrane appartenant à la superfamille des protéines exportatrices MOP (Multidrug/Oligosaccharidyl-lipid/Polysaccharide) et qui est essentielle à la synthèse du peptidoglycane chez *E. coli* (Inoue *et al.*, 2008; Ruiz, 2008). On retrouve également dans cette superfamille des MOP la protéine Wzx qui est responsable du transport à travers la membrane de différents intermédiaires portés par le C₅₅-PP intervenant dans les voies de biosynthèse de l'antigène O, des LPS ou bien de l'ECA. Cela a donc renforcé l'idée que MurJ puisse être la flippase du lipide II, étant donné que le motif disaccharide-peptide est fixé sur ce même transporteur lipidique. Une étude récente, mettant en jeu un test d'accessibilité du lipide II à la colicine M au sein d'une souche d'*E. coli* $\Delta murJ$, a permis de montrer *in vivo* l'implication de la protéine MurJ dans la translocation du lipide II à travers la membrane plasmique. Ce test a permis de mettre en évidence une absence de dégradation du lipide II par la colicine M suite à l'inactivation de la protéine MurJ, mettant ainsi en avant son implication dans la translocation de ce lipide (Sham *et al.*, 2014). Cependant, l'orthologue de MurJ chez *B. subtilis* n'est pas essentiel à la croissance, suggérant ainsi que cette protéine ne joue pas le rôle de flippase du lipide II chez cette espèce (Fay et Dworkin, 2009). Il a par contre été montré que l'inactivation simultanée des gènes codant pour les protéines MurJ et AmJ chez *B. subtilis* est létale. Par ailleurs, l'expression de la protéine AmJ permet de restaurer la croissance au sein d'une souche d'*E. coli* $\Delta murJ$. Ces deux informations suggèrent que la protéine AmJ possède également une activité flippase pour le lipide II et que les protéines MurJ et AmJ ont donc une fonction redondante (Meeske *et al.*, 2015).

La structure cristallographique de MurJ a récemment été résolue. Elle est constituée de 14 hélices transmembranaires (TMs) qui sont séparées en deux domaines principalement. Les TMs 1 à 6 constituent le domaine N-terminal et les TMs 7 à 12 constituent le domaine C-terminal. Ces deux lobes sont reliés par un axe de pseudo-symétrie d'ordre 2. Les TMs 13 et 14 sont situées à la périphérie du domaine C-terminal. Ces deux hélices permettent la formation d'un sillon hydrophobe qui donne sur une cavité chargée positivement à l'une de ses extrémités, située à l'interface des domaines N-terminal et C-terminal. Une expérience de docking avec du lipide II permet de supposer raisonnablement que le sillon hydrophobe accommoderait la chaîne hydrophobe et que la cavité chargée positivement lierait quant à elle le groupement pyrophosphate ainsi que les sucres. Le pentapeptide se logerait à l'extrémité opposée de la cavité. MurJ existe sous deux états, une forme avec la cavité donnant sur le

cytoplasme et une forme où la cavité centrale donne sur le périplasma. Ces deux états sont en accord avec le transport du lipide II à travers la membrane (**Figure 11**) (Kuk *et al.*, 2017).

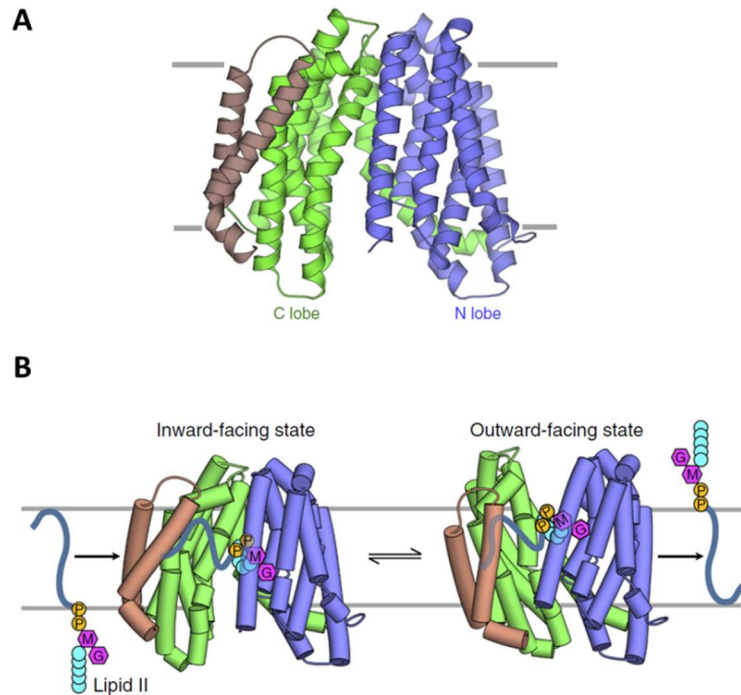


Figure 11 : Structure cristallographique de MurJ de *Thermosiphon africanus* et mécanisme putatif de la translocation du lipide II. A : Structure cristallographique de MurJ_{Ta}. Le lobe N-terminal constitué des TMs 1 à 6 est représenté en bleu. Le lobe C-terminal constitué des TMs 7 à 12 est représenté en vert. Les TMs 13 et 14 sont représentés en marron. B : mécanisme putatif de translocation du lipide II (d'après Kuk *et al.*, 2017).

Il est important de noter qu'à l'heure actuelle, tous ces résultats ne permettent pas de conclure de façon certaine quant à l'identité de la flippase responsable de la translocation du lipide II. En effet, aucune activité *in vitro* de transport du lipide II n'a pu être mise en évidence pour la protéine MurJ (Mohammadi *et al.*, 2011) et aucune activité *in vivo* n'a pu être mise en évidence pour la protéine FtsW (Sham *et al.*, 2014). Il a récemment été montré que la protéine RodA, orthologue de FtsW, possédait une activité glycosyltransférase, suggérant ainsi un rôle similaire pour FtsW (Meeske *et al.*, 2016). D'autre part, la protéine AmJ n'est pas présente chez *E. coli*. L'identité de la protéine responsable du transport du lipide II risque donc de faire débat encore quelque temps.

2.3. Polymérisation du peptidoglycane :

Une fois transloqué du côté périplasmique, le lipide II sert de substrat pour les étapes finales de biosynthèse du peptidoglycane. Ces étapes de polymérisation et de réticulation sont assurées par les « penicillin-binding proteins » (PBPs) qui sont ainsi nommées ainsi car elles sont la cible de cette famille d'antibiotiques. Les PBPs catalysent les réactions de transglycosylation et de transpeptidation nécessaires à l'incorporation du motif disaccharide-peptide au sein du peptidoglycane préexistant (Scheffers et Pinho, 2005). Les glycosyltransférases (GTs) catalysent dans un premier temps la synthèse des nouvelles chaînes de glycanes. Cette réaction est suivie par la transpeptidation s'effectuant entre deux motifs peptidiques situés sur deux chaînes de glycanes adjacentes (une existante et une néo-synthétisée) (**Figure 12**) (Sauvage *et al.*, 2008).

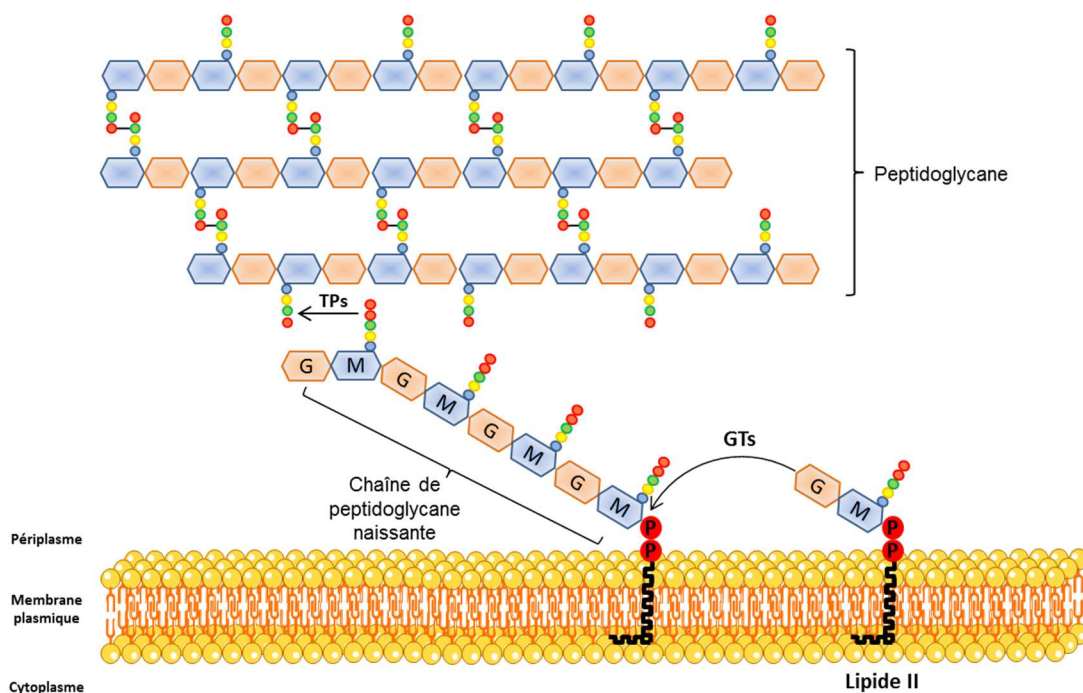


Figure 12 : Polymérisation du peptidoglycane. GTs : glycosyltransférases ; TP : transpeptidases. L'unité disaccharide-pentapeptide est transférée sur une chaîne de peptidoglycane naissante à l'aide d'une glycosyltransférase. Cette chaîne de peptidoglycane naissante est liée au peptidoglycane mature grâce aux transpeptidases.

Les PBP sont classés en deux groupes. On trouve d'une part les PBPs de haute masse moléculaire (HMM PBPs) qui sont des enzymes bifonctionnelles. Elles associent un domaine C-terminal ayant une activité D,D-transpeptidase et un domaine N-terminal ayant soit une activité glycosyltransférase (PBPs de classe A), soit un rôle dans la morphogénèse (PBPs de classe B). D'autre part, on trouve les PBPs de faible masse moléculaire (LMM PBPs) qui sont, elles, monofonctionnelles. Ce sont des D,D-carboxypeptidases, des endopeptidases ou des β -lactamases de classe C (Goffin et Ghuysen, 1998; Sauvage *et al.*, 2008). Certaines, comme les PBP1a et PBP1b d'*E. coli*, font partie de complexes multiprotéiques intervenant respectivement dans la régulation de la biosynthèse du peptidoglycane, l'élongasome et le divisome (Typas *et al.*, 2012; Egan et Vollmer, 2013; Egan *et al.*, 2015).

La polymérisation du peptidoglycane débute donc par une étape de transglycosylation, qui est assurée par le domaine glycosyltransférase (GT) des PBPs. La polymérisation d'une chaîne de glycane s'effectue par additions successives de motifs GlcNAc-MurNAc(-pentapeptide), portés par le lipide II, sur une chaîne de glycane en croissance (Fraipont *et al.*, 2006). Pour cela, le groupement hydroxyle en position C4 du GlcNAc porté par le lipide II va effectuer une attaque nucléophile sur le carbone anomérique en C1 de la chaîne de glycane en croissance (**Figure 12**). La transglycosylation aboutit ainsi à la formation d'une nouvelle liaison β -(1 \rightarrow 4) et entraîne de façon concomitante la libération de C₅₅-PP, qui sera recyclé par la suite en C₅₅-P (Fraipont *et al.*, 2006).

L'étape de transglycosylation est suivie par la réaction de transpeptidation qui permet la formation d'un pont peptidique entre le résidu D-Ala en position 4 d'un pentapeptide donneur et l'acide diaminé en position 3 d'un pentapeptide accepteur (Goffin et Ghuysen, 1998; Sauvage *et al.*, 2008). L'énergie nécessaire à la formation de cette nouvelle liaison peptidique est fournie par la rupture de la liaison D-Ala-D-Ala du pentapeptide donneur. Ces ponts interpeptidiques, de type 4 \rightarrow 3,

sont classiquement synthétisés par le domaine D,D-transpeptidase des PBP en suivant un mécanisme en deux étapes. Tout d'abord, il y a la formation d'un acyl-enzyme entre une sérine catalytique et la fonction carboxyle du résidu de D-Ala en position 4 du pentapeptide donneur, ce qui entraîne le départ du résidu de D-Ala terminal. L'acyl-enzyme est ensuite attaqué par la fonction amine du pentapeptide accepteur, ce qui aboutit à la formation d'une nouvelle liaison peptidique (**Figure 13**) (Sauvage *et al.*, 2008).

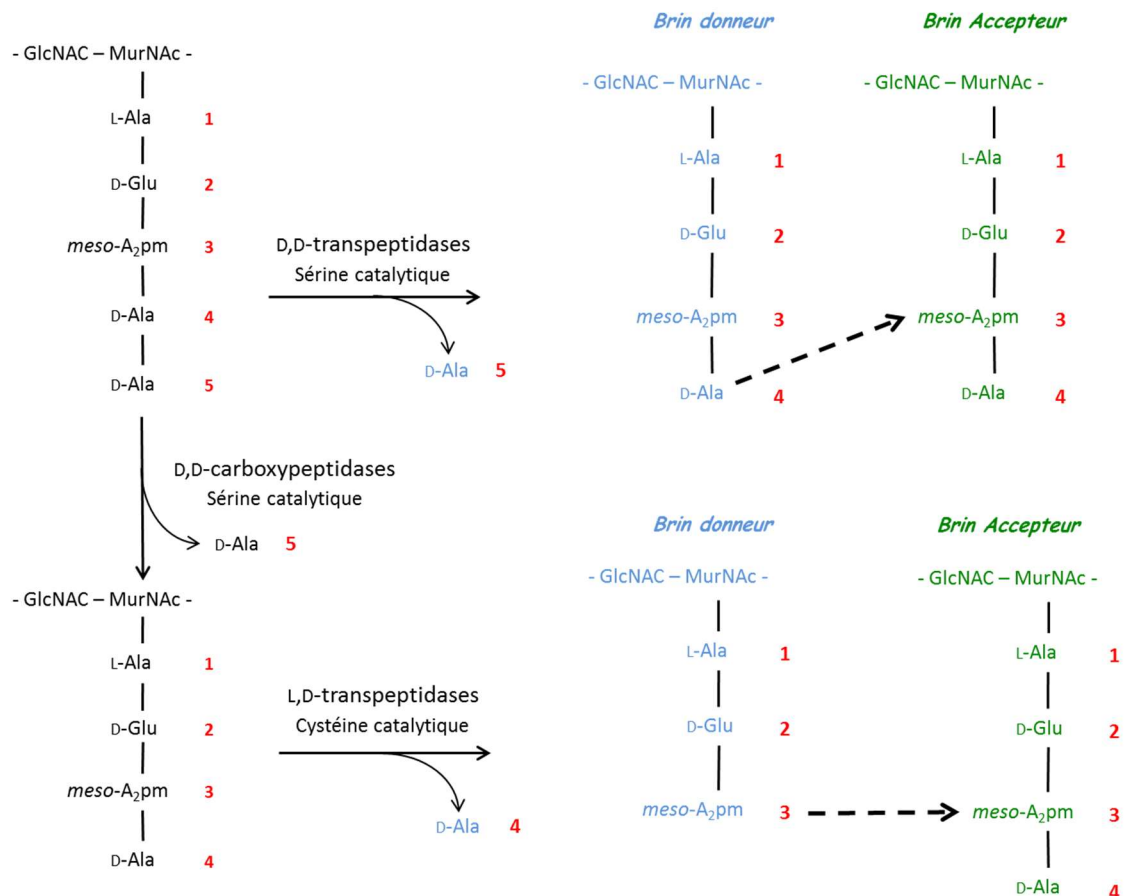


Figure 13 : Voies de transpeptidation. Le pontage formé par les D,D-transpeptidases est de type 4→3. Le pontage formé par les L,D-transpeptidases est de type 3→3.

D'autres protéines intervenant dans la réticulation du peptidoglycane ont également été identifiées : les L,D-transpeptidases. Ces enzymes synthétisent des ponts interpeptidiques de type 3→3 (Mainardi *et al.*, 2002, 2008; Magnet *et al.*, 2008). Le mécanisme catalytique de cette famille d'enzymes est similaire à celui des D,D-transpeptidases à quelques différences près : (i). le résidu catalytique impliqué dans la formation de l'acyl-enzyme est une cystéine ; (ii). le donneur d'acyl est un térapeptide provenant d'un pentapeptide ayant été préalablement digéré par une D,D-carboxypeptidase (**Figure 13**) (Sacco *et al.*, 2010). Les L,D transpeptidases sont également responsables de l'attachement de la lipoprotéine de Braun au peptidoglycane chez *E. coli*. Elles permettent en effet la formation d'un pont de type 3→3 entre le résidu de L-Lys situé à l'extrémité C-terminale de cette protéine et le meso-A₂pm du peptide donneur (Magnet *et al.*, 2007).

La nature des ponts interpeptidiques présentés jusqu'ici (4→3 et 3→3) ne reflète pas la diversité des ponts peptidiques retrouvée au sein de l'ensemble du monde bactérien. En effet, la nature de ces ponts va dépendre de la composition du lipide II, qui peut varier en fonction des espèces

bactériennes. Cet aspect concernant la variabilité de structure du peptidoglycane sera développé plus loin dans le manuscrit.

3. Recyclage du peptidoglycane :

Une fois polymérisé au sein du périplasma, le peptidoglycane n'est pas une structure figée. Au contraire, il s'agit d'une structure dynamique qui subit de nombreuses modifications lors des étapes d'élongation ou de division cellulaire. Ces modifications se traduisent par des réarrangements au niveau des liaisons (Höltje et Tuomanen, 1991) et par un recyclage partiel des métabolites libérés lors de ces modifications (**Figure 14**) (Goodell, 1985).

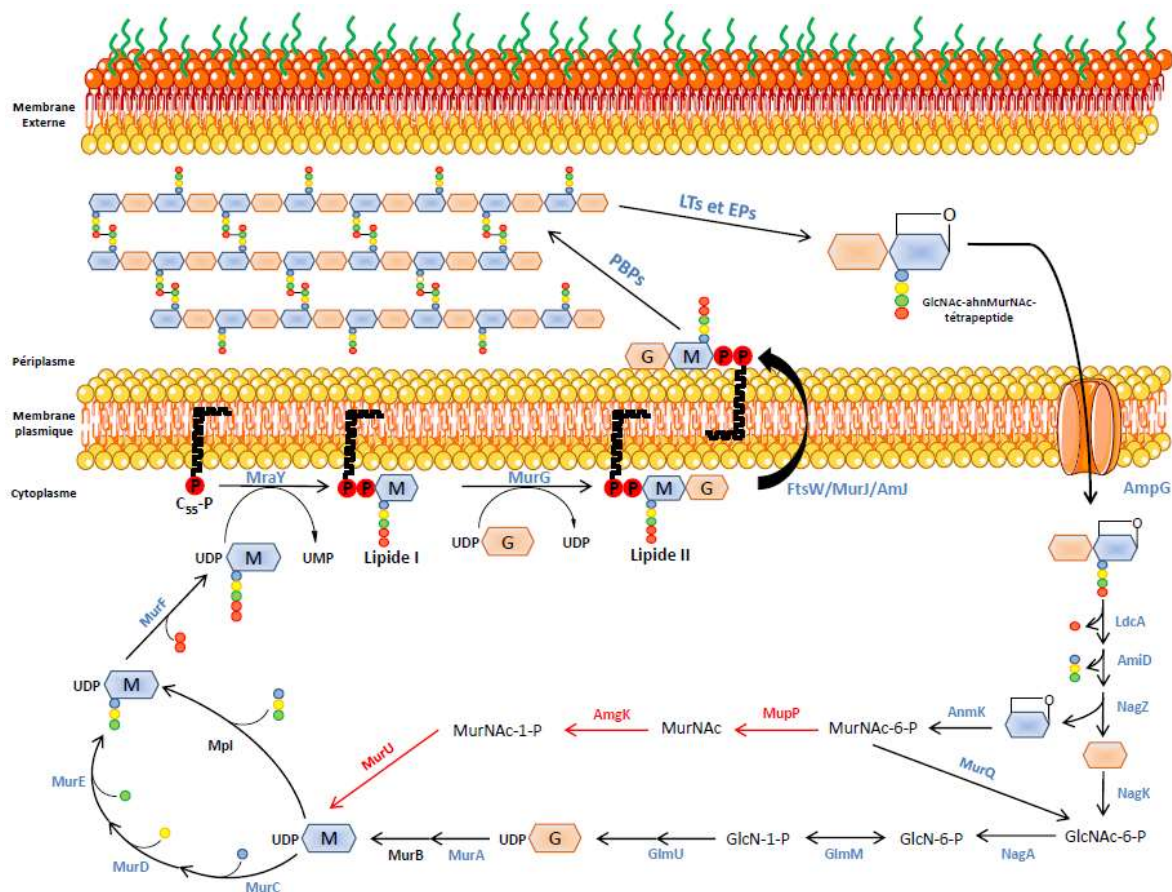


Figure 14 : Schéma de la biosynthèse et du recyclage du peptidoglycane. Les flèches rouges correspondent à la voie de recyclage annexe identifiée chez les bactéries du genre *Pseudomonas*.

Chez *E. coli*, ces modifications sont effectuées par 35 hydrolases. Elles appartiennent à 12 familles distinctes incluant des glycosidases, des peptidases et des amidases (van Heijenoort, 2011; Vollmer *et al.*, 2008c). Le remaniement du peptidoglycane, notamment par les endopeptidases (EP) responsables du clivage des ponts interpeptidiques et par les transglycosylases lytiques, conduit à la libération de métabolites qui peuvent être recyclés. Chez *E. coli*, le peptidoglycane est recyclé à hauteur de 50% à chaque génération (Park et Uehara, 2008). Ainsi, les transglycosylases lytiques (LT), telles que la protéine soluble Slt70, sont responsables de la coupure de la liaison $\beta 1 \rightarrow 4$ entre le MurNAc et le GlcNAc. Lors de cette coupure, les LT catalysent également la formation d'une liaison intramoléculaire 1,6-anhydro entre le C1 et le C6 du MurNAc. Les LT libèrent donc dans le périplasma des GlcNAc-anhMurNAc-tétrapeptides ou tripeptides qui sont ensuite spécifiquement réimportés dans

le cytoplasme par la perméase AmpG. Une fois dans le périplasme, ces anhydro-muropeptides vont être dégradés en monosaccharides sous l'action de la β -N-acétylglucosaminidase NagZ. L'anhMurNAc-tétrapeptide libéré est ensuite substrat de l'amidase AmpD, ce qui conduit à la libération du tétrapeptide. AmpD peut également agir en amont de NagZ, directement sur le disaccharide. La L,D-carboxypeptidase LdcA dégrade le tétrapeptide libéré en tripeptide (Templin *et al.*, 1999; Das *et al.*, 2013). Ce dernier peut alors être transféré en bloc sur l'UDP-MurNAc par la Mur ligase Mpl (Mengin-Lecreux *et al.*, 1996; Hervé *et al.*, 2007). L'UDP-MurNAc-tripeptide formé réintègre alors la voie de biosynthèse du peptidoglycane. Les monosaccharides générés suite à l'action des protéines NagZ et AmpD vont être recyclés selon une voie particulière faisant intervenir les enzymes NagA, NagK, AnmK et MurQ : la protéine NagK est responsable de la phosphorylation du GlcNAc pour former du GlcNAc-6-P. Ce dernier est ensuite pris en charge par la désacétylase NagA afin de former du GlcN-6-P, substrat de GlmM, protéine de la voie de biosynthèse *de novo* du peptidoglycane. Le 1,6-anhydroMurNAc est quant à lui dans un premier temps phosphorylé par la protéine AnmK pour former du MurNAc-6-P. L'enzyme MurQ réalise ensuite la conversion du MurNAc-6-P en GlcNAc-6-P, substrat de NagA.

Chez *P. aeruginosa*, il existe une autre voie de recyclage pour l'anhMurNAc libéré après coupure du GlcNAc-anhMurNAc par NagZ. Suite à l'action de la protéine AnmK, le MurNAc-6-P produit est déphosphorylé par la protéine MupP pour former du MurNAc. Ce dernier va alors être phosphorylé sur le carbone 1 donnant ainsi du MurNAc-1-P. L'enzyme MurU est responsable de l'uridylation de ce dernier, permettant ainsi la formation d'UDP-MurNAc. Cette voie de recyclage annexe permet d'éviter de repasser par la voie de biosynthèse *de novo* de l'UDP-MurNAc (**Figure 14**) (Fumeaux et Bernhardt, 2017).

4. Variabilité du peptidoglycane :

Bien que la voie de biosynthèse du peptidoglycane soit globalement conservée au sein du monde bactérien, la structure du peptidoglycane présente, elle, une certaine variabilité d'une espèce à l'autre (Schleifer et Kandler, 1972; Vollmer *et al.*, 2008a). Cette variabilité est également dépendante de certains facteurs comme la richesse du milieu, la phase de croissance, la présence de mutations dans certains gènes ou bien la présence d'antibiotiques dans le milieu (Mainardi *et al.*, 2008). Le peptidoglycane peut alors subir de nombreuses modifications.

4.1. Variabilité des chaînes de glycanes :

Le nombre de modifications recensées au niveau des chaînes de glycanes est relativement faible et la plus grande variabilité observée concerne leur longueur. Des chaînes composées de 2 à 60 unités disaccharidiques ont été observées. Il a été montré que la longueur moyenne de ces chaînes était comprise entre 5 et 10 unités chez *E. coli* (Harz *et al.*, 1990) et entre 3 et 10 unités chez *S. aureus*. Une telle variabilité de longueur de chaîne est également observée au sein d'une même espèce puisque chez *S. aureus*, des chaînes d'une longueur supérieure à 26 unités disaccharidiques représenteraient de 10 à 15% du total des chaînes glycanes (Boneca *et al.*, 2000). La polymérisation de ces chaînes est assurée par l'activité transglycosylase des PBPs ou de transglycosylases monofonctionnelles. Il a récemment été montré que l'interaction de la PBP1b avec la lipoprotéine LpoB était importante pour contrôler l'activité transglycosylase de cette PBP mais aussi pour contrôler la longueur des chaînes polymérisées (Markovski *et al.*, 2016; Arthur, 2016).

L'extrémité réductrice des chaînes osidiques présente également des différences entre les bactéries à Gram négatif et à Gram positif. En effet, chez les bactéries à Gram négatif, on retrouve majoritairement en bout de chaîne un résidu 1,6-anhydroMurNAc alors que chez les bactéries à Gram positif, on retrouve un résidu réducteur MurNAc classique. Au sein du peptidoglycane, on retrouve également des résidus GlcNAc et MurNAc désacétylés pour former des résidus GlcN et MurN. Le résidu MurNAc est également la cible d'autres modifications. Il peut subir une O-acétylation au niveau du C6 aboutissant à la formation d'un sucre diacétylé. Cette modification est retrouvée chez des espèces pathogènes à Gram positif telles que *S. aureus* et à Gram négatif telles que *H. pylori*. Chez les mycobactéries et les corynébactéries, l'acide muramique est glycolylé au niveau de sa fonction amine. Un dernier type de modification, la phosphorylation du C6 des deux oses, est uniquement retrouvé chez certaines bactéries à Gram positif chez lesquelles la présence de ce groupement phosphate permet de fixer au peptidoglycane, *via* une liaison phosphodiester, des polymères de surface tels que les acides teichoïques, les arabinogalactanes ou bien les polysaccharides de capsule. L'ensemble de ces modifications confère très souvent une résistance accrue à l'action de muramidases comme le lysozyme (**Figure 15**) (Vollmer, 2008).

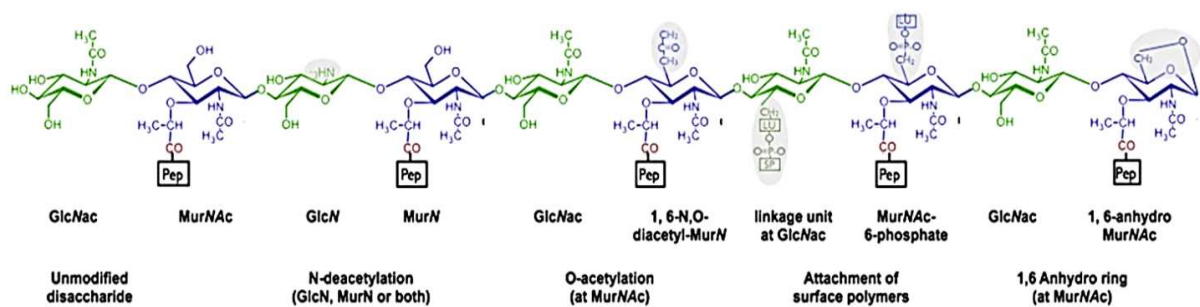


Figure 15 : Variabilité des chaînes de glycanes. A gauche est représentée l'unité monomérique du peptidoglycane non modifiée sur sa partie saccharidique. En progressant vers la droite, les différentes modifications pouvant avoir lieu sur les chaînes de glycanes sont représentées. Pep : peptide ; SP : Surface Polymer ; LU : Linkage Unit (d'après Münch et Sahl, 2015).

4.2. Variabilité de la partie peptidique :

La variabilité de la partie peptidique du peptidoglycane retrouvée au sein du monde bactérien est le résultat de modifications qui vont intervenir au niveau de : (i). la nature des acides aminés entrant dans la composition du pentapeptide ; (ii). la composition ou le type des ponts interpeptidiques ; (iii). la modification des résidus incorporés au sein du pentapeptide ; (iv). le taux de pontage du peptidoglycane.

Avant les étapes de transpeptidation, les chaînes de peptidoglycane naissantes sont composées d'une alternance de GlcNAc et de MurNAc-pentapeptide. La composition de ce pentapeptide la plus commune est L-Ala-γ-D-Glu-*meso*-A₂pm-D-Ala-D-Ala. Cependant, sa composition peut varier en fonction des espèces bactériennes. La variabilité alors observée est due à la spécificité de substrat des Mur ligases, qui diffère en fonction des espèces. MurC, responsable de l'ajout de l'acide aminé en position 1, ajoute dans la grande majorité des cas un résidu L-Ala et plus rarement un résidu Gly (*Mycobacterium leprae* et *Brevibacterium imperiale*) ou L-Ser (*Butyrivibacterium rettgeri*). MurD ajoute quant à elle uniquement du D-Glu en position 2. MurE est la Mur ligase qui possède la plus grande variabilité de substrat. De manière générale, MurE est responsable de l'ajout de *meso*-A₂pm en

position 3 chez les bactéries à Gram négatif et de L-Lys chez les bactéries à Gram positif. Chez certaines espèces, MurE est en revanche responsable de l'ajout d'acides diamminés (L-ornithine, L,L-A₂pm, meso-lanthionine, acide L-2,4-diaminobutyrique) ou monoaminés (L-homosérine, L-Ala, L-Glu) particuliers. Enfin, MurF est responsable de l'ajout des deux derniers acides aminés sous la forme d'un dipeptide, le plus souvent D-Ala-D-Ala. Le dernier acide aminé peut parfois être remplacé par un résidu D-Lac ou D-Ser (**Figure 16 A**) (Vollmer *et al.*, 2008a).

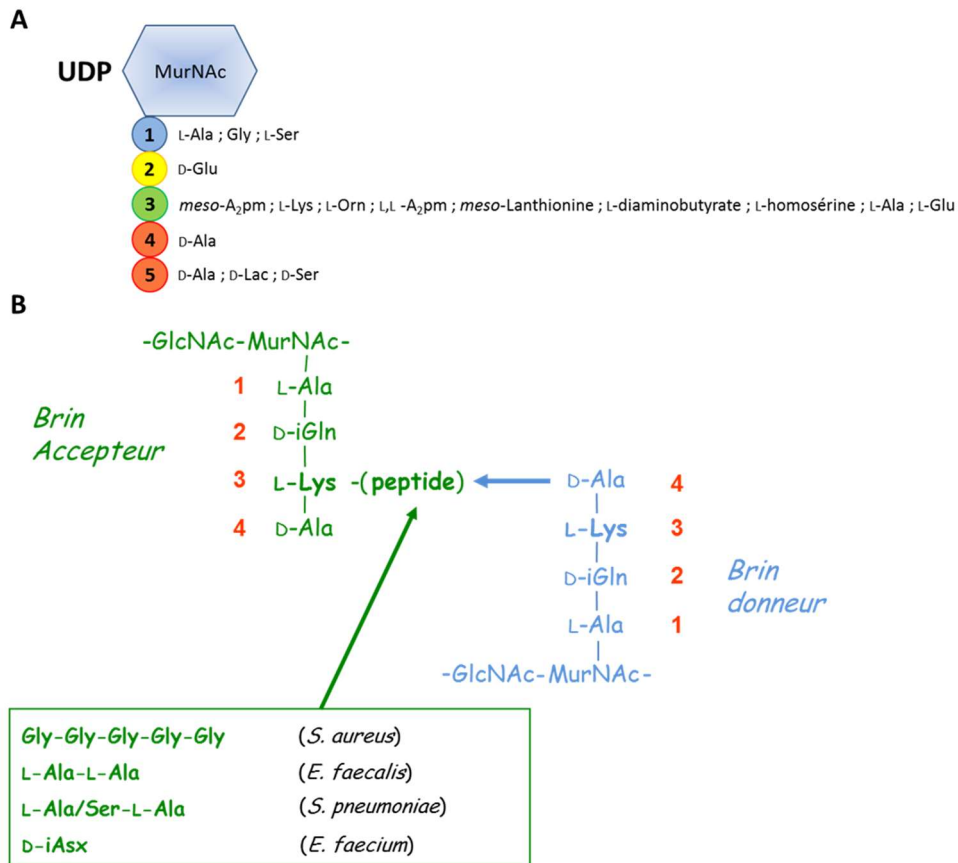


Figure 16 : Variabilité de la partie peptidique. A : Variabilité de la composition du pentapeptide. Pour chaque position, les différents acides aminés qui peuvent être incorporés sont mentionnés. B : Exemples de ponts interpeptidiques retrouvés chez les bactéries à Gram positif.

Chez les bactéries à Gram négatif, le pontage entre deux chaînes de glycane est le plus souvent direct. En revanche, il nécessite généralement l'intervention d'un pont interpeptidique chez les bactéries à Gram positif. La longueur de ce pont peut varier entre 2 et 7 résidus et la nature de ces résidus est variée : Gly, L-Ala, L ou D-ser, D-Asn ou D-Asp, L ou D-Glu... Ainsi on peut retrouver un pont constitué de 5 glycines chez *S. aureus* (Schneider *et al.*, 2004), un pont de type L-Ala-L-Ala chez *E. faecalis* (Bouhss *et al.*, 2001), ou encore L-Ser-L-Ala ou L-Ala-L-Ala chez *S. pneumoniae* (Fiser *et al.*, 2003)... (**Figure 16 B**). Pour la plupart, ces peptides sont ajoutés au niveau du lipide II par des enzymes spécifiques, les Fem transférases, à partir d'aminoacyl-ARNt. Par exemple, les protéines FemX, FemA et FemB chez *S. aureus* sont responsables de la synthèse du pont penta-glycine *via* les ajouts successifs de la première glycine (FemX), des deux suivantes (FemA) et enfin des deux dernières (FemB) au niveau du groupement amine ε de la L-Lys en position 3 du lipide II (Schneider *et al.*, 2004). Chez *Enterococcus faecium*, le pont interpeptidique est composé d'un unique acide aminé de configuration D, le D-Asp.

Dans ce cas, le pontage n'est pas réalisé par une Fem transférase mais par la protéine Asl_{fm} appartenant à la famille des « ATP-grasp » (Bellais *et al.*, 2006).

Au sein du peptidoglycane, on trouve également d'autres types de pontages, notamment des pontages de type 3→3 formés par les L,D-transpeptidases, comme évoqué précédemment (Magnet *et al.*, 2008). Chez les corynébactéries, on trouve également un type de pontage particulier de type 4→2 entre le D-Ala d'un peptide donneur et le D-Glu d'un peptide accepteur. Ce type de pontage se fait entre deux groupes carboxyles et nécessite un pont interpeptidique contenant un acide diaminé (Schleifer et Kandler, 1972). Par ailleurs, le lipide II peut servir de substrat à la fixation de protéine. Ainsi, chez *S. aureus*, la protéine sortase A est responsable de la fixation de protéines de surface directement sur le lipide II. Cette liaison a lieu entre la thréonine C-terminale de la protéine de surface et le pont penta-glycine. Cette modification a lieu du côté périplasmique après les translocations respectives de la protéine de surface *via* le système Sec et du lipide II (Perry *et al.*, 2002).

D'autre part, certains acides aminés incorporés au sein du pentapeptide peuvent éventuellement subir certaines modifications par la suite. Ainsi, chez certaines espèces, une partie ou la totalité des résidus D-Glu en position 2 et/ou *meso*-A₂pm en position 3 sont retrouvés sous forme amidée. Par exemple, chez *Corynebacterium glutamicum*, l'enzyme LtsA catalyse l'amidation du *meso*-A₂pm au niveau du groupement carboxyle, en utilisant la L-glutamine comme donneur de groupement amine (Levefaudes *et al.*, 2015). Chez *S. aureus*, les protéines GatD et MurT sont responsables de l'amidation du D-Glu (Figueiredo *et al.*, 2012; Münch *et al.*, 2012). Chez *Mycobacterium smegmatis*, il a été montré que la partie peptidique pouvait subir de nombreuses modifications. Ainsi, les résidus D-Glu, *meso*-A₂pm et D-Ala en position 5 pouvaient à la fois être amidés au niveau de leur fonction acide carboxylique libre mais également être méthylés. Ces dernières modifications pouvaient se retrouver combinées de différentes manières et également être associées à d'autres concernant la sous-unité muramique (déacétylation ou glycolylation) (Mahapatra *et al.*, 2005).

L'ensemble des modifications mentionnées jusqu'à présent s'établissent généralement au niveau du lipide II. Cependant, chez certaines bactéries comme les bactéries lactiques, ces modifications peuvent intervenir plus précocement, au niveau de l'UDP-MurNAc-pentapeptide (Chapot-Chartier et Kulakauskas, 2014).

Enfin, le pourcentage de sous-unités peptidiques impliquées dans la formation de ponts interpeptidiques peut varier d'une espèce à l'autre. Ainsi, chez *E. coli*, le taux de pontage s'élève à 20% environ alors que chez *S. aureus*, ce taux atteint jusqu'à 95% (Rogers *et al.*, 1980).

II. Les antibiotiques :

Bien que le système immunitaire soit un système de défense efficace, les bactéries pathogènes peuvent, par leur vitesse de multiplication ou par la mise en place de mécanismes leur permettant d'y échapper, être à l'origine de pathologies plus ou moins sévères. Pour faire face à ce type d'infection et éliminer ou empêcher le développement des bactéries pathogènes, le recours aux antibiotiques est nécessaire. Ces molécules aux propriétés antimicrobiennes sont naturellement produites par de nombreux microorganismes afin d'éliminer d'autres microorganismes avec lesquels ils sont en compétition au sein d'une niche écologique donnée. La découverte par l'homme de ce type de molécules a été réalisée par Alexander Fleming, qui en 1928 observa qu'une souche de *Penicillium notatum* était capable d'inhiber la croissance d'une souche de *S. aureus* (Fleming, 1929). Le nom donné à la substance ainsi mise en évidence, la pénicilline, dérive du nom de la souche productrice. Suite à cette découverte, de nombreuses molécules antibiotiques de natures variées et ayant des cibles différentes ont été découvertes.

1. Les différentes cibles des antibiotiques :

Pour exercer leur action, les antibiotiques agissent sur différents mécanismes cellulaires. Ils peuvent ainsi empêcher/inhiber la synthèse des acides nucléiques (ADN et ARNm), des protéines ou bien de la paroi bactérienne (**Figure 17**).

Les antibiotiques responsables de l'inhibition de la réplication de l'ADN appartiennent à la famille des quinolones. Ces molécules ont pour cible deux topoisomérases : la gyrase et la topoisomérase IV. Elles forment un complexe ADN-topoisomérase-quinolone qui est responsable d'un arrêt de la machinerie de réplication au niveau des fourches de réplication. La formation de ce complexe empêche la réunification des brins d'ADN après leur coupure (Drlica *et al.*, 2008). L'action des quinolones se traduit donc par un arrêt de la synthèse d'ADN, ce qui a un effet bactériostatique immédiat et conduit par la suite à la mort bactérienne.

Les antibiotiques qui inhibent les étapes de la transcription, et donc la synthèse des ARNm, font partie de la famille des rifamycines. Ces molécules sont responsables d'un arrêt de la transcription par liaison à l'ARN polymérase. Elles bloquent ainsi la formation de la chaîne d'ARNm, ce qui conduit à un arrêt de la synthèse protéique. Ces molécules sont actives sur les bactéries à Gram positif, mais beaucoup moins sur les bactéries à Gram négatif. Cette différence d'activité est liée à une différence dans l'import de ce type de molécules entre les espèces bactériennes, limité par la barrière de la membrane externe (Floss et Yu, 2005). L'antibiotique le plus connu appartenant à cette famille d'antibiotiques est la rifampicine.

L'arrêt de la synthèse protéique par des antibiotiques se fait au niveau des ribosomes. Le ribosome bactérien est constitué de deux sous-unités principales, la 50S et la 30S. Les antibiotiques responsables de l'inhibition de la synthèse protéique ciblent l'une ou l'autre de ces deux sous-unités. Ainsi, la sous-unité 50S est la cible des macrolides (ex. : érythromycine), des lincosamides (ex. : lincomycine), des streptogramines (ex. : dalfopriline), des phénicolés (ex. : chloramphénicol) et des oxazolidinones (ex. : linezolid). Ces molécules interfèrent en général avec l'étape d'initiation de la traduction ou avec le transfert des ARNt *via* une inhibition stérique. L'activité de ces molécules est souvent diminuée dès lors que la chaîne polypeptidique a atteint une certaine taille. Les molécules

ciblant la sous-unité 30S appartiennent quant à elles à la famille des tétracyclines ou des aminoglycosides (ex. : streptomycine, kanamycine, gentamicine). Ces derniers interagissent avec l'ARNr 16S et induisent un changement de conformation qui va être à l'origine d'un mauvais appariement entre le codon et l'anticodon, conduisant ainsi à des erreurs lors de la traduction. Les tétracyclines, elles, empêchent la liaison des ARNt au ribosome (Lambert, 2012).

Les β -lactamines et les glycopeptides sont les deux classes majeures d'antibiotiques qui interfèrent avec la synthèse de la paroi bactérienne. L'action de ces antibiotiques conduit à des changements morphologiques qui sont à l'origine d'un stress pour la bactérie cible et qui conduisent à sa mort.

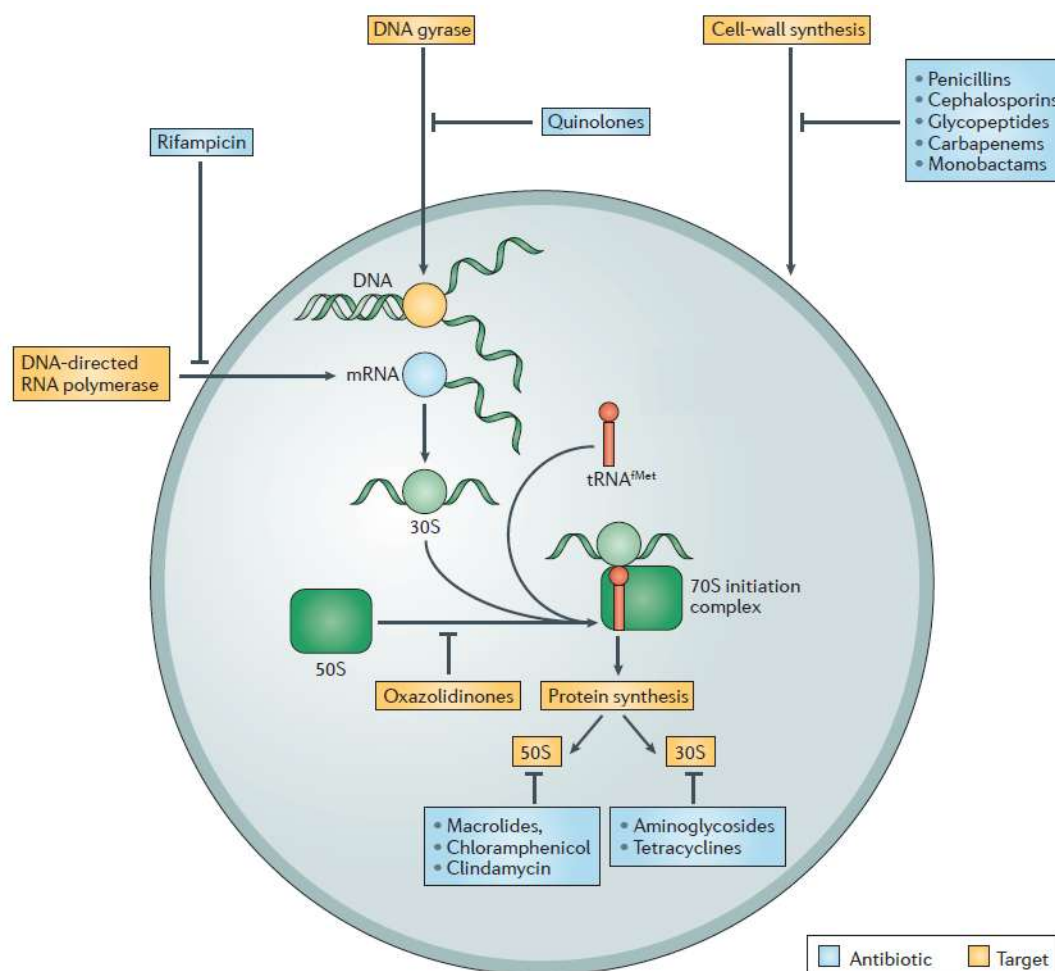


Figure 17 : Cibles cellulaires des antibiotiques. Les principales cibles cellulaires des antibiotiques sont représentées : synthèse des acides nucléiques, synthèse protéique et synthèse de la paroi bactérienne. Sur ce schéma, chaque grande famille d'antibiotiques est associée à la cible cellulaire contre laquelle elle est dirigée (d'après Lewis, 2013).

2. Les antibiotiques qui ciblent la biosynthèse de la paroi bactérienne :

Constituant essentiel et spécifique du monde bactérien, le peptidoglycane constitue une cible préférentielle et privilégiée dans la lutte contre les microorganismes pathogènes. De nombreuses molécules antibiotiques ciblent ainsi sa voie de biosynthèse. Les exemples qui seront mentionnés par la suite concernent des molécules qui sont actuellement utilisées cliniquement pour traiter des infections causées par des bactéries pathogènes.

2.1. Exemple de la fosfomycine qui cible une étape cytoplasmique de la biosynthèse du peptidoglycane :

La fosfomycine est un antibiotique qui est à l'origine produit par les *Streptomyces* (Hendlin *et al.*, 1969). Cet antibiotique possède un large spectre d'activité puisqu'il agit à la fois sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Il pénètre à l'intérieur de la cellule par deux systèmes d'import permettant le transport actif soit du L- α -glycérophosphate, soit du glucose-6-phosphate (El Zoeiby *et al.*, 2003). La fosfomycine est un analogue structural du PEP et inhibe ainsi l'enzyme cytoplasmique MurA, en se liant de façon covalente et irréversible au niveau du résidu catalytique Cys115 (Eschenburg *et al.*, 2005).

2.2. Exemple de la bacitracine qui cible une étape du métabolisme de l'undécaprényl phosphate :

La bacitracine est un antibiotique produit par voie non ribosomique qui interagit spécifiquement avec l'undécaprényl pyrophosphate libéré du côté périplasmique de la membrane interne suite aux étapes de polymérisation du peptidoglycane. Il s'agit d'un mélange de polypeptides cycliques produits par *Bacillus licheniformis* et certaines souches de *B. subtilis* (Ming et Epperson, 2002). La bacitracine séquestre le C₅₅-PP et empêche sa déphosphorylation. Il ne peut alors plus être réutilisé dans la voie de biosynthèse du peptidoglycane et la seule source de C₅₅-P provient de la synthèse *de novo*, qui ne suffit plus pour couvrir les besoins de la cellule.

2.3. Les antibiotiques ciblant les étapes de polymérisation du peptidoglycane :

Les β -lactamines sont les antibiotiques qui sont le plus utilisés au niveau clinique pour traiter les infections bactériennes. Ces molécules ciblent spécifiquement les étapes de transpeptidation lors de la polymérisation du peptidoglycane. On retrouve au sein de cette famille d'antibiotiques les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames (Kohanski *et al.*, 2010). Ces quatre types de molécules possèdent toutes au moins un cycle β -lactame qui est à l'origine de l'activité antimicrobienne. Ce cycle mime la structure du dipeptide D-Ala-D-Ala qui se trouve à l'extrémité du pentapeptide du lipide II (Tipper et Strominger, 1968). Cette ressemblance avec le dipeptide terminal leur permet d'interagir avec les transpeptidases impliquées dans la réticulation du peptidoglycane. Cette interaction est responsable de la formation d'un complexe penicillinoyl-enzyme inactif suite à la création d'une liaison covalente entre la protéine et l'antibiotique (**Figure 18**) (Waxman *et al.*, 1980). L'inhibition de la réaction de transpeptidation est responsable de la désorganisation de la structure du peptidoglycane, qui ne peut plus assurer sa fonction, entraînant ainsi la lyse de la bactérie cible.

Les réactions de transglycosylation peuvent également être inhibées, notamment par les moénomycines, qui imitent le groupement pyrophosphate du lipide II et se fixent au niveau du site impliqué dans la réaction de transglycosylation (Lovering *et al.*, 2007).

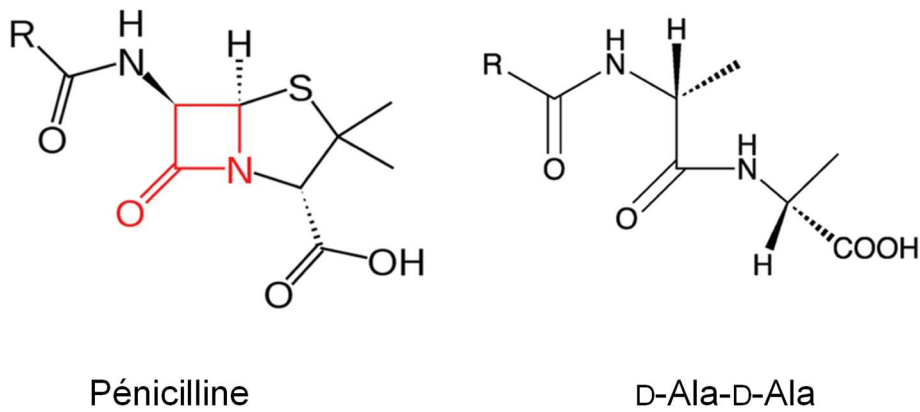


Figure 18 : Homologie structurale entre la pénicilline et le dipeptide terminal D-Ala-D-Ala. Le cycle β -lactame est représenté en rouge (d'après Zeng et Lin, 2013).

2.4. Les molécules antimicrobiennes ciblant le lipide II :

Le lipide II est une molécule essentielle impliquée dans la voie de biosynthèse du peptidoglycane, directement accessible au sein de l'espace périplasmique. Cette particularité en fait donc une cible de choix pour de nombreux antibiotiques.

Les peptides antimicrobiens cationiques (CAMPs) sont produits par tous les organismes vivants. Ces peptides peuvent être issus d'une synthèse ribosomale ou non. Ils sont souvent le siège d'un nombre important de modifications post-traductionnelles. Ces molécules sont de nature amphiphile et cationique, ce qui leur permet d'interagir avec les membranes dont les phospholipides sont chargés négativement (Münch et Sahl, 2015). Il a d'abord été imaginé que tous ces peptides antimicrobiens possédaient un mécanisme d'action ionophorique commun responsable de la mort des micro-organismes cibles (Zasloff, 2002). Il semble cependant que ces peptides antimicrobiens n'agissent pas tous de la même manière. Certains d'entre eux interfèrent avec la voie de biosynthèse du peptidoglycane en ayant pour cible le lipide II (Barreteau *et al.*, 2017) :

- Les **défensines** sont des CAMPs de petite taille (3,5 à 6 kDa), riches en cystéine, produits par les eucaryotes (plantes, invertébrés, vertébrés) et qui sont impliqués dans l'immunité innée. Parmi la multitude de défensines identifiées à ce jour dans le monde vivant, certaines sont capables d'inhiber la synthèse de la paroi bactérienne en liant le lipide II. C'est notamment le cas de l'oryzeasine, de l'eurocine et de la plectasine, produites respectivement par les champignons *Aspergillus oryzae*, *Eurotium amstelodani* et *Pseudoplectina nigrella* (Schneider *et al.*, 2010). Leur cytotoxicité a été mise en évidence contre des souches de bactéries à Gram positif, telles que *S. aureus* ou *S. pneumoniae* (Andes *et al.*, 2009).
- Les **lantibiotiques** constituent une large famille de CAMPs. Ces peptides se caractérisent par la présence d'un ou plusieurs cycles lanthionine ainsi que par la présence d'acides aminés inhabituels tels que la didéhydroalanine (Dha) ou la didéhydrobutyrine (Dhb), qui sont respectivement issus de la déshydratation d'une sérine ou d'une thréonine. La genèse des cycles lanthionines est le résultat de modifications post-traductionnelles. Ainsi, la création d'une liaison thioéther entre un résidu Dha et une cystéine aboutit à la formation d'un cycle lanthionine. De la même manière, un cycle β -méthyllanthionine résulte de la formation d'une liaison thioéther entre un résidu Dhb et une cystéine (Bauer et Dicks, 2005). Ce type de cycle confère une structure tridimensionnelle

unique à ces peptides. Il existe différentes classes de lantibiotiques : classe A, classe B et à deux composantes. La nisine, produite par *Lactococcus lactis*, est le lantibiotique de classe A qui est le plus étudié. Elle est notamment utilisée dans l'industrie agro-alimentaire comme agent conservateur du fait de ses propriétés antimicrobiennes (Hansen, 1994). Elle a pour cible le lipide II dont elle se sert comme point d'ancrage pour former des pores au niveau de la membrane plasmique des bactéries à Gram positif (van Heusden *et al.*, 2002). Elle est constituée de 34 acides aminés (**Figure 19**).

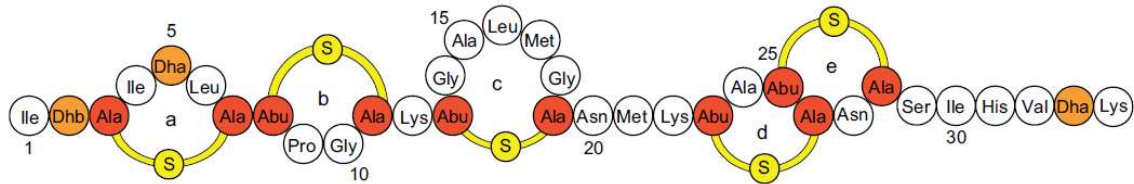


Figure 19 : Structure primaire de la nisine. La liaison thioéther permettant la formation des cycles lanthionine (Ala-S-Ala : cycle lanthionine ; Abu-S-Ala : cycle β -méthyllanthionine) est colorée en jaune. Les acides aminés Dha (didéhydroalanine) et Dhb (didéhydrobutyryne), qui sont des acides aminés déshydratés, sont colorés en orange. (d'après de Kruijff *et al.*, 2008).

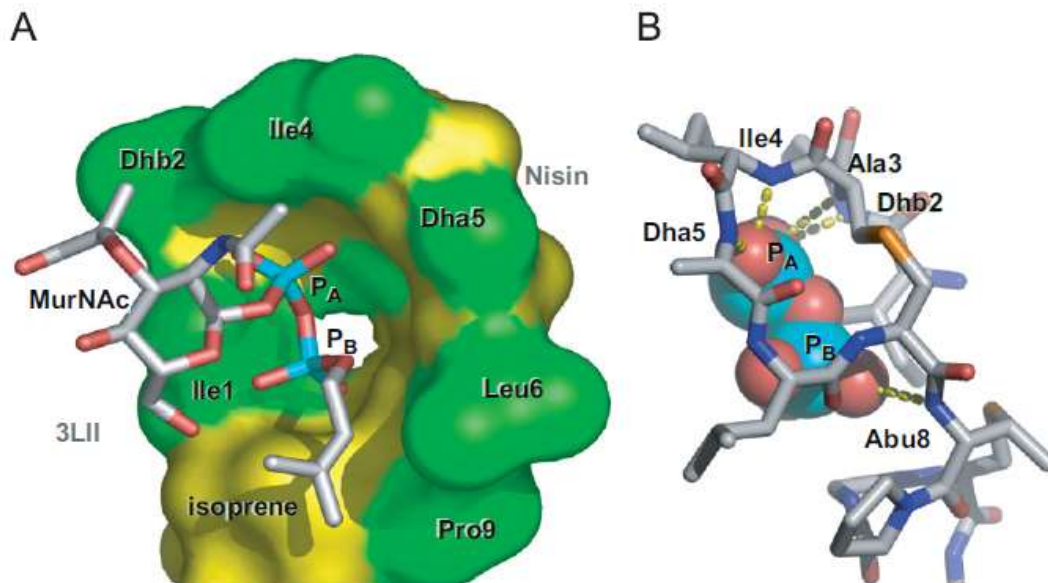


Figure 20 : Structure tridimensionnelle de la nisine en complexe avec le lipide II. A : Représentation de la surface des résidus 1 à 12 de la nisine. La surface des atomes de la chaîne principale est représentée en jaune et celle des atomes des chaînes latérales en vert. Le lipide II utilisé lors de la résolution du complexe (3LII) est un lipide II soluble dont la chaîne lipidique ne possède que 15 atomes de carbone. Les atomes de carbone, oxygène, azote et phosphate sont colorés respectivement en gris, rouge, bleu, et turquoise. Le 3LII est représenté en « stick ». Il apparaît clairement que la nisine entoure le groupement pyrophosphate. B : Représentation des liaisons hydrogène entre le groupement pyrophosphate du lipide II et les atomes de la chaîne principale de la nisine. Les liaisons hydrogène sont représentées par des lignes en pointillés jaunes. La nisine est représentée en « stick ». Le code couleur des atomes est identique à celui en A. Les atomes de soufre sont représentés en orange. P_A et P_B correspondent aux phosphates du lipide II court (d'après Kruijff *et al.*, 2008).

La résolution de la structure tridimensionnelle de la nisine en complexe avec le lipide II a permis de mettre en évidence que ce lantibiotique liait le lipide II au niveau du groupement pyrophosphate (**Figure 20**) (Hsu *et al.*, 2004). On parle d'ailleurs d'une cage à pyrophosphate. Cette dernière est formée par la chaîne principale de la nisine qui entoure le pyrophosphate du lipide II. Le reste de la chaîne peptidique peut alors pénétrer au sein de la membrane plasmique pour former un pore qui résulte de l'association entre 4 molécules de lipide II et 8 molécules de nisine (Hasper *et al.*, 2004). Il est responsable de la dépolarisation de la membrane, ce qui conduit à la fuite de nombreux métabolites et à la mort bactérienne. L'activité de la nisine est intimement liée aux cycles lanthionines A et B qui sont responsables de l'interaction avec le groupement pyrophosphate du lipide II. Ces deux cycles sont également présents au sein d'autres lantibiotiques de classe A comme l'épidermine et la subtiline, qui semblent également lier le lipide II (Breukink et de Kruijff, 2006).

Les lantibiotiques de classe B ont également pour cible le lipide II mais ils ne provoquent pas la formation de pores dans la membrane. Ainsi, la mersacidine interagit également avec le lipide II, mais son site de fixation diffère de celui de la nisine puisque la liaison s'opère au niveau du motif GlcNAc (Brötz *et al.*, 1998). Cette famille de lantibiotiques exerce son action létale en séquestrant le lipide II, qui n'est alors plus accessible pour les PBP, provoquant ainsi un arrêt de synthèse du peptidoglycane.

Enfin, les lantibiotiques à deux composantes sont constitués de deux peptides qui ont des fonctions physiologiques distinctes : l'un est responsable de l'ancrage au lipide II et l'autre de la formation de pores. L'exemple le plus étudié concerne la lacticine 3147, qui est composée des peptides A1 et A2. Le peptide A1 est globulaire et ressemble à la mersacidine. Il a été proposé que ce peptide se fixe sur le lipide II et bloque ainsi la synthèse du peptidoglycane (Martin *et al.*, 2004). Il est capable d'agir seul, mais la présence du peptide A2 est nécessaire pour que ce type de lantibiotique développe une efficacité antibactérienne maximale. Le peptide A2 semble avoir un mécanisme d'action similaire à la partie C-terminale de la nisine et serait ainsi responsable de la formation de pores dans la membrane suite à la liaison du peptide A1 au niveau du lipide II (Martin *et al.*, 2004).

- Les **ramoplanines** constituent une autre famille de peptides antimicrobiens ciblant le lipide II. Ils sont issus d'une synthèse non ribosomale et peuvent ainsi contenir des acides aminés de la série D. Ces peptides sont uniquement actifs sous une forme circulaire. La ramoplanine est capable de lier à la fois les lipides I et II au niveau du pyrophosphate. Des tests *in vitro* ont permis de montrer que la ramoplanine était capable d'inhiber la réaction catalysée par MurG (Somner et Reynolds, 1990), mais également la réaction de transglycosylation catalysée par la PBP1b (Lo *et al.*, 2001). Dans un contexte physiologique, il semble cependant que le lipide II soit la cible privilégiée de la ramoplanine étant donné qu'il est directement accessible depuis le milieu extérieur chez les bactéries à Gram positif ciblées par cet antibactérien.
- Les **glycopeptides** sont également des peptides antimicrobiens qui ciblent le lipide II. La vancomycine constitue le premier glycopeptide qui a été découvert. Elle est issue d'une synthèse non ribosomale et interagit au niveau de la partie peptidique du lipide II, plus précisément au niveau du dipeptide D-Ala-D-Ala terminal (**Figure 21**) (Molinari *et al.*, 1990). La vancomycine peut également se lier aux pentapeptides non pontés des chaînes naissantes de peptidoglycane. Dans les deux cas, la liaison du glycopeptide au motif D-Ala-D-Ala inhibe les réactions de transpeptidation et de transglycosylation (Perkins, 1969; Allen et Nicas, 2003).

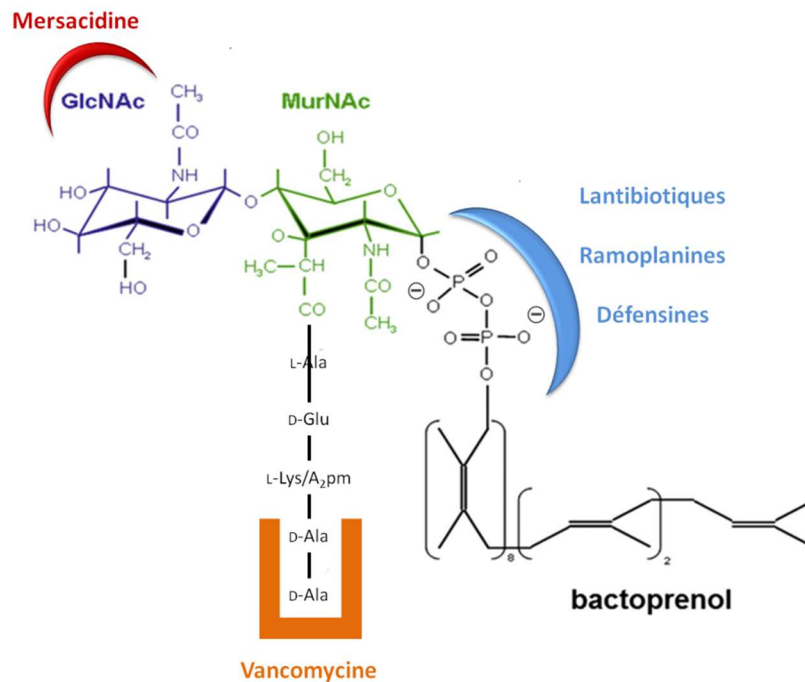


Figure 21 : Le lipide II, cible de nombreux antibactériens. Les différentes molécules antibactériennes ciblant le lipide II au niveau de différents sites de liaison sont indiquées (d'après Münch et Sahl, 2015).

3. La résistance aux antibiotiques :

La résistance aux antibiotiques est un phénomène qui a toujours existé au sein du monde bactérien. Cette résistance est la conséquence d'une interaction entre micro-organismes au sein d'une même niche écologique. En effet, de nombreux composés antimicrobiens sont des molécules naturelles produites par les micro-organismes. Par conséquent, les bactéries qui vivent aux côtés de micro-organismes producteurs d'antibiotiques ont co-évolué et développé des mécanismes de défense afin de survivre (Munita et Arias, 2016). L'utilisation massive et à mauvais escient d'antibiotiques au cours de ces dernières décennies est à l'origine de l'émergence accrue de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques, qui constituent désormais un problème majeur de santé publique. Aujourd'hui, ce phénomène est d'autant plus important que les souches pathogènes ne sont plus seulement résistantes à un seul antibiotique, mais peuvent être de type MDR (*MultiDrug Resistant* ; résistantes à au moins trois familles d'antibiotiques ; ex. : *P. aeruginosa*), XDR (*Extensively Drug Resistant* ; sensibles à une seule famille d'antibiotiques ; ex. : *Mycobacterium tuberculosis*) ou PDR (*Pandrug Resistant* ; résistantes à toutes les familles d'antibiotiques ; ex. : *S. aureus*) (Magiorakos *et al.*, 2012). L'apparition extrêmement rapide d'une résistance suite à l'introduction d'un antibiotique est l'exemple parfait du concept de l'évolution darwinienne.

La résistance aux antibiotiques existe sous deux formes, une résistance naturelle (ou intrinsèque) et une résistance acquise.

La résistance naturelle se définit par le fait que cette résistance est présente chez toutes les bactéries appartenant à une même espèce. Elle peut se définir de deux manières. Tout d'abord, étant donné que la plupart des antibiotiques sont produits par les bactéries, celles-ci se protègent contre les effets de la molécule qu'elles produisent. Par exemple, une souche de *L. lactis* productrice de nisine sera protégée contre les effets de cette dernière par la production de la protéine NisI, qui empêche la

formation de pores dans la membrane en protégeant le lipide II de la nisine (Dodd *et al.*, 1996; Al Khatib *et al.*, 2014). Le deuxième type de résistance naturelle se définit par le fait que l'espèce visée par l'antibiotique ne possède pas l'un des déterminants essentiels à l'action de l'antibiotique (récepteur, canal, cible protéique...).

La résistance acquise est quant à elle due à la plasticité génomique extraordinaire des microorganismes (**Figure 22**). Il existe deux mécanismes permettant aux bactéries d'acquérir une résistance vis-à-vis d'un antibiotique : soit l'acquisition d'une mutation au sein d'un gène impliqué ou ciblé par le mécanisme d'action de la molécule, soit l'acquisition d'ADN étranger par transfert horizontal de gènes (**Figure 23**). Les transferts horizontaux de gènes peuvent se produire au sein d'une même espèce bactérienne, mais aussi entre différentes espèces bactériennes. Ce transfert implique des éléments génétiques mobiles tels que des plasmides, des intégrons ou des transposons (von Wintersdorff *et al.*, 2016). Il peut s'opérer selon différentes stratégies telles que la transformation (incorporation d'ADN isolé), la transduction (incorporation d'ADN véhiculé par un phage), ou la conjugaison (incorporation d'ADN *via* les pili sexuels) (Munita et Arias, 2016; von Wintersdorff *et al.*, 2016).



Figure 22 : Illustration de l'acquisition d'une résistance à un antibiotique au sein d'une culture bactérienne.

La résistance acquise par mutation ou acquisition de gènes peut agir à différents niveaux : (i). modification de la cible, ce qui entraîne une diminution de l'affinité entre l'antibiotique et sa cible ; (ii). activation de mécanismes d'évacuation de la molécule par des pompes d'efflux ; (iii). modification du métabolisme ; (iv). modification ou dégradation de l'antibiotique ; (v). surproduction de la cible de l'antibiotique (**Figure 23**) (Munita et Arias, 2016).

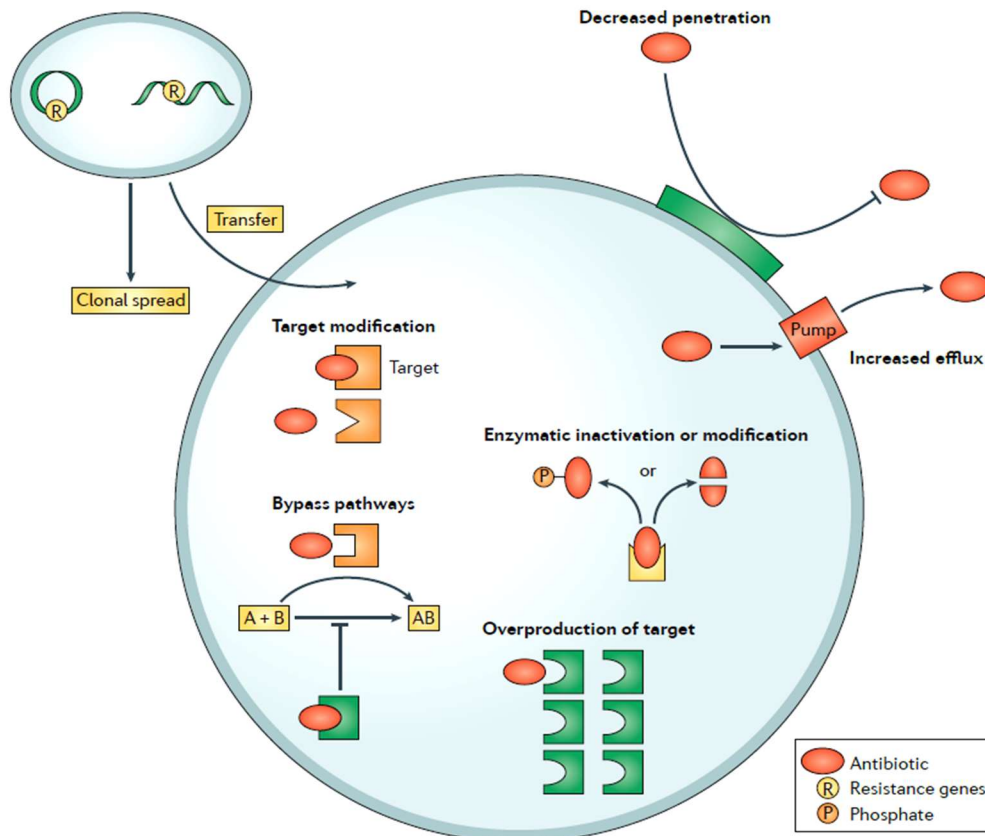


Figure 23 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques. Ce schéma illustre les principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques (d'après Lewis, 2013).

La modification de la cible de l'antibiotique peut s'opérer de différentes manières. Dans le cas de la résistance aux quinolones ciblant la synthèse protéique, des mutations responsables de la substitution d'un unique acide aminé ont lieu au niveau des gènes *gyrA* et *parC* codant pour des sous-unités intervenant respectivement dans la composition de la DNA gyrase et de la topoisomérase IV. Ces mutations ont toutes deux lieu dans la région QRDR (Quinolone Resistance-Determining Region) (Hooper et Jacoby, 2015; Yoshida *et al.*, 1990). Dans le cas de la résistance à la vancomycine, ce n'est pas une protéine qui est modifiée, mais le lipide II. Son dipeptide D-Ala-D-Ala terminal peut être modifié en D-Ala-D-Lac ou D-Ala-D-Ser (Courvalin, 2006). Cette modification de la cible diminue fortement l'affinité de la vancomycine pour son substrat, conférant ainsi la résistance vis-à-vis de cet antibiotique. La résistance est conférée par la présence dans le génome de différents clusters de gènes (*vanA, B, C, D, E, G, L, M*) qui codent pour des gènes responsables de la substitution du dernier acide aminé du pentapeptide, mais également de la dégradation du dipeptide D-Ala-D-Ala (Arthur *et al.*, 1996).

La résistance à un antibiotique peut également être due à l'export de la molécule par un système d'efflux. Chez *B. subtilis*, la résistance à la bacitracine est due à la présence d'un transporteur ABC. Ce transporteur est codé par l'opéron *ytsCD* dont l'expression est sous le contrôle d'un système à deux composants codé par l'opéron *ytsAB*. Ainsi, la protéine YtsB joue le rôle de senseur de la bacitracine et la protéine YtsA est un régulateur de réponse dont le rôle est d'activer la transcription de l'opéron *ytsCD*. Le transporteur ABC est responsable de l'export de la bacitracine dans le milieu extérieur, conférant ainsi la résistance à la cellule cible (Bernard *et al.*, 2003).

Une souche résistante aux β -lactamines a été produite en laboratoire chez *E. faecium* (Mainardi *et al.*, 2005). La résistance aux β -lactamines est due à la présence d'une protéine particulière, la protéine Ldt_{fm}. Il s'agit d'une L,D-transpeptidase qui est insensible à l'action de cette classe d'antibiotiques. La présence de cette protéine au sein de cette espèce est responsable d'un changement du métabolisme de synthèse du peptidoglycane. En effet, en présence de β -lactamines, les PBPs classiques vont être inhibées et les étapes de transpeptidation ne pourront avoir lieu. Cependant, la protéine Ldt_{fm}, qui est insensible aux β -lactamines, va effectuer les réactions de transpeptidation nécessaires à la polymérisation du peptidoglycane. Les ponts formés ne seront alors plus de type 4→3, mais de type 3→3. Ultérieurement, ce type de résistance a été trouvé chez *M. tuberculosis*, espèce chez laquelle les ponts 3→3 sont majoritaires (Lavollay *et al.*, 2008; Gupta *et al.*, 2010)

La résistance à un antibiotique donné peut également être le résultat de sa modification ou de sa dégradation. L'exemple le plus parlant concerne la dégradation des β -lactamines par les β -lactamases. Ces protéines sont responsables de l'hydrolyse de la liaison amide impliquée dans la formation du cycle β -lactame de ces antibiotiques, les rendant ainsi inactifs (Abraham et Chain, 1988).

Enfin, un dernier mécanisme utilisé par les bactéries pour lutter contre les antibiotiques concerne la surproduction de la cible de l'antibiotique. Cette stratégie a pour but de submerger l'antibiotique de cibles potentielles. Ainsi, malgré la sensibilité inchangée de la cible à l'antibiotique, un bon nombre de molécules cibles resteront non inhibées et donc capables d'effectuer leur fonction. La surproduction de la cible est généralement la conséquence de mutations dans le promoteur responsable de l'expression du gène codant pour la protéine cible. Ce type de mécanisme est notamment impliqué dans la résistance au co-trimoxazole qui inhibe la voie des folates (Munita et Arias, 2016).

III. Les bactériocines :

Certaines molécules aux propriétés antibiotiques citées précédemment, comme la nisine, appartiennent à une grande famille de protéines et peptides antimicrobiens, les bactériocines.

1. Définition :

Les bactériocines sont des protéines ou des peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomale et produits par des bactéries qui sont immunisées contre les effets de leur propre bactériocine (Jack *et al.*, 1995). Elles sont produites par certaines souches bactériennes afin d'éliminer une souche bactérienne compétitrice au sein d'une niche écologique. Leur spectre d'action peut être plus ou moins étendu (Cotter *et al.*, 2005). Bien que possédant des propriétés antibiotiques, les bactériocines ne sont pas des antibiotiques. En effet, elles ont un spectre d'action restreint à une souche apparentée à la souche productrice. Les antibiotiques possèdent quant à eux, de manière générale, un spectre d'action plus large. D'autre part, les bactériocines, qui peuvent être produites à la fois par des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, sont synthétisées pendant la phase primaire de croissance alors que les antibiotiques produits par les bactéries sont des métabolites secondaires (Jack *et al.*, 1995; Zacharof et Lovitt, 2012). Il a été suggéré que 30 à 99 % des bactéries et archées pouvaient produire au moins une bactériocine (Riley, 1998; Cotter *et al.*, 2005). Les bactériocines se caractérisent par leur très grande diversité, que ce soit au niveau de leur structure, de leur mode d'action ou de leur spectre d'action.

2. Les bactériocines des bactéries à Gram positif :

La majorité des bactériocines de bactéries à Gram positif est issue d'espèces lactiques appartenant aux genres *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, et certains membres du genre *Streptococcus* (Rea *et al.*, 2011). En 1993, Klaenhammer a proposé un modèle de classification pour ces bactériocines reposant essentiellement sur leurs différences au niveau structural et sur leurs modes d'action (Klaenhammer, 1993). Cette classification de base est décrite succinctement dans le **Tableau 1** ci-dessous.

[Tableau 1 : Classification des bactériocines selon Klaenhammer \(1993\).](#)

Groupe	Description	Caractéristiques
Classe I	Contient des modifications post-traductionnelles	Petits peptides < 5 kDa ; contiennent des acides aminés particuliers (lanthionine et résidus déshydratés).
Classe II	Aucune modification post-traductionnelle	Petits peptides < 10 kDa ; thermostables ; formation de pores dans les membranes
Classe III	Aucune modification post-traductionnelle	Protéines de poids moléculaire > 30 kDa ; activité enzymatique
Classe IV	Protéine complexée	Protéines attachées à des sucres ou des lipides

Cette classification a cependant fait l'objet de nombreuses modifications, notamment au niveau du maintien ou de la disparition de certaines classes (Diep et Nes, 2002; Heng *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2007). En 2005, Cotter et ses collaborateurs ont proposé une classification reposant sur deux catégories principales et faisant consensus auprès de la communauté scientifique (Cotter *et al.*, 2005):

- **Classe I** : Cette classe regroupe les peptides antimicrobiens appartenant à la catégorie des lantibiotiques. Leur masse moléculaire est généralement inférieure à 5 kDa. Ils contiennent des résidus modifiés à l'issue d'un processus post-traductionnel. On retrouve ainsi des acides aminés atypiques tels que la 2,3-didéhydroalanine (Dha) ou la (Z)-2,3-didéhydrobutyrine (Dhb). Ces résidus sont impliqués dans la formation des cycles lanthionine ou 3-méthyllanthionine, qui sont responsables des caractéristiques structurales de cette classe de bactériocines. Le mode d'action des lantibiotiques ainsi que les différentes sous-classes qui composent cette famille ont été mentionnés précédemment (cf § II.2.2.3).
- **Classe II** : Cette classe regroupe les bactériocines ne possédant pas de cycles lanthionine. Leur taille n'excède pas en général 10 kDa et elles sont thermostables. Ce type de bactériocines ne subit aucune modification post-traductionnelle. Leur mode d'action consiste dans la majorité des cas à perméabiliser la membrane interne, ce qui induit une fuite des métabolites intracellulaires et *in fine* la mort bactérienne. Ces bactériocines sont de natures variées et appartiennent à différentes sous-classes :
 - **Sous-classe IIa** : cette classe regroupe les bactériocines de type « *pediocin-like* ». Elles présentent une grande spécificité vis-à-vis du pathogène *Listeria monocytogenes*. Ces peptides possèdent en N-terminal une « *pediocin box* » dont la séquence consensus est la suivante : YGNGVXCXXXVXV (X représentant n'importe quel acide aminé).
 - **Sous-classe IIb** : cette classe regroupe les bactériocines composées de deux peptides α et β non modifiés. Ces bactériocines sont responsables de la dépolarisation de la membrane par la formation de pores, conduisant à la fuite d'ions et à la diminution du pool d'ATP intracellulaire. La présence des deux peptides, qui fonctionnent de manière synergique, est essentielle pour observer une activité.
 - **Sous-classe IIc** : les bactériocines de ce groupe sont cycliques. Les extrémités N et C-terminales sont reliées par une liaison covalente.
 - **Sous-classe IId** : Les bactériocines de cette classe sont linéaires, non « *pediocin-like* » et composées d'un seul peptide. Cette catégorie regroupe les bactériocines qui ne peuvent être classées dans les 3 catégories précédentes.
 - **Sous-classe IIe** : On retrouve au sein de cette catégorie des bactériocines de type « *microcin E492-like* » (Cotter *et al.*, 2013), c'est-à-dire ayant des similitudes avec la microcine E492 produite par certaines souche d'*E. coli*.

3. Les bactériocines des bactéries à Gram négatif :

Parmi les bactéries à Gram négatif, les entérobactéries sont celles qui produisent le plus de bactériocines. La taille, la structure ainsi que la fonction de ces dernières sont variables.

3.1. Les bactériocines de faible masse moléculaire des bactéries à Gram négatif :

Les microcines sont des bactériocines produites par *E. coli* ou par des bactéries d'espèces apparentées. Elles ont une masse moléculaire inférieure à 10 kDa et sont synthétisées par la voie ribosomale. La production de ces peptides est généralement induite lorsqu'une carence en nutriments est détectée dans le milieu. Les microcines sont en général plutôt thermostables, résistantes aux pH extrêmes ainsi qu'à la dégradation par les protéases (Duquesne *et al.*, 2007). Ce sont de puissants agents antimicrobiens puisque les concentrations minimales inhibitrices mesurées pour ces peptides sont de l'ordre du nanomolaire.

Les microcines sont répertoriées selon deux classes (Duquesne *et al.*, 2007) :

- **Classe I** : Les microcines de cette classe ont une masse moléculaire inférieure à 5 kDa et subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles. On retrouve dans cette classe les MccB17, MccC et MccJ25.
- **Classe II** : Les microcines de cette classe ont une masse moléculaire comprise entre 5 et 10 kDa. Elles peuvent être divisées en deux sous-classes :
 - **Classe IIa** : Les microcines de cette classe possèdent, ou non, un ou plusieurs ponts disulfures et elles ne sont sujettes à aucune autre modification post-traductionnelle. Les MccL, MccV, MccN et MccS la composent (Zschüttig *et al.*, 2012).
 - **Classe IIb** : Ces microcines sont linéaires et peuvent subir une modification post-traductionnelle en C-terminal. Les MccE492, MccM, MccH47 et MccI47 appartiennent à cette classe.

Les gènes codant pour les microcines sont présents au sein de clusters comprenant au minimum quatre gènes organisés en un seul ou en plusieurs opérons. Ces différents gènes codent pour le précurseur de la microcine, pour la ou les protéines impliquées dans les mécanismes d'immunité et pour des protéines responsables de la sécrétion de la microcine. On retrouve également des gènes qui sont responsables de modifications post-traductionnelles (Duquesne *et al.*, 2007).

Les microcines, comme la plupart des bactériocines d'espèces à Gram positif, sont produites sous la forme d'un propeptide, appelé promicrocine, qui doit subir un processus de maturation avant d'aboutir à la forme active. Ce propeptide est constitué en N-terminal d'un peptide leader et en C-terminal de la partie structurale de la microcine, également appelée core-peptide. Au cours du processus de maturation, le core-peptide subit les modifications post-traductionnelles et le peptide leader est clivé (**Figure 24**). Ce clivage se fait souvent de façon concomitante à l'export de la microcine par des ABC transporteurs. Le transport nécessite également la présence de la protéine TolC, dont le rôle supposé est de former un canal à travers le périplasma et la membrane externe pour permettre la sécrétion de la microcine dans le milieu extérieur. Les systèmes d'export des microcines sont non seulement importants pour l'efflux des microcines produites dans le milieu extracellulaire, mais ils jouent également un rôle très important dans l'immunité des souches productrices en diminuant drastiquement la concentration intracellulaire de bactériocine. Selon la microcine considérée, le système d'export est responsable partiellement ou totalement de l'immunité.

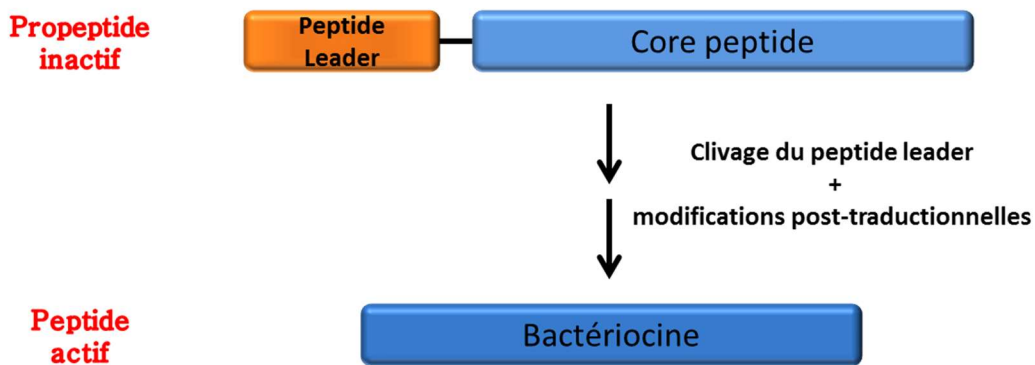


Figure 24 : Schéma général de maturation des bactériocines de faible masse moléculaire.

Une fois sécrétées, les microcines exercent leur action létale sur des souches compétitrices de la bactérie productrice. Elles présentent un mécanisme d'action relativement commun qui peut se décomposer en trois étapes : (i). fixation sur la cellule cible au niveau d'un récepteur de membrane externe ; (ii). translocation à travers la membrane externe ; (iii). activité cytotoxique.

Les récepteurs parasités par les microcines sont en général responsables de l'import de métabolites essentiels à la survie cellulaire. Par exemple, la microcine E492 est modifiée post-traductionnellement par l'ajout d'un sidérophore catéchole en C-terminal. Ce dernier permet à la bactériocine de parasiter les récepteurs FepA, Cir et Fiu, récepteurs aux sidérophores qui sont normalement responsables de l'import de fer dans la cellule (Rebuffat, 2016). La microcine J25 parasite quant à elle le récepteur FhuA qui est un récepteur aux ferrichromes également impliqué dans l'import de fer (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2005).

Une fois liée au récepteur, la microcine C7/C51 emprunte la porine OmpF pour traverser la membrane externe, puis l'ABC transporteur YejABEF pour pénétrer au sein du cytoplasme de la bactérie cible. D'autres, comme les microcines J25 et E492, nécessitent le système d'import TonB constitué des protéines TonB/ExbB/ExbD qui fournit l'énergie nécessaire aux microcines pour traverser la membrane externe (Rebuffat, 2016).

Dès lors que les microcines ont pénétré au sein de la cellule cible, elles exercent leur activité cytotoxique. La diversité des microcines se reflète également au niveau de leurs cibles et de leurs mécanismes d'action. Ainsi par exemple, la E492 est responsable de la formation de pores dans la membrane interne suite à son interaction avec les protéines ManY et ManZ, constituants de la perméase du mannose (Rebuffat, 2012). La microcine V cible également la membrane interne et est responsable de la destruction de son potentiel de membrane (Duquesne *et al.*, 2007). D'autres vont interagir avec des protéines cytoplasmiques impliquées dans des processus cellulaires essentiels tels que la transcription, la réplication ou bien la synthèse protéique : ainsi, la MccJ25 est responsable de l'inhibition de la transcription suite à son interaction avec l'ARN polymérase, la MccB17 interagit avec l'ADN gyrase et bloque la réplication de l'ADN, et la MccC7/C51 bloque quant à elle la synthèse protéique en inhibant l'aspartyl-tRNA synthétase (Duquesne *et al.*, 2007; Rebuffat, 2012).

Les microcines partagent au niveau de leur fonctionnement général un certain nombre de caractéristiques avec les bactériocines de plus haute masse moléculaire telles que les colicines produites par certaines souches d'*E. coli*. Ces dernières exercent également leur action létale en suivant les trois étapes de réception, de translocation et de cytotoxicité. Certains récepteurs de

membrane externe parasités pas les microcines, comme FhuA ou FepA, le sont également par certaines colicines.

3.2. Les bactériocines de haute masse moléculaire des bactéries à Gram négatif :

Les bactéries à Gram négatif ne produisent pas uniquement des microcines mais peuvent également produire des bactériocines dont la masse moléculaire est plus élevée. Parmi celles-ci, les colicines produites par *E. coli* sont les plus étudiées. Les caractéristiques de cette famille de protéines seront évoquées dans la suite du manuscrit. Contrairement aux microcines, ces protéines ne subissent pas de modifications post-traductionnelles. D'autres espèces à Gram négatif produisent également des bactériocines de haute masse moléculaire. Par exemple, certaines souches de *Yersinia pestis* produisent une pesticine qui a pour cible le peptidoglycane mature qu'elle dégrade *via* son activité muramidase (Hall et Brubaker, 1978; Ferber et Brubaker, 1979). Par ailleurs, certaines espèces appartenant aux genres *Klebsiella* ou *Pseudomonas* produisent respectivement des bactériocines nommées klebicines et pyocines. Ces toxines présentent des modes d'action variés, mais classiques tels que la dégradation d'acides nucléiques ou la formation de pores dans la membrane interne (Cascales *et al.*, 2007).

IV. Les colicines :

Comme les microcines, les colicines sont des bactériocines produites par des souches d'*E. coli* dans le but d'éliminer d'autres souches d'*E. coli* ou des bactéries d'espèces apparentées. La production des colicines est induite en réponse à des conditions de stress comme par exemple une carence en nutriments ou des lésions de l'ADN (Pugsley, 1984a). La première colicine a été identifiée par André Gratia en 1925 comme étant une molécule thermosensible produite par une souche d'*E. coli* V et capable de tuer une autre souche d'*E. coli* (Gratia, 1925). Le terme colicine a été introduit pour la première fois par Gratia et Fredericq en 1946, qui démontrèrent non seulement la nature protéique de ce type de molécules, mais aussi leur spectre d'action restreint (Gratia et Fredericq, 1946). Selon Pugsley, environ 30 % des souches d'*E. coli* « naturelles » possèdent un plasmide codant pour une colicine (Pugsley, 1984b).

1. Classification des colicines :

Les colicines, tout comme les microcines, présentent un mode d'action en trois étapes : elles parasitent dans un premier temps un récepteur de la membrane externe de la bactérie cible, puis elles sont transloquées à l'intérieur de la cellule cible où elles peuvent alors exercer leur action létale. La translocation à travers la membrane externe se fait à l'aide de deux systèmes, les systèmes TonB et Tol. Une classification possible des colicines repose sur le système de translocation qu'elles empruntent. Ainsi, les colicines du groupe A sont transloquées à travers la membrane externe à l'aide du système Tol et celles du groupe B à l'aide du système TonB (Cascales *et al.*, 2007). Le groupe A est composé des colicines A, E1 à E9, K, L, N, S4, U et Y. Le groupe B regroupe quant à lui les colicines D, H, Ia, Ib, M, 5 et 10 (Figure 25). Les colicines peuvent également être classées en fonction de leur mode d'action. Ainsi, on va retrouver d'une part les colicines ionophoriques, qui exercent leur action létale en formant des pores au niveau de la membrane interne de la bactérie cible, et d'autre part les colicines enzymatiques, qui ont le plus souvent une activité nucléasique.

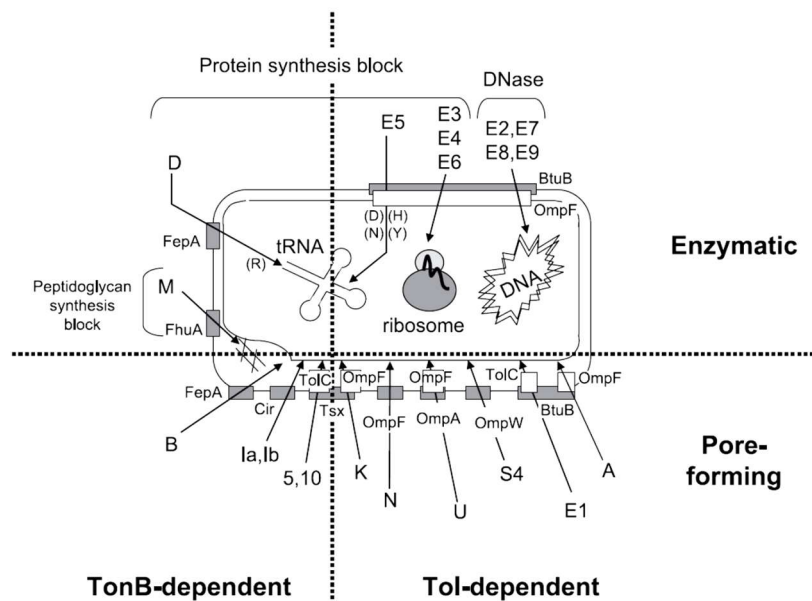


Figure 25 : Classification des colicines. Les colicines sont classées soit en fonction de leur mode d'action, ionophorique ou enzymatique, soit en fonction du système de translocation qu'elles empruntent, TonB ou Tol (D'après Cascales *et al.*, 2007).

2. Organisation génétique des colicines :

Les colicines sont produites par des souches d'*E. coli* qui possèdent un plasmide colicinogénique, appelé pCol. Le fait que les colicines soient codées sur des plasmides permet une mobilité génétique de ces éléments entre différentes souches bactériennes (Fredericq et Betz-Bareau, 1953; Clowes, 1965). Il existe deux types de plasmides colicinogéniques (Hardy *et al.*, 1973) :

- Les plasmides de **type I** dont la taille est comprise entre 6 et 10 kb. Ce sont des plasmides dont le nombre de copies est estimé à une vingtaine par cellule. Ces plasmides codent en général pour les colicines appartenant au groupe A.
- Les plasmides de **type II** sont des plasmides de grande taille, d'environ 40 kb. Ce sont des plasmides conjugatifs, permettant ainsi le transfert horizontal de gènes, présents en une seule copie par cellule. Ils codent en général pour des colicines du groupe B et peuvent parfois contenir les clusters de gènes codant pour deux colicines distinctes, comme par exemple les colicines B et M (Cascales *et al.*, 2007).

Le gène structural d'une colicine fait partie d'un cluster de gènes codant pour différents déterminants essentiels à la production de la colicine tels que la protéine d'immunité, qui confère la résistance de la souche productrice considérée, ou la protéine de lyse, qui permet la libération dans le milieu de certaines colicines. Ces trois gènes peuvent être présents sur le même opéron (opéron colicine) ou non (**Figure 26**).

Le gène structural d'une colicine est appelé *cxa* pour colicin X activity, où X correspond à la colicine codée par le gène. Pour les colicines ionophoriques du groupe B, comme les colicines Ia et Ib, il constitue le seul gène de l'opéron (Mankovich *et al.*, 1986).

Le gène codant pour la protéine d'immunité est nommé *cxi*, pour colicin x immunity, ou *imX*. Ce gène, situé en aval du gène codant pour la colicine, est sous le contrôle de deux promoteurs : le promoteur SOS, qui est responsable de l'expression de l'opéron complet, et un autre promoteur situé au sein du gène structural de la colicine. Ce second promoteur permet l'expression constitutive de la protéine d'immunité chez la souche (Cascales *et al.*, 2007). Pour les colicines ionophoriques, le gène conférant l'immunité n'est pas localisé au sein de l'opéron codant pour la colicine mais sur le brin d'ADN opposé au niveau de l'espace intergénique entre les gènes *cxa* et *cxl*. Dans ce cas, il est également sous le contrôle d'un promoteur constitutif.

Le gène *cxl*, pour colicin X lysis, constitue le dernier gène de l'opéron colicine et code pour la protéine de lyse. La production de la protéine de lyse permet la libération de la colicine produite dans le milieu extérieur et entraîne également la mort de la cellule productrice. Le gène codant pour la protéine de lyse est présent pour l'ensemble des colicines du groupe A et pour les colicines 5 (Pisli et Braun, 1995a), 10 (Pisli et Braun, 1995b) et D (Hofinger *et al.*, 1998; Pshennikova *et al.*, 1988; Roos *et al.*, 1989) appartenant au groupe B.

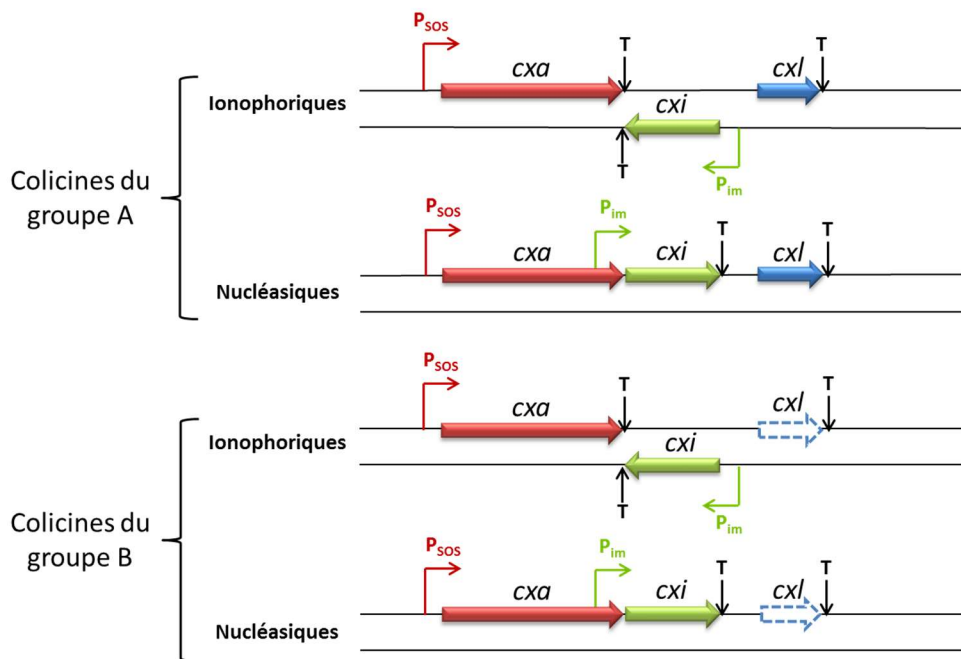


Figure 26 : Organisation génétique des colicines. *cxa* : Colicin X activity ; *cxi* : Colicin X immunity ; *cxl* : Colicin X lysis ; P_{SOS} : Promoteur SOS ; P_{im} : Promoteur de la protéine d'immunité ; T : Termineur. Les gènes *cxl* sont représentés en pointillés pour les colicines du groupe B, car ces gènes ne sont pas toujours présents au sein de l'opéron.

La transcription des gènes sous le contrôle du promoteur SOS (Gillor *et al.*, 2008) est induite à la suite d'un stress subi au niveau de l'ADN (Little et Mount, 1982). En temps normal, l'expression des gènes sous le contrôle des promoteurs SOS est réprimée par la protéine LexA. Dans le cas de l'opéron colicine, deux sites de liaison du répresseur LexA ont été identifiés à proximité du promoteur. Ces deux sites se chevauchent par une ou deux bases et sont situés juste en aval de la « Pribnow-box ». La fixation d'un dimère de LexA sur chacun des sites de liaison provoque une torsion de l'ADN et empêche ainsi toute transcription des gènes situés en aval (Llobès *et al.*, 1988, 1991). Lorsqu'un stress est repéré au niveau de l'ADN, la production de la protéine RecA est induite. Cette protéase dégrade alors les dimères de LexA, ce qui permet l'expression des gènes de l'opéron colicine (Little *et al.*, 1980).

3. Organisation structurale des colicines :

Les colicines présentent une variabilité en terme de longueur de chaîne peptidique puisque leur taille peut varier de 271 résidus pour la ColM à 697 résidus pour la ColD, la taille moyenne étant comprise entre 500 et 600 acides aminés (Cascales *et al.*, 2007). Toutes celles connues à ce jour possèdent une organisation structurale commune en trois domaines, chacun ayant un rôle dédié : le domaine central est impliqué dans l'étape de liaison à un récepteur de la membrane externe de la bactérie cible ; le domaine N-terminal permet, *via* son interaction avec un système de translocation, l'import de la colicine à l'intérieur de la bactérie ; enfin, le domaine C-terminal est responsable de l'activité cytotoxique (**Figure 27A**).

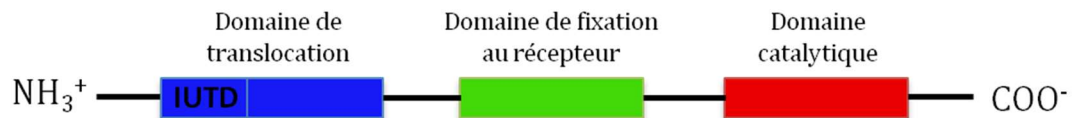


Figure 27 : Schéma général de l'organisation modulaire en trois domaines des colicines.

L'organisation structurale des colicines en domaines distincts a d'abord été déduite suite à l'identification de mutants résistants à certaines colicines. Deux types de mutants ont ainsi été isolés : les mutants dits « résistants », qui sont modifiés au niveau des récepteurs de membrane externe, et les mutants dits « tolérants » possédant quant à eux des mutations au niveau des systèmes de translocation TonB ou Tol (Zwaig et Luria, 1969; Di Masi *et al.*, 1973; Guterman, 1973). La nécessité pour les colicines d'emprunter un récepteur et un système de translocation afin d'exercer leur activité cytotoxique souligne leur organisation modulaire.

La liaison au récepteur de membrane externe est toujours assurée par le domaine central. Les domaines de deux colicines différentes impliqués dans l'étape de réception peuvent présenter une forte homologie de séquence si le récepteur ciblé par ces deux colicines est identique. Ainsi, les ColB et ColD, qui toutes deux ciblent le récepteur FepA, présentent une similarité de séquence de leur domaine de réception de 90 % (Riley, 1993). En revanche, la similarité de séquence entre les domaines de réception de deux colicines ciblant deux récepteurs différents chute drastiquement. Par exemple, les domaines de réception des ColB et ColD (ciblant FepA) ont une séquence très différente des domaines de réception des ColA ou ColE1 qui ciblent le récepteur BtuB (de Zamaroczy et Buckingham, 2002).

Le domaine N-terminal est impliqué dans l'étape de translocation de la colicine de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. Les colicines du groupe A interagissent *via* leur domaine N-terminal avec le système de translocation Tol. Ainsi, la ColA interagit ainsi avec les protéines TolA (Benedetti *et al.*, 1991), TolB (Bouveret *et al.*, 1998) et TolR (Journet *et al.*, 2001) qui sont des protéines du système Tol. Les colicines du groupe B sont, quant à elles, en interaction avec le système de translocation Ton. Cette interaction requiert la présence d'une séquence consensus, la « TonB-box » (Mende et Braun, 1990; Kim *et al.*, 2014).

L'activité cytotoxique est portée par le domaine C-terminal de chaque colicine. Ces domaines ont été isolés et portent soit une activité nucléasique, soit une activité ionophorique (Cascales *et al.*, 2007). Seule la ColM présente un mode d'action différent de ceux cités précédemment puisqu'elle inhibe spécifiquement la voie de biosynthèse du peptidoglycane en dégradant un de ses précurseurs essentiels, le lipide II (El Ghachi *et al.*, 2006).

La résolution de la structure tridimensionnelle de plusieurs colicines a permis de confirmer leur organisation modulaire, où les différents domaines sont très bien séparés les uns des autres. Les structures tridimensionnelles de plusieurs colicines entières ont été résolues. Elles présentent généralement une forme relativement allongée au sein de laquelle les différents domaines structuraux sont séparés par des hélices α . Seules les ColM, B, N et S4 présentent des structures plus compactes (**Figure 28**).

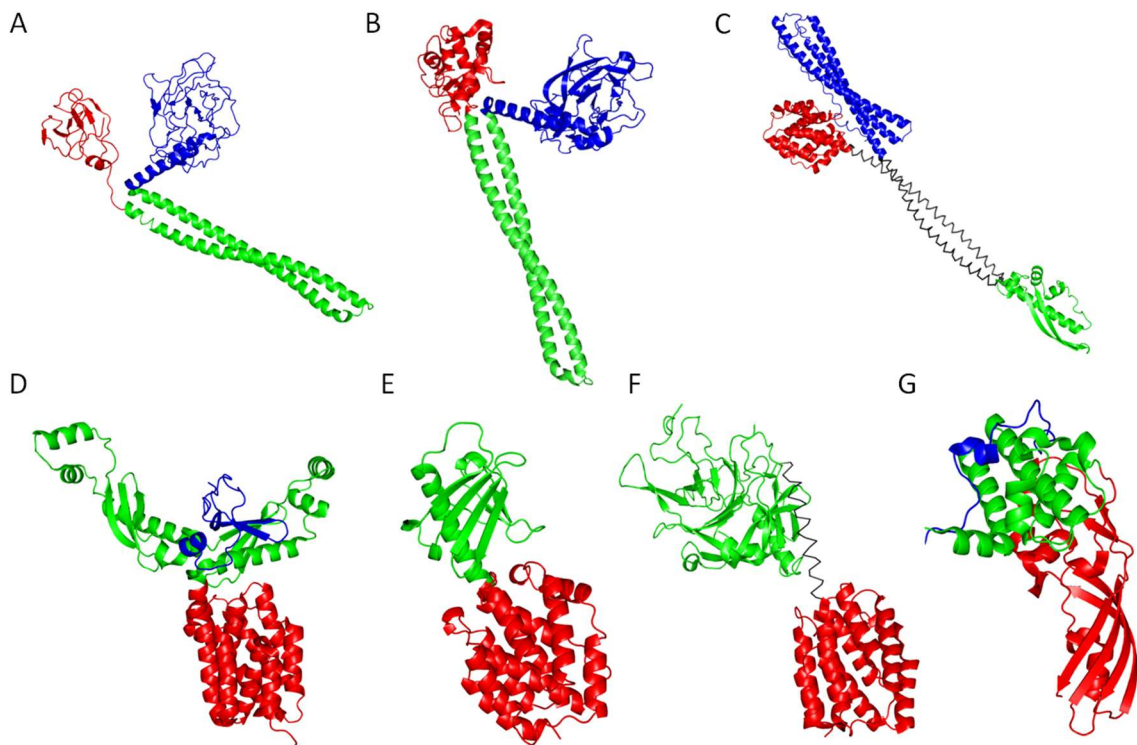


Figure 28 : Exemples de structures tridimensionnelles de colicines. A-G : Structures tridimensionnelles respectives des colicines ColE3 (code PDB : 1JCH), ColE9 (code PDB 5EW5), ColIa (code PDB : 1CII), ColS4 (code PDB : 3FEW), ColN (code PDB : 1A87), ColB (code PDB : 1RH1) et ColM (code PDB : 2XMX). Les domaines de fixation au récepteur, de translocation et d'activité sont colorés respectivement en vert, bleu et rouge. Toutes les structures sont représentées en cartoon.

Les études structurales menées sur ces protéines ont permis de montrer que les extrémités N-terminales avaient tendance à être en partie désordonnées. Ainsi, les 90 et 43 premiers résidus des colicines ColN et ColB sont absents de leurs structures respectives (Vetter *et al.*, 1998; Hilsenbeck *et al.*, 2004). L'absence de densité électronique pour des résidus au sein d'une structure est souvent le signe d'une grande flexibilité. D'ailleurs, les domaines de translocation sont en général constitués d'une partie intrinsèquement désordonnée, nommée IUTD (Intrinsically Unstructured Translocation Domain) et d'une seconde plus structurée (Kim *et al.*, 2014). Le fait que ces régions soient flexibles leur confère une propension à interagir avec d'autres protéines, notamment avec les différents partenaires du système de translocation, et à se structurer ou non à leur contact (Deprez *et al.*, 2002).

4. Mode d'action des colicines :

4.1. Libération des colicines :

Afin que les colicines puissent exercer leur action létale sur les bactéries cibles, elles doivent être libérées dans le milieu extérieur par la souche productrice. Cependant, elles ne possèdent pas de séquence signal permettant leur export dans le milieu extérieur. En conséquence, les colicines produites s'accumulent dans le cytoplasme de la bactérie productrice et leur sécrétion non spécifique dans le milieu extérieur dépend de la présence d'une protéine de lyse. La libération des colicines du groupe B ne possédant pas de protéine de lyse associée se fait selon un mécanisme encore inconnu.

Comme mentionné précédemment, l'expression de l'opéron colicine est sous le contrôle du promoteur SOS et la régulation de l'expression dépend des protéines LexA et RecA. La production des colicines est également régulée par la protéine IscR, un régulateur global de transcription dont le rôle est de prévenir l'inactivation de LexA par RecA. Ce niveau supplémentaire de régulation permet d'assurer la production des colicines uniquement lorsqu'un stress prolongé au niveau de l'ADN est détecté (Butala *et al.*, 2012). Pour les colicines du groupe A, l'expression de la colicine et de sa protéine de lyse associée, également appelée BRP (*Bacteriocin Release Protein*), se fait de façon concomitante, mais la production de la BRP a lieu uniquement lorsque la production de colicine est requise. Ce contrôle de la production est nécessaire puisque la BRP est capable d'induire à elle seule la lyse cellulaire (Pugsley et Schwartz, 1983; Baty *et al.*, 1987). Les protéines de lyse sont des lipoprotéines produites sous la forme d'un précurseur qui contient une séquence signal conservée, la « *lipobox* », dont la séquence est L-X-(A/V/S)-Y-(A/G)-C. Le précurseur est produit au niveau du cytoplasme et est ensuite envoyé du côté périplasmique de la membrane interne par le système Sec (Cascales *et al.*, 2007). Il y a alors un processus de maturation qui aboutit au clivage du peptide signal stable et à la fixation de la BRP mature sur un diglycéride (Wu, 1996). Son insertion consécutive au sein de la membrane interne provoque des perturbations permettant le passage de la colicine du cytoplasme vers le périplasma. Cette translocation nécessite la présence de la BRP maturée, mais aussi celle du peptide signal clivé (Cavard, 2004). La BRP mature s'associe ensuite à la membrane externe et la perturbation causée par cette association est responsable de l'activation de la phospholipase A (OmpLA). OmpLA modifie la composition de la membrane externe, ce qui a pour conséquence d'augmenter sa perméabilité, permettant ainsi la libération des colicines dans le milieu extérieur (van der Wal *et al.*, 1995). Ce mécanisme de libération en deux étapes (passage dans le périplasma, puis libération dans le milieu) a été suggéré suite à une étude menée sur la ColA et sa protéine de lyse, Cal (Cavard, 2004).

Les colicines qui possèdent un domaine d'activité nucléasique ne sont pas libérées sous forme monomérique dans le milieu extérieur comme les autres colicines. En effet, ayant pour cible des constituants situés dans le cytoplasme (ADN, ARNt, ARNr...), leur production est couplée à celle de leur protéine d'immunité, de façon à protéger la bactérie productrice. Par conséquent, dès que la colicine va être synthétisée, elle va former un complexe très stable avec sa protéine d'immunité. Cela aboutit à la formation d'un hétérodimère inactif qui est libéré sous cette forme dans le milieu extérieur (Jakes *et al.*, 1974; James *et al.*, 1996; Kleanthous *et al.*, 1998; Papadakos *et al.*, 2012).

4.2. Liaison à la cellule cible :

Les colicines exercent leur action cytotoxique par un mécanisme en trois étapes, dont la première consiste en leur liaison à un récepteur spécifique situé dans la membrane externe de la bactérie cible. La nature du récepteur ciblé est spécifique à chaque colicine. Cependant, un même récepteur peut être ciblé par plusieurs colicines.

Ainsi, des colicines du groupe A ciblent le récepteur BtuB (ColA, ColE1 à E9), le récepteur Tsx (ColK), ou différentes porines. Ces colicines nécessitent généralement la présence d'un second récepteur impliqué dans la translocation de la protéine à travers la membrane externe. La porine OmpF joue le plus souvent ce rôle sauf pour la ColE1 qui utilise TolC (Cascales *et al.*, 2007). Le rôle du premier récepteur servirait donc à « positionner » la colicine au niveau de la membrane. Dans certaines conditions, la présence des deux récepteurs n'est pas obligatoire. Il a en effet été montré que la ColA

pouvait exercer son action létale en l'absence du récepteur BtuB, mais uniquement si les cellules cibles se trouvaient dans un environnement de faible osmolarité. La protéine OmpF assume donc à la fois des étapes de réception et de translocation (Cavard et Lazdunski, 1981).

La colicine N (ColN) possède aussi un mécanisme de réception unique puisqu'il s'agit de la seule colicine à ne pas cibler un récepteur de membrane externe. Elle utilise en effet les LPS comme récepteur principal. Une liaison directe entre le « core » des LPS et la ColN a été mise en évidence (Johnson *et al.*, 2014). De plus, l'inactivation des gènes codant pour des protéines impliquées dans la synthèse de cette partie des LPS rend les cellules cibles résistantes à cette colicine (Sharma *et al.*, 2009). Une fois liée, la ColN utilise la porine OmpF pour l'étape de translocation et deux modèles ont été évoqués pour expliquer son passage à travers la membrane externe. D'une part, il est proposé que la ColN traverse la membrane sous une forme dépliée à travers un pore de OmpF (Jakes, 2014). D'autre part, des données de microscopie électronique suggèrent que la ColN lierait OmpF à l'interface qu'elle forme avec les LPS. Elle « glisserait » alors le long de la porine en déplaçant les lipides de la membrane (Baboolal *et al.*, 2008).

Les colicines du groupe B ciblent quant à elles dans la majorité des cas des récepteurs TonB-dépendants. Les ColB et D utilisent par exemple comme récepteur la protéine FepA, la ColM cible le récepteur FhuA et les Colla et Ib se lient au récepteur Cir (Braun *et al.*, 2002). Contrairement aux colicines du groupe A, un seul type de récepteur semble ici nécessaire pour assurer les étapes de réception et de translocation de ces colicines qui fixent un récepteur TonB-dépendant. Néanmoins, il a récemment été montré que la Colla utilisait deux copies du récepteur Cir, l'un étant impliqué dans l'étape de réception et l'autre étant nécessaire pour l'étape de translocation (Jakes et Finkelstein, 2010). Les colicines 5 et 10 sont les seules colicines du groupe B qui ne se fixent pas sur un récepteur TonB-dépendant. Elles se lient en effet au niveau de la protéine Tsx, récepteur impliqué dans l'import des nucléosides, puis interagissent avec TolC pour l'étape de translocation (Cascales *et al.*, 2007).

La compréhension des mécanismes de réception a été améliorée suite à l'obtention de structures cristallographiques de différents récepteurs en présence des domaines de réception isolés de colicines. Ces structures ont notamment permis de déterminer les interactions qui s'établissent entre colicines et récepteurs. Ainsi, le récepteur BtuB a été cristallisé en présence des 135 résidus du domaine de réception des ColE2 (Sharma *et al.*, 2007) et E3 (Kurusu *et al.*, 2003). La structure du récepteur Cir a également été résolue en présence du domaine de réception de la Colla (résidus 282 à 385) (Buchanan *et al.*, 2007). Par ailleurs, la structure de ces complexes a permis de modéliser la liaison entre les ColE3 (groupe A) et la (groupe B) et leurs récepteurs respectifs. Ces modèles ont permis de mettre en avant des caractéristiques communes concernant l'interaction entre les colicines des groupes A et B et leurs récepteurs. Ainsi, il apparaît que les interactions entre le domaine de réception d'une colicine et son récepteur se font majoritairement au niveau des longues boucles extracellulaires de ce dernier et que la spécificité d'interaction est intimement liée à leur séquence en acides aminés. D'autre part, les domaines de réception forment un angle de 45° avec la membrane externe une fois liés au récepteur (**Figure 29**). Il a été suggéré que cette orientation particulière permette à ces colicines de recruter le deuxième récepteur, impliqué dans l'étape de translocation, *via* leur domaine N-terminal (Kim *et al.*, 2014).

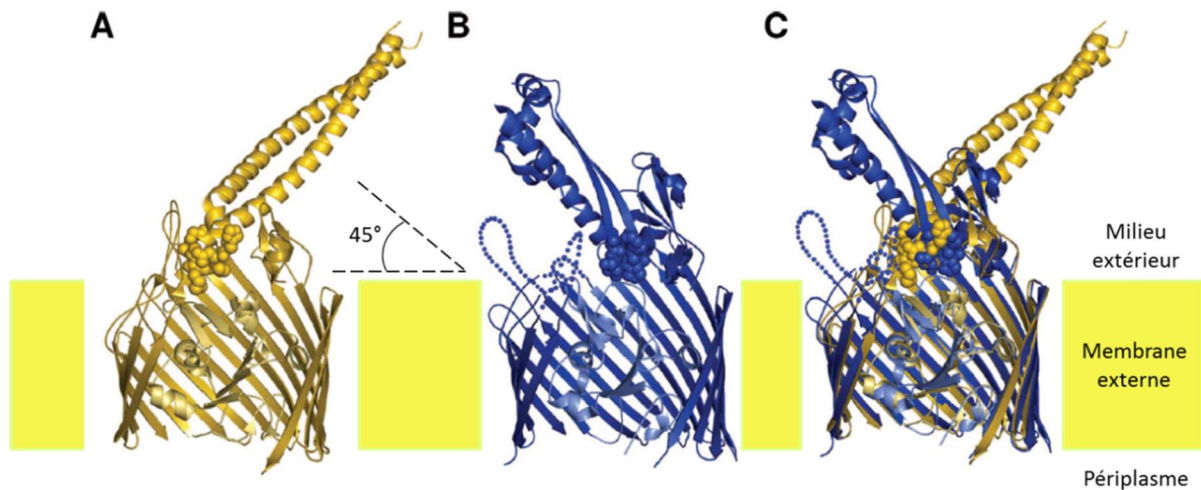


Figure 29 : Structure des complexes BtuB-ColE3 et Cir-Colla. A : Structure d'une partie du domaine de réception de la ColE3 (coloré en jaune clair) en complexe avec le récepteur BtuB (coloré en or). Les résidus de ColE3 impliqués dans l'interaction avec BtuB sont représentés en surface de van der Waals. L'angle de 45° formé entre le domaine de réception et le feuillet externe de la membrane est indiqué. B : Structure du complexe formé entre le récepteur Cir et le domaine de réception de la ColIa (colorés en bleu foncé). Les résidus de ColIa impliqués dans l'interaction avec Cir sont représentés en surface de van der Waals. Les pointillés représentent des boucles extracellulaires flexibles non visibles sur la structure. C : Superposition des deux complexes BtuB-ColE3 et Cir-Colla. Les deux colicines se fixent au niveau de la même zone de leur récepteur respectif, mais dans des directions opposées. Les deux domaines de réception forment un angle de 45° avec la surface membranaire (d'après Cascales *et al.*, 2007).

La plupart des récepteurs ciblés par les colicines possèdent une organisation structurale commune. Ce sont des tonneaux β constitués de 22 brins qui traversent la membrane externe et sont reliés entre eux par des boucles. Les boucles ayant une localisation extracellulaire sont celles impliquées dans la liaison des colicines. Ces récepteurs possèdent également en N-terminal une structure globulaire nommée « *plug* », localisée à l'intérieur du tonneau, qui permet de boucher le transporteur. On retrouve dans la séquence de ce « *plug* » une séquence spécifique d'interaction avec la protéine TonB appelée « *TonB box* ». Ces récepteurs sont donc dits TonB-dépendants (Wiener, 2005). Ils jouent un rôle physiologique essentiel dans l'import de certains métabolites au sein de la cellule. Ainsi, le récepteur BtuB est normalement dédié à l'import de la vitamine B12 alors que les récepteurs FepA (récepteur de l'entérocholine), Cir (récepteur du catécholate), ou FhuA (récepteur du ferrichrome) sont quant à eux impliqués dans l'import de fer dans la cellule (Ferguson et Deisenhofer, 2004).

Ces récepteurs ne sont pas uniquement parasités par des bactériocines. Ils peuvent également l'être par des bactériophages. Ainsi par exemple, le phage T5 utilise comme récepteur la protéine FhuA, également parasitée par la ColM (Braun *et al.*, 1973), tandis que le phage BF23 parasite le récepteur BtuB, également emprunté par toutes les colicines E (Sabet et Schnaitman, 1973).

4.3. Translocation à travers la membrane externe :

Suite à leur liaison au récepteur, les colicines doivent traverser la membrane externe afin d'exercer leur action létale à l'intérieur de la cellule cible. Elles empruntent donc, à cette étape, un système de translocation : les colicines du groupe A utilisant ainsi le **système Tol** et celles du groupe B le **système TonB**. Le rôle classiquement dédié de ces deux complexes protéiques est l'utilisation de l'énergie issue de la force proton-motrice afin d'assurer des fonctions essentielles à la survie des bactéries, comme par exemple le transport actif de certains substrats (système TonB) ou le maintien

de l'intégrité de la membrane externe (système Tol). Ils forment ainsi des moteurs moléculaires qui transforment l'énergie électrochimique en énergie mécanique, et de fait, sont parasités par les colicines et par certains phages, qui détournent pour leur propre compte l'usage classique de ces systèmes de translocation.

4.3.1. Homologies entre le système TonB et le système Tol :

Les protéines TolA, TolQ et TolR appartenant au système Tol présentent des caractéristiques communes avec respectivement les protéines TonB, ExbB et ExbD du système TonB. Les protéines composant les couples TolA/TonB, TolQ/ExbB et TolR/ExbD présentent en effet des homologies tant au niveau de la topologie (**Figure 30**) que de leur fonction respective.

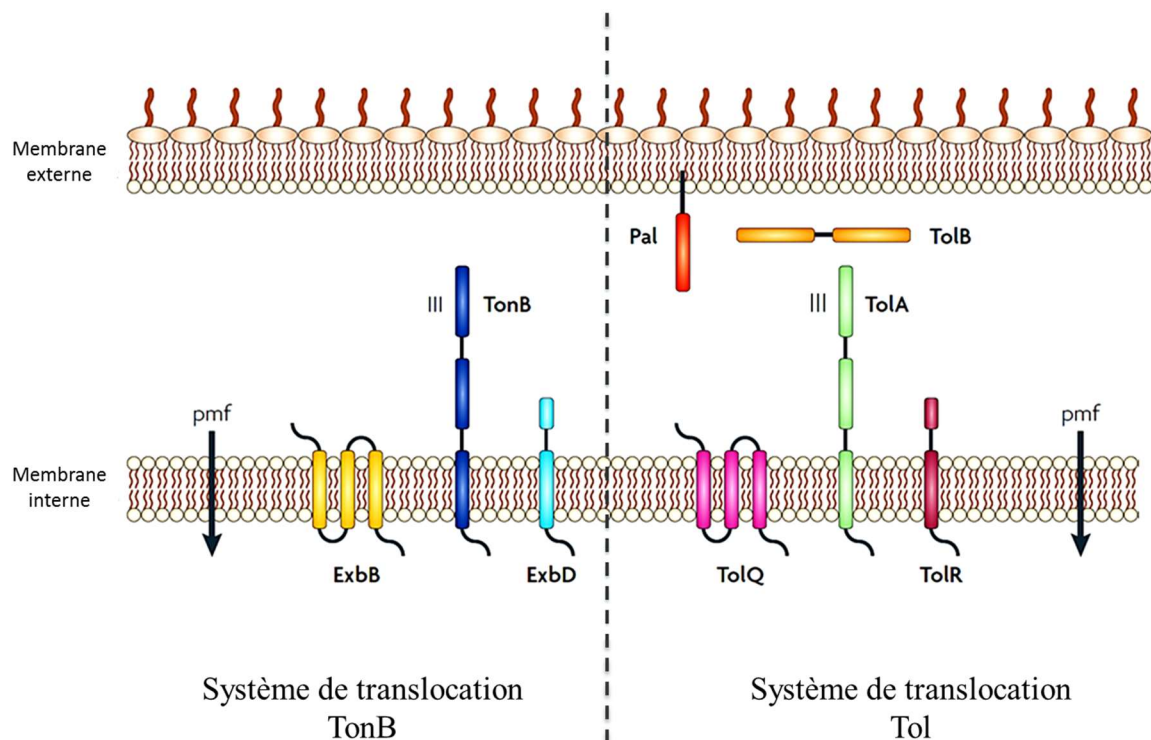


Figure 30 : Homologies entre les systèmes de translocation TonB et Tol. Les protéines ExbB et TolQ possèdent toutes les deux trois segments transmembranaires. ExbD et TolR possèdent une ancre transmembranaire et un domaine soluble périplasmique. TonB et TolA sont toutes deux ancrées à la membrane interne par une ancre transmembranaire et possèdent un domaine central et un domaine C-terminal localisés dans le périplasma. Ces deux systèmes utilisent la force proton-motrice (pmf). Le système Tol contient deux protéines supplémentaire, TolB et Pal, par rapport au système TonB (d'après Kleanthous, 2010).

Les changements conformationnels observés chez TonB sont dépendants de la force proton motrice et de la présence des protéines ExbB et ExbD (Larsen *et al.*, 1999), tout comme les changements conformationnels observés chez TolA sont dépendants de la force proton motrice ainsi que des moteurs moléculaires TolQ et TolR (Germon *et al.*, 2001).

Les couples de protéines ExbB et TolQ d'un côté, et ExbD et TolR de l'autre, sont homologues et présentent une forte similarité de séquence, principalement au niveau de leurs segments transmembranaires (Braun, 1989; Cascales *et al.*, 2001).

Il a également été montré que ces couples de protéines étaient capables de complémentation croisée. Testées sur une souche de *E. coli* n'exprimant pas les gènes *exbB* et *exbD*, les colicines du

groupe B, pourtant dépendantes du système TonB, étaient en effet toujours actives. Cette cytotoxicité est due à la présence des gènes *tolQ* et *tolR*, dont la surexpression des deux protéines correspondantes augmentait même la sensibilité de la souche mutante *exbB exbD* à ces colicines du groupe B. En revanche, la sensibilité d'un quadruple mutant *tolQR exbBD* vis-à-vis des colicines du groupe B était totalement abolie (Braun et Herrmann, 1993).

En revanche, bien que présentant une topologie similaire, les protéines TolA et TonB ne présentent pas d'activité croisée (Braun et Herrmann, 1993). Les domaines transmembranaires N-terminaux de ces deux protéines peuvent cependant être échangés. Cela conduit alors à un changement de spécificité dans le recrutement des moteurs moléculaires TolQR et ExbBD (Karlsson *et al.*, 1993). Ainsi, la séquence N-terminale de TolA favorise une interaction avec le complexe TolQR et celle de TonB avec le complexe ExbBD. Il a également été montré que les domaines C-terminaux de ces deux protéines présentant une forte homologie structurale malgré une faible similarité de séquence (Ködding *et al.*, 2005) (**Figure 31**).

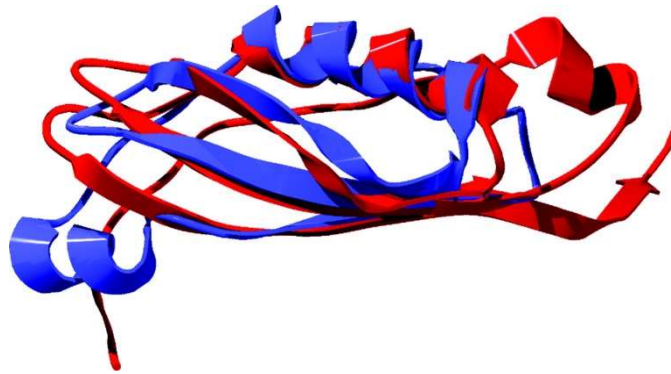


Figure 31 : Superposition des structures tridimensionnelles des domaines C-terminaux de TolA et TonB. Les domaines C-terminaux de TonB et TolA d'*E. coli* sont respectivement représentés en rouge et bleu. La partie N-terminale de l'hélice α de TolA n'est pas représentée, car elle n'est pas retrouvée chez TonB (d'après Ködding *et al.*, 2005).

4.3.2. Translocation *via* le système Tol :

Le système Tol est constitué de cinq protéines : TolA, TolB, TolQ, TolR et la lipoprotéine Pal. Les gènes codant pour ces protéines sont organisés en opéron et sont encadrés par deux gènes, *ybgC* et *ybgF*. Le gène *ybgF* code pour une thioestérase (Cantu *et al.*, 2010) et le gène *ybgC* code pour une protéine impliquée dans le maintien de l'intégrité de l'enveloppe au cours de la division (Gray *et al.*, 2015). Chez *E. coli*, un premier promoteur permet l'expression des gènes *ybgC-tolQ-tolR-tolA-tolB-pal-ybgF*, tandis qu'un deuxième promoteur situé en amont du gène *tolB* permet l'expression des gènes *tolB-pal-ybgF* uniquement (Sturgis, 2001).

Les protéines TolA, TolQ et TolR sont toutes les trois ancrées à la membrane plasmique et forment un complexe. Elles sont en interaction les unes avec les autres au niveau de leurs domaines transmembranaires (Derouiche *et al.*, 1995; Lazzaroni *et al.*, 1995). TolB et Pal forment quant à elles un complexe au niveau de la membrane externe (Bouveret *et al.*, 1995; Bonsor *et al.*, 2009). Ces deux complexes protéiques travaillent ensemble grâce à une interaction entre TolA et Pal, qui est dépendante de la force proton-motrice (PMF, *proton motive force*) et des protéines TolQ et TolR (Cascales *et al.*, 2000). Ces deux complexes peuvent également être en contact *via* une interaction entre TolA et TolB (Dubuisson *et al.*, 2002).

La liaison des colicines du groupe A sur leurs récepteurs spécifiques ainsi que le recrutement d'un second récepteur aboutissent à la formation d'une structure particulière appelée « translocon ». Le translocon formé suite à la liaison de la colicine E9 sur son récepteur a été isolé, et cela montre bien que les protéines BtuB-ColE9-Im9-OmpF forment un complexe (**Figure 32**) (Housden *et al.*, 2005). La formation du translocon est nécessaire pour que la partie N-terminale non structurée du domaine de translocation des colicines puisse interagir avec les protéines du système Tol, en lui assurant un positionnement correct (Kleanthous, 2010).

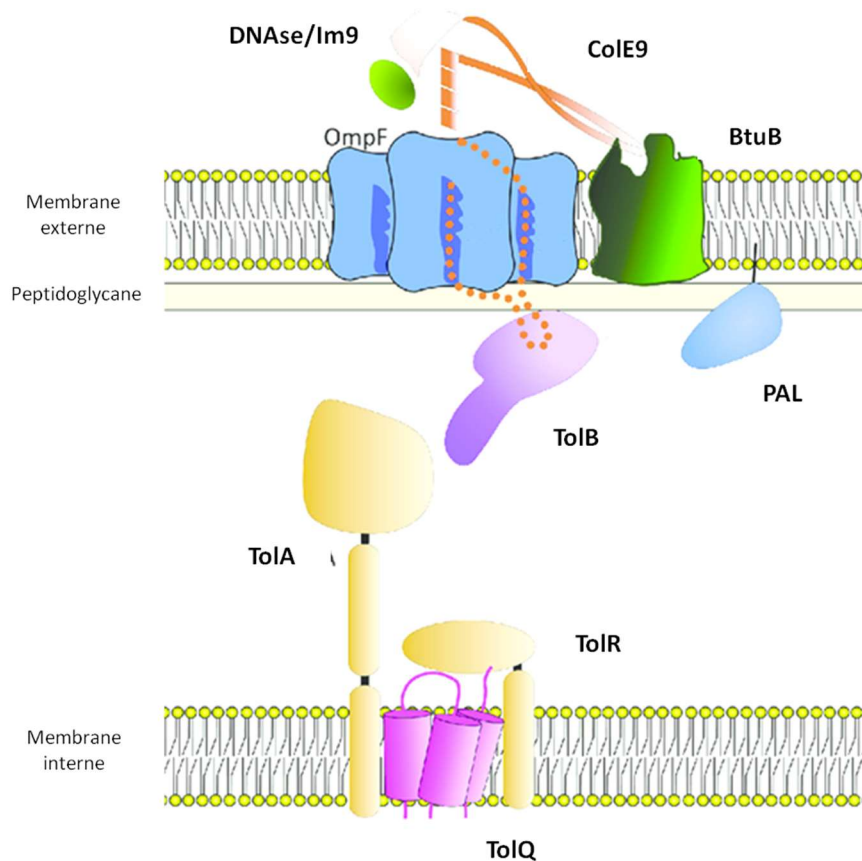


Figure 32 : Représentation schématique du translocon formé par la ColE9 avec les protéines BtuB et OmpF. La ColE9 se lie dans un premier temps avec le récepteur BtuB, puis recrute la porine OmpF *via* la région intrinsèquement désordonnée de son domaine N-terminal (représentée par le segment en pointillés). Ce dernier entre alors en contact avec la protéine TonB (d'après Kim *et al.*, 2014).

La présence de l'ensemble des protéines du système Tol n'est pas obligatoirement requise pour l'import des colicines du groupe A à travers la membrane externe. Ainsi, les colicines A, E2 à E9 et K sont dépendantes des protéines TolABQR, alors que la colicine E1 ne dépend que des protéines TolAQ (Cascales *et al.*, 2007). Il en découle des interactions spécifiques entre le domaine N-terminal de chaque colicine et un (ou des) composant(s) dédié(s) du système Tol. Ainsi, des interactions entre le domaine N-terminal de ColA et ToIA, mais aussi ToIB ont été démontrées (Bénédicti *et al.*, 1991; Bouveret *et al.*, 1998). De même, des interactions entre les domaines N-terminaux des ColE3, ColE1 et ColK avec, respectivement, ToIB (Bouveret *et al.*, 1997), ToIR (Journet *et al.*, 2001) et ToIQ (Barnéoud-Arnolet *et al.*, 2010a) ont été mises en évidence. L'interaction de chaque colicine avec un composant précis du système Tol se fait au niveau de séquences peptidiques spécifiques et conservées, appelées « Tol boxes ». Une colicine qui interagit avec plusieurs protéines du système Tol possède alors plusieurs « Tol boxes ».

L'identification de ces différentes interactions entre protéines du système Tol et colicines, notamment celles observées lors de l'import de ColA, ont permis d'émettre un modèle pour la translocation des protéines du groupe A. Comme mentionné précédemment, ColA est capable d'interagir avec les protéines TolA, TolB et TolR. Les régions d'interaction de ColA avec les protéines TolB et TolR sont chevauchantes, ce qui suggère qu'elle interagit avec ces protéines de manière différentielle. Il a donc été proposé, comme présenté dans la **figure 33**, que les colicines du groupe A interagissent avec les différentes protéines du système Tol de manière séquentielle et unidirectionnelle. Ce mécanisme serait assuré par des différences d'affinité entre la colicine et ses partenaires successifs, chaque interaction étant plus forte que la précédente. Ainsi, après sa liaison au récepteur et sa dénaturation partielle (**Figure 33, étapes 1 et 2**), la colicine interagirait d'abord avec TolB, puis avec TolA (**Figure 33, étapes 3 et 4**). L'interaction avec TolA serait à l'origine de la dégradation de ce partenaire protéique, induisant ainsi une perte d'affinité qui permettrait alors au domaine de translocation de la colicine d'interagir avec TolR (**Figure 33, étape 5**). Le domaine d'activité de la colicine traverserait ensuite la membrane externe (**Figure 33, étape 6**) selon un mécanisme encore inconnu, qui ne nécessiterait aucun apport d'énergie. A noter, d'ailleurs, que la translocation de ColA est énergie-indépendante (Bourdineaud *et al.*, 1990; Goemaere *et al.*, 2007).

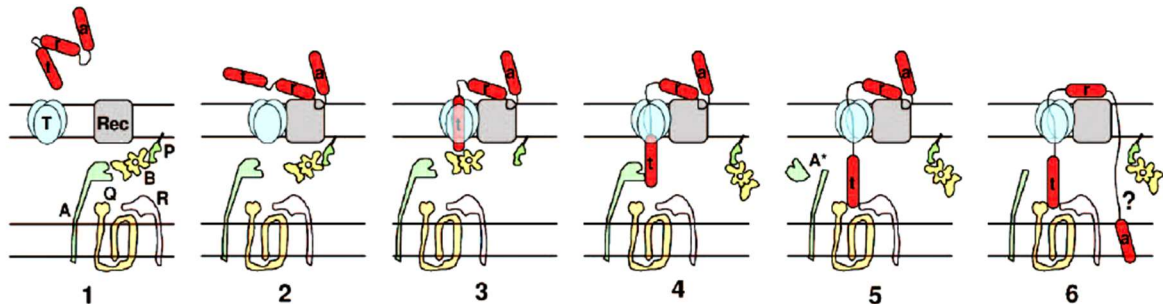


Figure 33 : Modèle de translocation pour les colicines du groupe A. La colicine se lie dans un premier temps à la surface de la bactérie cible au niveau d'un récepteur spécifique (Rec) et se déplie partiellement à son contact (étapes 1 et 2). Le domaine N-terminal de translocation traverse ensuite le deuxième récepteur (T) et entre en interaction avec la protéine TolB (étape 3) puis avec TolA (étape 4). Le domaine de translocation interagit alors avec TolQ et/ou TolR (étape 5). Enfin, le domaine catalytique traverse la membrane plasmique selon un mécanisme inconnu (?) (étape 6). La colicine est représentée en rouge. t : domaine de translocation ; r : domaine de réception ; a : domaine d'activité. A : TolA ; A* : produit de dégradation de TolA ; B : TolB ; P : Pal ; Q : TolQ ; R : TolR. (d'après Cascales *et al.*, 2007).

En revanche, pour les colicines nucléasiques, une source d'énergie peut être requise en amont de la translocation. En effet, lors de la fixation au récepteur, elles sont complexées avec leur protéine d'immunité. La dissociation de ces deux protéines est un processus dépendant de la force proton-motrice et d'un système Tol fonctionnel, comme cela a pu être montré pour la ColE9 et sa protéine d'immunité (Vankemmelbeke *et al.*, 2009).

Par ailleurs, comme indiqué à l'étape 2 sur la **figure 33**, il a été montré qu'un dépliement partiel de la colicine pouvait être nécessaire pour assurer sa translocation. Cette relative déstructuration concernant les domaines de réception et de translocation a été démontrée pour les ColA (Bénédicti *et al.*, 1992; Duché *et al.*, 1994a) et ColE1 (Griko *et al.*, 2000). Dans le cas de la ColE3, ce dépliement serait induit après sa liaison au récepteur BtuB, mais également lors de l'insertion de son domaine de translocation dans la protéine-canal OmpF (Zakharov *et al.*, 2008). Observé lors de l'import de plusieurs colicines, ce phénomène de dépliement plus ou moins local serait donc commun à l'ensemble des colicines.

Enfin, le domaine de réception d'une colicine peut rester lié à son récepteur alors même que ses domaines de translocation et d'activité ont été transloqués dans le périplasme. Ainsi, le domaine de réception de la ColA est toujours lié à BtuB au moment de la formation des pores dans la membrane interne (Bénédicti *et al.*, 1992). Il en est de même pour le domaine de réception de la ColE2, toujours lié à ce même récepteur au moment où le domaine d'activité pénètre au sein de la cellule (Duché, 2007).

4.3.3. Translocation *via* le système TonB :

Le système de translocation TonB est composé des trois protéines TonB, ExbB et ExbD. Chez *E. coli*, contrairement aux gènes codant pour le système Tol, les gènes codant pour les trois protéines du système TonB ne sont pas regroupés au sein d'un seul et même opéron. En effet, le gène *tonB* est éloigné des gènes *exbB* et *exbD*, qui sont, eux, organisés en opéron (Eick-Helmerich et Braun, 1989; Postle, 1990).

Les protéines TonB, ExbB et ExbD sont toutes les trois ancrées par un ou plusieurs segments transmembranaires à la membrane plasmique (**Figure 30**), et elles y forment un complexe (Postle et Kadner, 2003). Plusieurs études ont permis de montrer les interactions qui existent entre ces trois protéines. Les premières études ont apporté des preuves indirectes : il a par exemple été montré que la surproduction de ExbB stabilisait les protéines ExbD et TonB (Fischer *et al.*, 1989).

Par la suite, d'autres expériences ont permis de mettre en évidence de façon directe les interactions biologiques réelles ayant lieu entre les protéines du système TonB. Ainsi, des expériences de pontage chimique *in vivo* ont permis de montrer que TonB était en interaction à la fois avec ExbB et ExbD (Larsen *et al.*, 1994; Higgs *et al.*, 1998;). Entre TonB et ExbD, les interactions se font entre le domaine C-terminal de la première et le domaine périplasmique de la seconde (Ollis et Postle, 2012), alors que TonB et ExbB interagissent au niveau de leurs segments transmembranaires respectifs (Larsen *et al.*, 1994). Enfin, l'interaction entre ExbB et ExbD a été mise en évidence à l'aide d'expériences de co-purification (Braun *et al.*, 1996) et de pontage chimique (Ollis *et al.*, 2009). Ces deux protéines formeraient un canal ionique utilisant la force proton-motrice (Cascales *et al.*, 2001; Zhai *et al.*, 2003; Ollis *et al.*, 2009).

Comme mentionné précédemment, le système de translocation TonB est parasité par les colicines du groupe B. Pour emprunter ce système, ces colicines doivent d'abord se lier à des récepteurs de membrane externe TonB-dépendants, qui possèdent au niveau du « *plug* » une séquence appelée « *TonB box* » responsable de l'interaction avec la protéine TonB (Wiener, 2005). La séquence consensus de la « *TonB box* » pour les récepteurs TonB-dépendants est la suivante : (D/E)T(I/L)(V/T)V. Les colicines du groupe B possèdent également en N-terminal une séquence d'interaction avec TonB. Ce motif pentapeptidique conservé, également appelé « *TonB box* », est compris au sein d'une séquence consensus de 11 résidus. La séquence consensus de la « *TonB box* » des colicines du groupe B est la suivante : (D/E)TM(V/T)V. Les *TonB boxes* du récepteur et de la colicine doivent impérativement interagir avec la protéine TonB lors de la translocation. Des mutations au niveau de la *TonB box* du récepteur ou de la colicine abolissent l'import de cette dernière (Mende et Braun, 1990 ; Pilsel *et al.*, 1993 ; Mora *et al.*, 2005 ; Buchanan *et al.*, 2007). Ces données suggèrent que la protéine TonB interagit à la fois avec le récepteur et avec la colicine au cours du processus de translocation des colicines du groupe B. Selon la colicine considérée, plusieurs scénarios sont proposés :

- il a récemment été montré que la colicine la nécessitait la présence de deux récepteurs Cir pour les étapes de réception et de translocation (Jakes et Finkelstein, 2010). Il s'agit pour l'heure de la seule colicine ayant besoin de deux copies d'un même récepteur. Le premier récepteur servirait uniquement à la liaison au niveau de la membrane externe alors que le second récepteur serait impliqué dans la translocation. En effet, la Colla possède deux grandes hélices qui séparent le domaine de réception des domaines de translocation et d'activité (**Figure 28**). La liaison sur le premier récepteur permettrait à son domaine de translocation d'interagir avec le deuxième récepteur Cir. L'interaction du domaine de translocation de la Colla avec le récepteur Cir serait à l'origine d'un mouvement du *plug* rendant la *TonB box* du récepteur accessible à la protéine TonB, qui fournirait alors l'énergie nécessaire pour que le *plug* sorte de façon partielle ou totale du tonneau. TonB pourrait alors interagir avec le domaine de translocation de la Colla et ainsi permettre la translocation de son domaine d'activité à travers la membrane externe. Cette interaction de la protéine TonB avec la Colla peut être soit réalisée par le monomère de TonB ayant interagi avec le *plug* (**Figure 34, A**), soit par une deuxième protéine TonB (**Figure 34, B**) (Jakes et Finkelstein, 2010). La translocation du domaine catalytique nécessiterait un relatif dépliement de ce dernier, car même si le *plug* sort complètement du tonneau, l'ouverture n'est pas suffisante pour laisser passer la colicine dans un état natif (Jakes et Cramer, 2012).

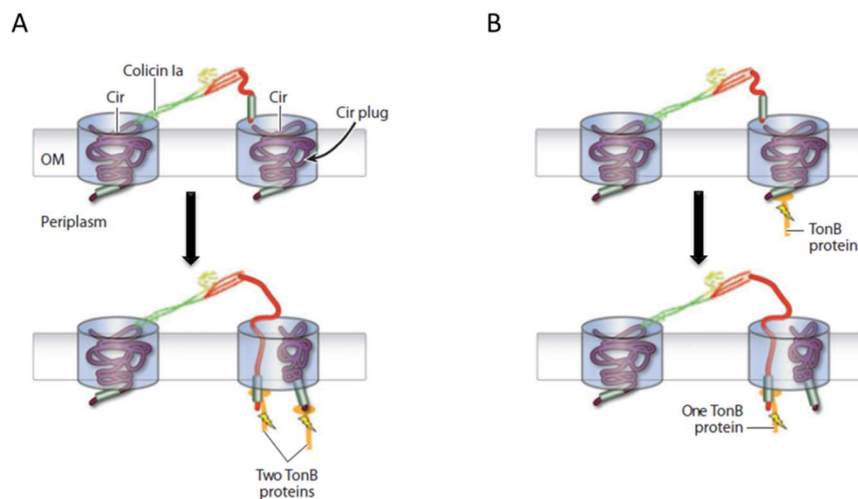


Figure 34 : Présentation des deux modèles de translocation proposés pour la colicine la à travers le récepteur Cir. A : La colicine la se lie à un récepteur Cir par l'intermédiaire de son domaine de réception (en vert). Le domaine de translocation (en rouge), non structuré, se lie à un second récepteur Cir. Une première protéine TonB (en orange) se lie au niveau de la *TonB box* (cylindre argenté) de Cir. TonB fournit alors l'énergie, provenant de la force proton-motrice, qui permet le réarrangement du *plug* (violet). Le domaine N-terminal de la Colla traverse alors le récepteur et lie, par sa *TonB box*, une protéine TonB, différente de celle ayant lié Cir. B : Dans ce deuxième modèle, la colicine la se lie toujours au niveau de Cir dans un premier temps. Le domaine de translocation se lie ensuite à un second récepteur Cir. Cette liaison est à l'origine d'un réarrangement au niveau du *plug*, qui peut alors interagir avec TonB. L'énergie issue de la force proton-motrice apportée par TonB conduit à un changement conformationnel du *plug* permettant le passage du domaine de translocation à travers Cir. La Colla entre ensuite en compétition avec la *TonB box* de Cir pour lier TonB. La *TonB box* de la Colla se lie donc à la place de Cir sur TonB. TonB fournit l'énergie nécessaire pour permettre la translocation du domaine N-terminal de la Colla. Les éclairs jaunes représentent l'énergie fournie par TonB et qui provient de la force proton-motrice (d'après Jakes et Cramer, 2012).

- pour la colicine B, les étapes de réception et de translocation ne sont *a priori* dépendantes que d'une seule copie du récepteur. Des études cristallographiques menées sur ColB ont fait émerger un modèle de translocation des colicines du groupe B différent de celui proposé pour la Colla (Hilsenbeck *et al.*, 2004). Comme pour la Colla, la liaison de la ColB à son récepteur induirait un changement conformationnel au niveau du *plug*, permettant ainsi son interaction, *via* la *TonB box*,

avec la protéine TonB. Cette interaction entraînerait alors un mouvement du *plug* assurant l'interaction entre le domaine de translocation de la ColB et TonB. Bien que la ColB possède une hélice α séparant le domaine d'activité des domaines de réception et translocation, elle ne semble pas assez longue pour permettre au domaine C-terminal de traverser le périplasma et d'exercer son action létale. Il a donc été suggéré que la ColB complète soit transloquée à l'intérieur de la cellule et que l'énergie nécessaire à ce transport provienne de la force proton-motrice, transmise par l'intermédiaire de l'interaction entre TonB et la ColB (**Figure 35**).

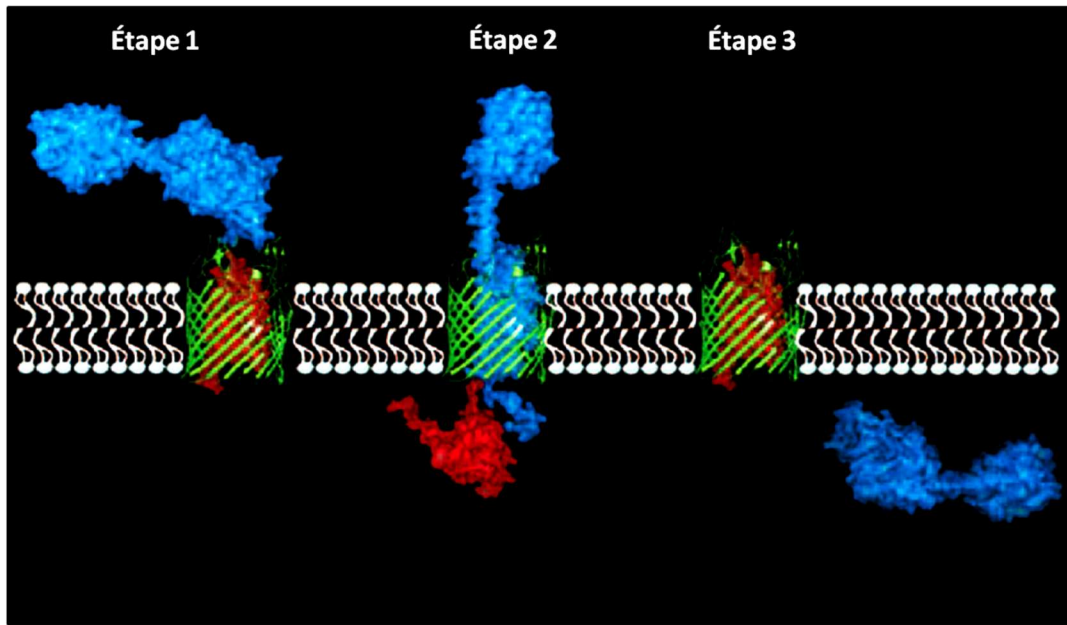


Figure 35 : Modèle de translocation de la colicine B à travers son récepteur FepA. Etape 1 : La ColB (en bleu) se fixe au niveau de son récepteur de membrane externe FepA (en vert). Cette liaison est à l'origine d'un déplacement du *plug* (en rouge). Etape 2 : La ColB pénètre dans le pore et est transloquée à travers la membrane. Etape 3 : La ColB est libérée dans le périplasma. Le *plug* retourne au centre du tonneau β , ce qui entraîne la fermeture du pore (d'après Hilsenbeck *et al.*, 2004).

Ce modèle de translocation suggérant l'import d'une colicine entière au sein de la bactérie est également avancé pour la ColM qui présente une structure tridimensionnelle très compacte (Zeth *et al.*, 2008). L'énergie apportée par le système TonB apparaît essentielle pour cette étape de translocation (Mende et Braun, 1990).

Un modèle général concernant la translocation des autres colicines du groupe B est présenté dans le **figure 36**. Ce modèle montre que la liaison de la colicine à son récepteur permet l'interaction entre la *TonB box* de ce dernier et la protéine TonB (**Figure 36, étape 2**). Cette interaction induit un mouvement du *plug*, ce qui permet au domaine de translocation de la colicine d'entrer à son tour en contact avec la protéine TonB *via* sa propre *TonB box* (**Figure 36, étapes 3 et 4**). Puis l'énergie fournie par le système TonB permet l'import du domaine catalytique selon un mécanisme qui n'est pour l'heure pas clairement identifié (**Figure 36, étape 5**) (Cascales *et al.*, 2007).

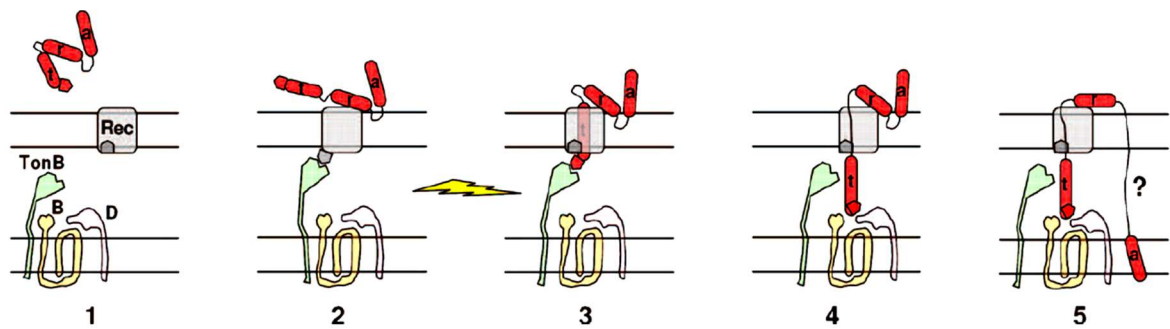


Figure 36 : Modèle général de translocation pour les colicines du groupe B. La colicine (en rouge) se lie dans un premier temps à son récepteur (Rec) (étapes 1 et 2). Cette liaison est à l'origine du réarrangement conformationnel du *plug* qui permet ainsi à la *TonB box* du récepteur (trapèze gris) d'interagir avec TonB (étape 2). Le système Ton fournit ensuite l'énergie nécessaire (éclair jaune) à la translocation du domaine N-terminal de la colicine, qui interagit alors à son tour avec TonB par l'intermédiaire de sa *TonB box* (trapèze rouge) (étape 3). Le domaine de translocation se dissocie ensuite de TonB et interagit avec ExbB et/ou ExbD (étape 4). Le domaine d'activité est ensuite transloqué au sein de la cellule cible selon un mécanisme non encore élucidé (?). t : domaine de translocation ; r : domaine de réception ; a : domaine d'activité ; B : ExbB ; D : ExbD. (d'après Cascales *et al.*, 2007).

4.4. Maturation des colicines :

Les colicines à activité nucléasique agissent sur des cibles localisées dans cytoplasme. Pour y parvenir, elles doivent donc, en plus de traverser la membrane externe et le périplasm, passer à travers la membrane interne de la bactérie cible afin d'exercer leur activité cytotoxique.

Des données expérimentales montrent que certaines colicines, comme la ColE2 (Duché, 2007), sont toujours en interaction avec leur récepteur lorsqu'elles exercent leur activité cytotoxique. Cependant, récepteur et cible sont éloignés spatialement, ce qui a conduit à émettre l'hypothèse d'un clivage protéolytique permettant la libération du domaine catalytique pour qu'il puisse atteindre sa cible. Cette hypothèse a ensuite été confirmée par l'identification des domaines catalytiques isolés au sein du cytoplasme de cellules traitées par les ColD et ColE3 (Chauleau *et al.*, 2011). Plus récemment, cela a également été observé pour les ColE2 et ColE7 (Mora et de Zamaroczy, 2014). La libération des domaines catalytiques des colicines nucléasiques nécessite donc l'intervention d'une protéase.

La protéase LepB (*leader peptidase B*) est essentielle à l'activité de la ColD (de Zamaroczy *et al.*, 2001). Il s'agit d'une protéase présente dans la membrane interne et normalement impliquée dans l'export de protéines (Sung et Dalbey, 1992). Bien que le clivage de ColD soit dépendant de LepB, il n'est pas réalisé par cette dernière. En effet, l'incubation de ColD en présence de LepB purifiée n'aboutit pas à la libération du domaine catalytique *in vitro*. D'autre part, LepB n'est pas requise pour l'activité des autres colicines nucléasiques (de Zamaroczy *et al.*, 2001) : c'est la protéine FtsH qui a été identifiée comme étant essentielle à leur activité (Walker *et al.*, 2007). Son implication directe dans la libération des domaines catalytiques dans le cytoplasme des cellules cibles a été démontrée pour les colicines D et E3 (Chauleau *et al.*, 2011) et E2 et E7 (Mora et de Zamaroczy, 2014). Il s'agit d'une métallo-endoprotéase appartenant à la famille AAA (« *ATPase Associated with various cellular Activities* »). Son rôle est de détecter les protéines mal repliées au sein du périplasm, de les dégrader et de libérer les produits de dégradation dans le cytoplasme (Ito et Akiyama, 2005; Bittner *et al.*, 2017).

Afin d'interagir avec la protéase, les colicines nucléasiques, généralement chargées positivement, doivent traverser le périplasm et se rapprocher de la membrane plasmique, chargée

négativement (Walker *et al.*, 2007). Cette interaction avec la membrane plasmique peut être à l'origine d'un réarrangement conformationnel de la colicine, comme cela a été démontré pour les ColE9 et ColE3 (Mosbahi *et al.*, 2004, 2006). Ce changement conformationnel est probablement à l'origine du recrutement de la colicine par la protéase FtsH, qui la clive alors et envoie son domaine catalytique dans le cytoplasme (de Zamaroczy et Mora, 2012). La ColD présente un mode d'action différent, puisque c'est son interaction avec la protéase LepB (Mora *et al.*, 2015) qui serait à l'origine de son changement conformationnel avant sa prise en charge par FtsH. Cette dernière serait alors responsable de sa translocation à travers la membrane plasmique (de Zamaroczy et Mora, 2012). Le modèle général de translocation des colicines nucléasiques est présenté dans la **figure 37**.

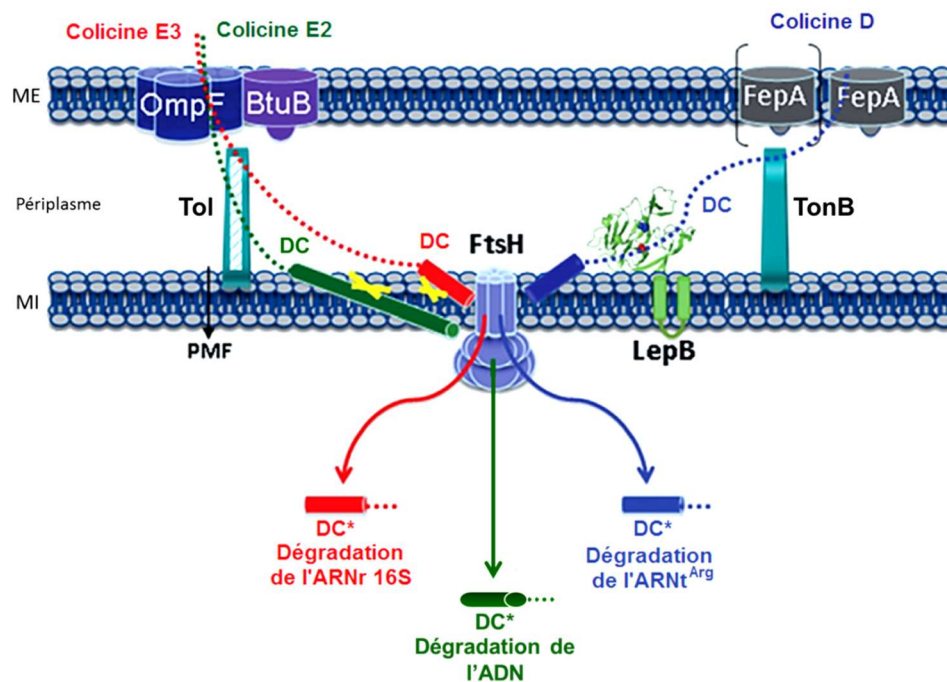


Figure 37 : Modèle de translocation des colicines nucléasiques ColE2, ColE3 et ColD. Les ColE2 et ColE3 se fixent au niveau du récepteur BtuB et utilisent OmpF comme translocateur. La ColD emprunte le récepteur FepA. Il est possible que sa translocation à travers la membrane externe (ME) nécessite deux copies du récepteur, comme pour la Colla. C'est pourquoi un deuxième récepteur est représenté entre parenthèses. Les systèmes de translocation TonB et Tol empruntés par ces colicines sont également représentés. Les étapes clés de la translocation à travers la membrane interne (MI) sont montrées plus en détails : Les ColE2 et ColE3, chargées positivement, interagissent avec la membrane plasmique chargée négativement par le biais d'interactions électrostatiques (modélisées par les croix jaunes). Cette interaction permet une insertion partielle des domaines catalytiques dans la membrane interne ainsi qu'un réarrangement conformationnel permettant la prise en charge par FtsH. Les domaines catalytiques de ColE2 (cylindre vert) et ColE3 (cylindre rouge) sont alors libérés dans le cytoplasme et peuvent dégrader respectivement l'ADN et l'ARNr 16S. Le domaine catalytique de la ColD (cylindre bleu) interagit quant à lui avec LepB après avoir pénétré dans le cytoplasme. Cette interaction permet la prise en charge de la ColD par FtsH et la libération de son domaine catalytique isolé dans le cytoplasme. La ColD peut alors dégrader l'ARNt^{Arg}. DC : Domaine Catalytique ; DC* : Domaine Catalytique isolé suite à l'action de la protéine FtsH ; PMF : force proton-motrice (d'après de Zamaroczy et Mora, 2012).

La seule autre colicine connue à ce jour pour nécessiter un processus de maturation est la ColIM. En effet, son activité est dépendante de la protéine périplasmique et ubiquitaire FkpA, qui possède à la fois un domaine chaperonne et un domaine peptidylprolyl *cis-trans* isomérase (Helbig *et al.*, 2011; Hullmann *et al.*, 2008).

4.5. **Activité cytotoxique des colicines :**

4.5.1. **Les colicines ionophoriques :**

Les structures tridimensionnelles des domaines catalytiques des colicines ionophoriques ColA (Parker *et al.*, 1992), ColE1 (Elkins *et al.*, 1997), ColIa (Wiener *et al.*, 1997), ColN (Vetter *et al.*, 1998) et ColB (Hilsenbeck *et al.*, 2004) sont aujourd'hui connues. Ces domaines présentent une organisation structurale commune (**Figure 38**) au sein de laquelle deux hélices centrales hydrophobes (hélices $\alpha 8$ et $\alpha 9$) sont entourées par huit autres hélices α amphiphiles (Cascales *et al.*, 2007). Cette très forte similarité structurale suggère que l'ensemble des colicines ionophoriques partagent un mécanisme d'action commun lors de la formation du pore dans la membrane interne.

Domaines ionophoriques

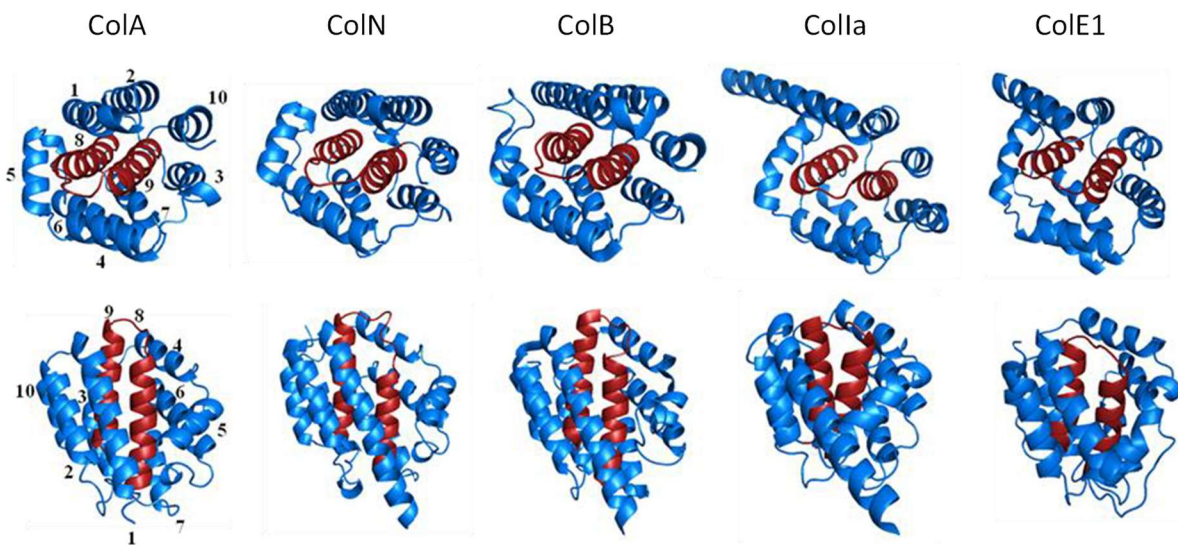


Figure 38 : Structures tridimensionnelles des domaines ionophoriques isolés des colicines A, N, B, Ia et E1. Chaque domaine est représenté selon deux orientations différentes. Les hélices hydrophobes $\alpha 8$ et $\alpha 9$ sont orientées soit perpendiculairement au plan de la feuille (en haut), soit parallèlement (en bas). Chaque hélice est numérotée en fonction de son ordre d'apparition dans la structure primaire (uniquement pour la ColA). Les hélices $\alpha 8$ et $\alpha 9$ correspondant au cœur hydrophobe du domaine ionophorique sont représentées en rouge. Les hélices amphiphiles sont colorées en bleu. (d'après Cascales *et al.*, 2007).

La formation de ce pore est réalisée en deux étapes. La première est voltage-indépendante et correspond à l'association du domaine catalytique de la colicine avec la membrane interne. Il en résulte l'insertion des hélices hydrophobes 8 et 9 au sein de cette dernière. Deux modèles sont avancés pour schématiser l'organisation des autres hélices dans la membrane (**Figure 39**). Dans le modèle dit du « parapluie ouvert », les hélices 8 et 9 sont insérées perpendiculairement à la membrane et les autres hélices amphiphiles se situent à l'interface entre la membrane et le périplasma (Parker *et al.*, 1989). Dans le modèle du « couteau suisse », les hélices 1 et 2 s'éloignent du reste de la molécule lors de la fixation de la protéine dans la membrane et les hélices 8 et 9 s'insèrent au sein de la membrane dans une orientation parallèle à celle-ci. Les hélices restantes recouvrent alors les hélices 8 et 9 et se retrouvent à la surface de la membrane (Lakey *et al.*, 1993; Duché *et al.*, 1994b).

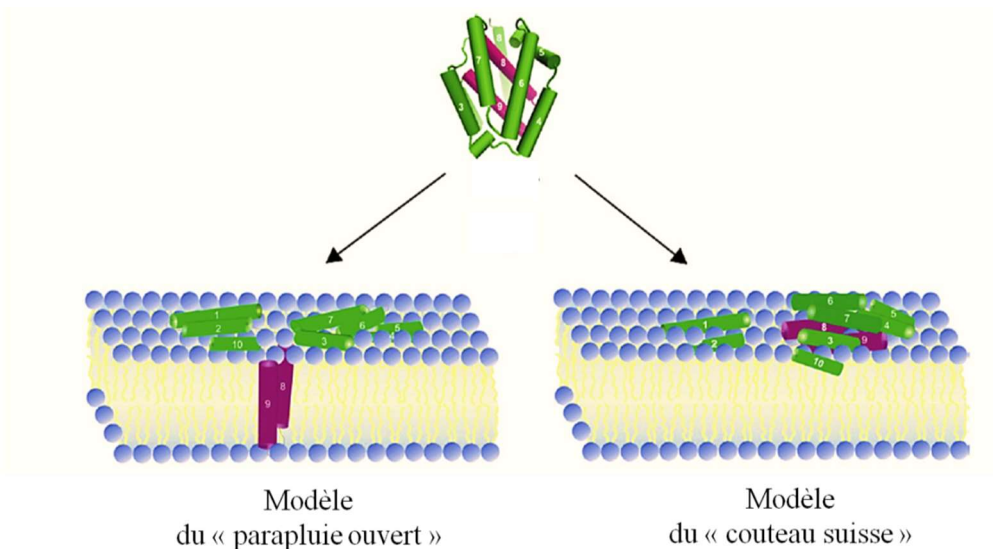


Figure 39 : Représentation schématique des deux modèles d'insertion d'un domaine ionophorique au sein de la membrane interne (d'après Padmavathi et Steinhoff, 2008).

Le modèle du « parapluie ouvert » a récemment été supporté par des expériences de résonance paramagnétique électronique réalisées sur la ColA (Pulagam et Steinhoff, 2013). Le même type d'expérience suggère l'association *in vivo* de la ColA sous forme dimérique au sein de la membrane. Cette dimérisation permettrait alors la formation d'un pore suffisamment large pour permettre le passage de certains ions, aboutissant à une dépolarisation de la membrane (Dunkel *et al.*, 2015). Un modèle de formation de pore a ainsi été proposé à partir de ces résultats (**Figure 40**).

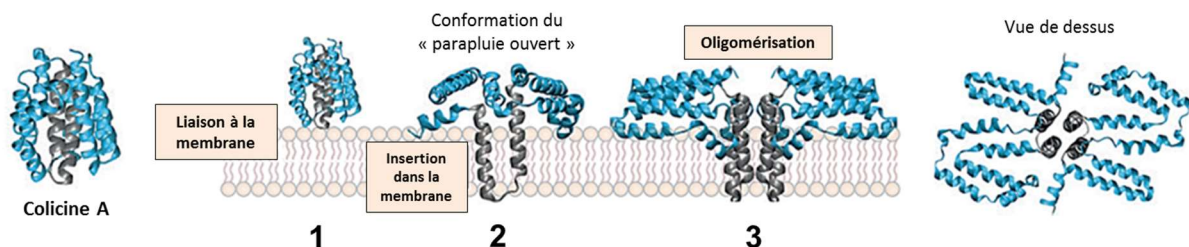


Figure 40 : Modèle putatif de formation du pore pour la ColA. Le domaine ionophorique se lie dans un premier temps à la membrane (étape 1). L'insertion du cœur hydrophobe au sein de la membrane du cœur hydrophobe s'accompagne d'un changement conformationnel, et le domaine ionophorique adopte alors la conformation dite du « parapluie ouvert » (étape 2). Une fois insérés, deux domaines ionophoriques dimérisent et permettent la formation d'un pore dans la membrane (étape 3). La structure du dimère est également vue de dessus (à droite). Les hélices hydrophobes 8 et 9 sont colorées en gris et les hélices amphiphiles en bleu. La conformation du domaine catalytique et l'organisation des hélices présentées dans ce modèle sont hypothétiques (d'après Dal Peraro et van der Goot, 2016).

La deuxième étape intervenant dans la formation du pore par les colicines ionophoriques est voltage-dépendante. C'est l'étape d'ouverture du pore, qui est associée au transfert d'une partie du domaine catalytique dans le cytoplasme, comme cela a pu être montré pour les colicines A et Ia (Slatin *et al.*, 1994; Qiu *et al.*, 1996).

La formation de ces pores au niveau de la membrane interne est responsable de la dépolarisation de cette membrane et d'une déplétion du pool d'ATP intracellulaire, ce qui conduit *in fine* à la mort bactérienne (Cascales *et al.*, 2007).

4.5.2. Les colicines nucléasiques :

Toutes les colicines enzymatiques, mis à part la ColM, possèdent une activité nucléasique de dégradation ciblant l'un des trois types d'acides nucléiques : l'ADN, certains ARNt et l'ARNr 16S (Cascales *et al.*, 2007; Papadakos *et al.*, 2012). La dégradation de ces molécules se fait par l'hydrolyse d'une liaison phosphodiester.

Les colicines qui dégradent l'ADN sont les ColE2, E7, E8 et E9. Ces enzymes fixent un cation divalent et coupent l'ADN chromosomique de manière non spécifique (James *et al.*, 2002). Ces enzymes possèdent au niveau de leur domaine catalytique le motif caractéristique H-N-H des endonucléases (Papadakos *et al.*, 2012). Elles dégradent préférentiellement l'ADN double brin, mais peuvent également cliver *in vitro* des ADN ou ARN simples brins (Pommer *et al.*, 2001).

Les ColE3, E4 et E6 ciblent l'ARN ribosomique 16S. La ColE3 clive par exemple la liaison entre les nucléotides A1493 et G1494 au niveau du site A du ribosome (Senior et Holland, 1971). La dégradation de cette liaison empêche la formation de la liaison peptidique et affecte également la fixation des ARNt chargés au niveau du site A (Lancaster *et al.*, 2008). La dégradation de l'ARNr 16S par ces colicines est donc à l'origine d'un arrêt de synthèse des protéines, laquelle cause la mort bactérienne.

Enfin, les ColD et ColE5 sont responsables de la dégradation d'ARNt. La ColE5 dégrade les ARNt^{Tyr}, ARNt^{His}, ARNt^{Asn} et ARNt^{Asp} (Ogawa *et al.*, 2006) et la ColD cible quant à elle trois des quatre ARNt^{Arg} (Tomita *et al.*, 2000). Ces deux colicines sont donc également responsables d'un arrêt de la synthèse protéique.

5. La protéine d'immunité :

Pour se protéger, les souches productrices de colicines synthétisent de façon concomitante une protéine d'immunité codée par le gène *cxi* (Cascales *et al.*, 2007).

5.1. Protéines d'immunité des colicines ionophoriques :

Les protéines d'immunité des colicines ionophoriques sont des protéines intégrales de membrane dont la taille varie entre 8 et 11 kDa. Il en existe deux types, celles de type A, qui possèdent 4 segments transmembranaires (ColA, B, N, U, Y et S4) et celles de type E1, qui possèdent 3 segments transmembranaires (ColE1, 5, 10, K, Ia et Ib) (**Figure 41**) (Cascales *et al.*, 2007).

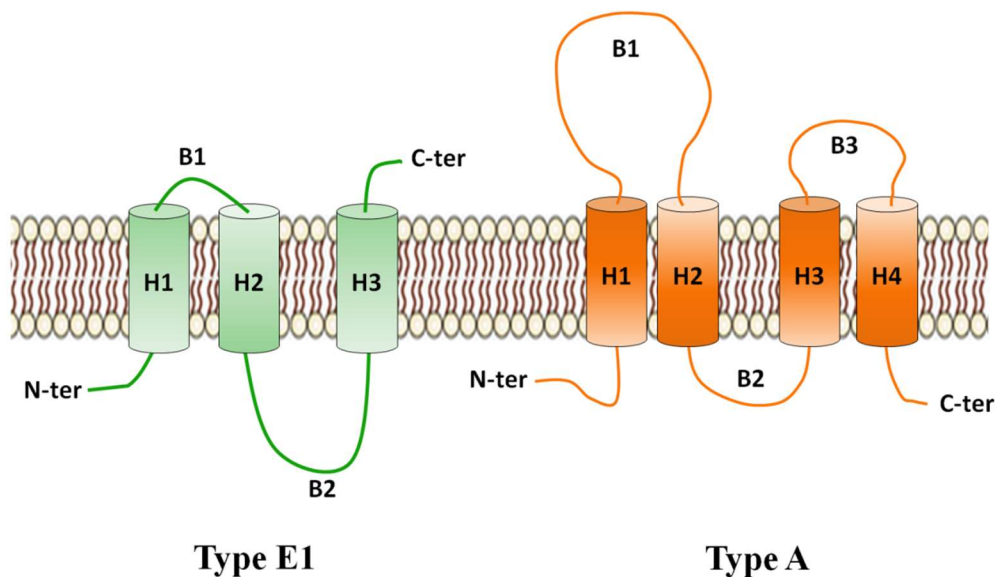


Figure 41 : Topologie membranaire des protéines d'immunité de types A et E1 associées aux colicines ionophoriques. La protéine d'immunité de type E1 est représentée en vert et celle de type A en orange. H1, H2, H3 et H4 correspondent aux hélices transmembranaires. B1, B2 et B3 correspondent aux boucles. N-ter : extrémité N-terminale ; C-ter : extrémité C-terminale.

La reconnaissance entre protéine d'immunité et colicine ionophorique s'opère au niveau du domaine C-terminal de cette dernière : cette interaction directe a été montrée pour les ColA et ColE1 (Bénédicti *et al.*, 1991; Espeset *et al.*, 1996). Si le domaine catalytique de la ColA est substitué par celui de la ColE1, alors l'immunité contre cette protéine chimère est dépendante de la nature du domaine catalytique présent (Bénédicti *et al.*, 1991). La région structurale du domaine ionophorique précisément reconnue par la protéine d'immunité diffère si la protéine d'immunité est de type A ou de type E1. Les protéines de type A semblent en effet reconnaître et interagir avec la colicine au niveau des deux hélices centrales hydrophobes ($\alpha 8$ et $\alpha 9$) du domaine catalytique (Geli et Lazdunski, 1992; Nardi *et al.*, 2001), alors que celles de type E1 reconnaissent la colicine au niveau d'une hélice hydrophobe et d'une hélice amphiphile sensible au potentiel de membrane (Zhang et Cramer, 1993; Lindeberg et Cramer, 2001).

Les zones structurales reconnues pour l'interaction entre colicines ionophoriques et protéines d'immunité suggèrent que ces dernières empêchent la dépolarisation de la membrane interne soit en empêchant l'ouverture du canal, soit en le bloquant juste après son ouverture (Cascales *et al.*, 2007).

5.2. Protéines d'immunité des colicines nucléasiques :

Pour éviter que la production des colicines nucléasiques au sein du cytoplasme n'aboutisse à un suicide cellulaire, la production concomitante de la protéine d'immunité est nécessaire. Elle va s'associer au domaine C-terminal pour inhiber son action (Kleanthous et Walker, 2001). Ces protéines d'immunité sont solubles et de petites tailles (environ 10 kDa). L'affinité pour leur colicine cible est extrêmement élevée, de l'ordre du femtomolaire (Wallis *et al.*, 1995a, 1995b; Li *et al.*, 2004), ce qui a notamment permis d'obtenir la structure des complexes ColE9-Im9 (Klein *et al.*, 2016), ColE7-Im7 (Hsieh *et al.*, 1997), ColD-ImD (Graille *et al.*, 2004), ColE3-Im3 (Carr *et al.*, 2000), et ColE5-Im5 (Luna-Chávez *et al.*, 2006) (Figure 42).

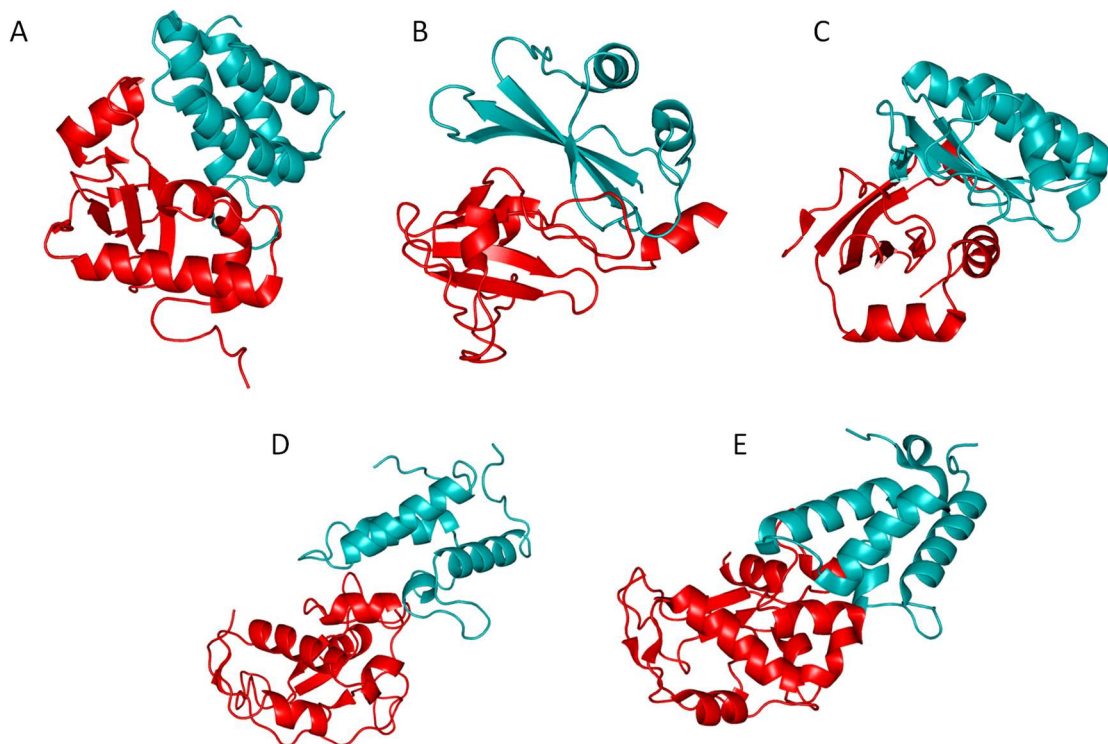


Figure 42 : Structures tridimensionnelles de domaines nucléasiques de colicines en complexe avec leurs protéines d'immunité. A : Structure du complexe ColD-ImD (code PDB : 1V74) ; B : Structure du complexe ColE3-Im3 (code PDB : 1E44) ; C : Structure du complexe ColE5-Im5 (code PDB : 2FHZ) ; D : Structure du complexe ColE7-Im7 (code PDB : 7CEI) ; E : Structure du complexe ColE9-Im9 (code PDB : 5EW5).

La résolution de ces structures a permis de mettre en avant deux modes d'inhibition des colicines nucléasiques par leurs protéines d'immunité. Dans le premier cas, la liaison de la protéine d'immunité sur le domaine catalytique de la colicine se fait à proximité du site actif, ce qui est à l'origine d'une gêne stérique empêchant alors le substrat d'accéder au site catalytique. Ce type d'inhibition est notamment observé pour la ColE3 (Carr *et al.*, 2000). Dans le second cas, la protéine d'immunité se fixe au niveau du site actif de la colicine en imitant le substrat naturel. Cela a été observé pour les ColD et ColE5 qui dégradent les ARNt (Graille *et al.*, 2004; Luna-Chávez *et al.*, 2006).

V. La colicine M et ses homologues :

1. La colicine M :

La colicine M (ColM) est unique dans le monde des colicines par sa taille et son mode d'action. En effet, il s'agit de la plus petite colicine connue à ce jour et de la seule colicine capable d'interférer avec la voie de biosynthèse du peptidoglycane.

1.1. Caractéristiques de la colicine M :

La ColM est composée de 271 résidus et a une masse moléculaire de 29 kDa, ce qui en fait la plus petite colicine identifiée à ce jour (Braun *et al.*, 1974; Köck *et al.*, 1987). Son gène est localisé au sein d'un plasmide *pcolBM*, qui code également pour la colicine B. Les gènes *cma* et *cmi*, codant respectivement pour la ColM et sa protéine d'immunité, sont localisés en aval des gènes *cba* et *cbi* – codant respectivement pour la ColB et sa protéine d'immunité (Olschläger *et al.*, 1984; Christenson et Gordon, 2009). La transcription du gène *cma* est sous le contrôle du promoteur SOS situé en amont du gène *cba*. Les gènes *cbi* et *cmi* sont localisés sur le brin opposé et sont sous le contrôle de leur propre promoteur (**Figure 43**). Aucune protéine de lyse n'a été identifiée pour la colicine M, sa libération dans le milieu extérieur s'effectuant selon un mécanisme encore inconnu.

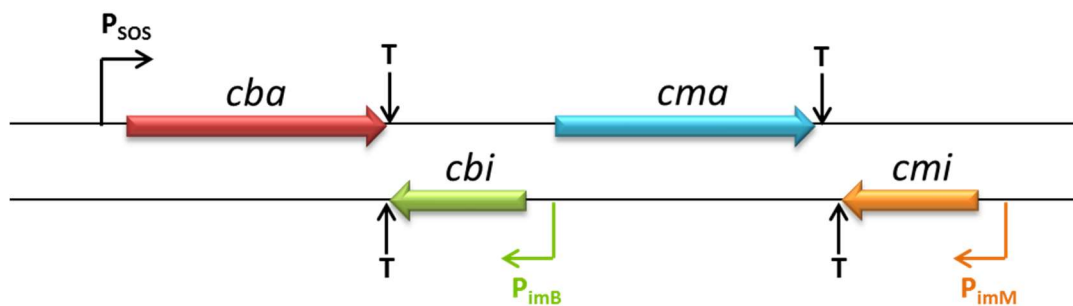


Figure 43 : Organisation génétique des colicines B et M. Les gènes codant pour les colicines B (*cba*) et M (*cma*) sont sous le contrôle d'un même promoteur (P_{SOS}). Les gènes codant pour les protéines d'immunité des ColB (*cbi*) et ColM (*cmi*) sont localisés sur le brin opposé, immédiatement en aval respectivement des gènes *cba* et *cma*. Le gène *cba* est sous le contrôle de son propre promoteur P_{imB} . Le gène *cmi* est également sous le contrôle de son propre promoteur P_{imM} . T : Termineur.

La ColM parasite le récepteur FhuA (Braun *et al.*, 1973, 1976; Coulton *et al.*, 1983) et le système de translocation TonB (PilsI *et al.*, 1993; Braun *et al.*, 2002). Une fois dans le périplasma, elle exerce son action létale en inhibant la voie de biosynthèse du peptidoglycane, ce qui conduit *in fine* à la lyse bactérienne (Schaller *et al.*, 1982; El Ghachi *et al.*, 2006).

1.2. Structure tridimensionnelle de la colicine M :

Obtenu en 2008, la structure tridimensionnelle de la ColM s'avère très compacte, comparativement aux autres colicines dont les structures ont été résolues. Les trois domaines impliqués dans les étapes de réception, de translocation et d'activité ne sont séparés les uns des autres que par quelques résidus (**Figure 44**) (Zeth *et al.*, 2008).

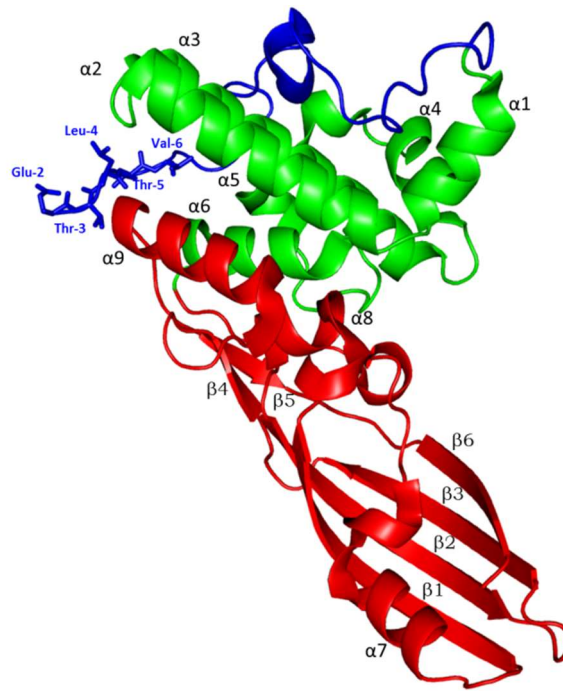


Figure 44 : Structure tridimensionnelle de la colicine M. Les trois domaines de la protéine sont colorés différemment : le domaine de translocation en bleu, le domaine central de réception en vert, et le domaine catalytique en rouge. Les structures secondaires $\alpha 1$ à $\alpha 9$ et $\beta 1$ à $\beta 9$ sont numérotées selon leur ordre d'apparition au sein de la structure primaire de la protéine. Les résidus ${}^2\text{ETLTV}^6$ de la *TonB box*, représentés en bâton, sont identifiés. (code PDB : 2XMX).

Le domaine N-terminal est formé par les résidus 1 à 35. Comme pour la plupart des colicines dont la structure a été résolue, ce domaine est non structuré et flexible. On retrouve au sein de ce domaine la *TonB box* (${}^2\text{ETLTV}^6$), séquence spécifique d'interaction avec la protéine TonB (PilsI *et al.*, 1993).

Le domaine central est constitué par les résidus 36 à 140. Il s'agit d'un domaine globulaire composé de six hélices α ($\alpha 1$ - $\alpha 6$), l'hélice $\alpha 3$ centrale se trouvant entourée par les cinq autres. Le domaine central est connecté au domaine C-terminal d'activité par le biais d'un petit feuillet β constitué par les brins $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 6$ et $\beta 7$. Les liaisons hydrogène présentes au sein de ce feuillet semblent stabiliser la structure générale de la protéine.

Le domaine catalytique est quant à lui composé par les résidus 141 à 271. Il présente une structure allongée dont la composition met en jeu à la fois des hélices α et un feuillet β . Ce dernier s'organise en un demi-tonneau β ouvert qui présente une forte homologie structurale avec le domaine β de l'autotransporteur Hia issu d'*Haemophilus influenzae* (Meng *et al.*, 2006). Cependant, cette délimitation du domaine catalytique uniquement basée sur la structure tridimensionnelle est en désaccord avec la longueur minimale du domaine catalytique nécessaire pour observer une activité *in vitro* et *in vivo* (Barreteau *et al.*, 2010). En effet, il a été déterminé au laboratoire par des expériences de troncation que le plus petit domaine catalytique actif était composé des résidus 122 à 271.

1.3. Mode d'action de la colicine M :

Comme pour les autres colicines, la séparation en trois domaines de la ColM est reliée à son mode d'action séquentiel en trois étapes.

1.3.1. Liaison de la colicine M sur le récepteur FhuA :

Au niveau de la membrane externe de sa cellule cible, la ColM parasite le récepteur FhuA. Ce dernier, normalement impliqué dans l'import des sidérophores à ferrichrome au sein de la cellule (Ferguson et Deisenhofer, 2004), constitue également la cible des phages T1, T5 et ϕ 80 (Braun *et al.*, 1976). La liaison de la ColM sur ce récepteur se fait par l'intermédiaire de son domaine central et notamment à l'aide de l'hélice α 1 (Helbig et Braun, 2011). En effet, la délétion de cette dernière (ColM Δ 38-46) empêche la fixation de la ColM à son récepteur. L'activité catalytique n'est pas affectée par cette délétion puisque la ColM Δ 38-46 est toujours active vis-à-vis d'*E. coli* si elle est envoyée directement dans le périplasma par un choc osmotique. Les régions déterminantes du récepteur FhuA impliquées dans la liaison avec la ColM ont également été identifiées. Il apparaît ainsi que les boucles L3, L7 et L8 présentes à la surface membranaire sont essentielles pour l'activité de la ColM (Endriss et Braun, 2004).

A l'inverse de la Colla, qui recrute deux copies du récepteur Cir pour les étapes de réception et de translocation (Jakes et Finkelstein, 2010), la ColM semble n'utiliser qu'une seule copie du récepteur FhuA pour réaliser ces deux étapes (Jakes, 2012). Lorsque la Colla est administrée à des cellules sensibles à une concentration trop élevée (170 molécules de Colla pour une de Cir), une forte diminution de la cytotoxicité est observée. Cette baisse d'efficacité s'explique par le fait qu'à de telles concentrations, tous les récepteurs Cir sont saturés par des molécules de Colla. Il n'en reste alors aucun pour effectuer l'étape de translocation. Le même type d'expérience de saturation réalisée avec la ColM n'a pas conduit à une diminution de la cytotoxicité, suggérant ainsi fortement que la ColM n'utilise qu'une seule copie de FhuA pour la réception et la translocation (Jakes, 2012). Cette différence dans le recrutement du nombre de récepteurs à la surface cellulaire est probablement reliée à la longueur des domaines de translocation respectifs des Colla et ColM. En effet, le domaine de translocation de la Colla a une longueur de 225 résidus. Une fois fixée au premier récepteur Cir, la Colla peut, par le biais de ce long domaine de translocation, recruter un deuxième récepteur pour effectuer l'étape de translocation. En revanche, le domaine de translocation de la ColM, d'une longueur de 35 résidus, ne permettrait pas à cette dernière de recruter un second récepteur suite à sa fixation sur le récepteur FhuA (Jakes, 2012).

1.3.2. Translocation de la colicine M :

L'étape de translocation est assurée par le domaine N-terminal de la ColM et sa présence est obligatoire pour observer une cytotoxicité naturelle (Dreher *et al.*, 1985). En effet, il a été montré qu'une forme tronquée de ColM amputée de ses 24 premiers résidus, obtenue par digestion à la protéinase K, est toujours capable de se fixer au niveau du récepteur FhuA, puisqu'elle inhibe l'action cytotoxique du phage T5 et en protège les cellules lors d'un test de compétition. Cette forme n'est cependant plus capable de pénétrer au sein de la cellule cible mais conserve son activité cytotoxique potentielle, car elle peut induire la mort d'une souche d'*E. coli* si elle est envoyée directement dans le périplasma par choc osmotique.

Cette région N-terminale de la ColM contient par ailleurs la séquence *TonB box* spécifique lui permettant de recruter le système d'import TonB (Köck *et al.*, 1987). Le récepteur FhuA contient lui aussi une *TonB box* au niveau de son « *plug* » en N-terminal. Celle-ci est essentielle pour l'étape de translocation de la ColM (Schöffler et Braun, 1989). Des mutations au niveau de cette séquence rendent le récepteur inactif et les cellules insensibles à l'action cytotoxique de la ColM. Cependant, des mutations suppressives (Q160L, Q160K ou R158L) ont été identifiées au niveau de TonB qui rendent de nouveau fonctionnel un récepteur FhuA muté au niveau de sa *TonB box* (I9P) (Schöffler et Braun, 1989). Ces résultats ont donc suggéré une interaction directe entre le récepteur FhuA et la protéine TonB, laquelle a été confirmée par la suite avec la résolution de la structure tridimensionnelle du récepteur FhuA en complexe avec le domaine C-terminal de la protéine TonB (**Figure 45**) (Pawelek *et al.*, 2006).

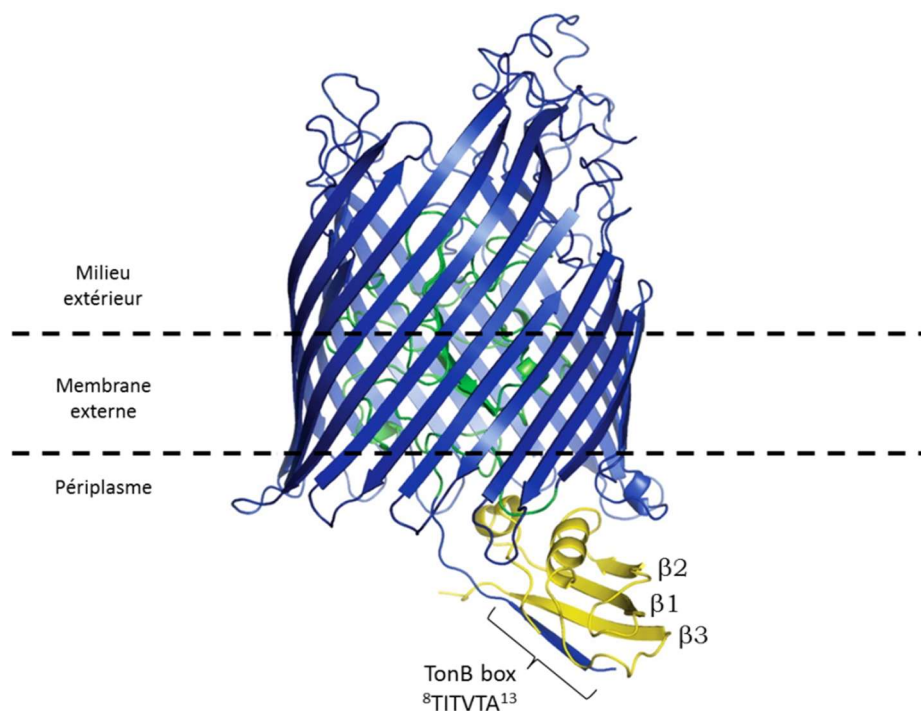


Figure 45 : Structure du complexe formé entre FhuA et TonB. Les protéines FhuA et TonB sont représentées en cartoon. Le domaine C-terminal de TonB (résidus 158 à 235) est coloré en jaune. Le domaine « *plug* » de FhuA (résidus 19 à 160) est coloré en vert. Le reste de la molécule (résidus 8 à 18 et 161 à 725) est coloré en bleu. La *TonB box* de FhuA se structure au contact de TonB en un brin β qui interagit avec le feuillet β de TonB (β1, β2, β3). La séquence de la *TonB box* est indiquée sur la figure. Les traits en pointillés délimitent approximativement la membrane externe (code PDB : 2GRX) (d'après Pawelek *et al.*, 2006).

L'implication de la *TonB box* de la ColM lors de l'étape de translocation a été mise en évidence par une approche similaire (Pisli *et al.*, 1993). Ainsi, des mutants ponctuels de ColM (L4P, L4N, V6E, V6G et V6R) ont été générés au niveau de sa *TonB box*. Ces mutants ne présentent aucune activité cytotoxique vis-à-vis d'*E. coli*. Cependant, ils peuvent retrouver leur activité létale si la souche ciblée exprime la protéine TonB Q160L. Le fait que cette mutation suppressive puisse conférer de nouveau une sensibilité à ces différents mutants de ColM dans la *TonB box* a permis de mettre en évidence une interaction directe entre la ColM et TonB (Pisli *et al.*, 1993). Les interactions TonB-FhuA et TonB-ColM

sont donc essentielles et primordiales puisque si l'une de ces interactions ne peut s'établir, l'import de la ColM est aboli.

L'ensemble de ces données ainsi que la structure tridimensionnelle de la ColM ont permis à Zeth et ses collaborateurs de proposer un modèle concernant la translocation de la ColM à travers la membrane plasmique (Zeth *et al.*, 2008). Dans ce modèle, la ColM se lie dans un premier temps au récepteur FhuA, qui interagit lui-même avec la protéine TonB *via* sa *TonB box*. Cette liaison serait à l'origine d'un changement conformationnel du récepteur, entraînant l'ouverture du pore soit par un changement conformationnel du « *plug* », soit par la sortie de ce même « *plug* » hors du tonneau. Le domaine N-terminal de la ColM pourrait alors traverser le récepteur et interagir à son tour avec le système TonB. L'énergie apportée par ce dernier permettrait alors de « tirer » la ColM à travers le récepteur FhuA. Cependant, ce passage à travers le pore provoquerait probablement la déstructuration de la ColM qui arriverait alors dans le périplasme sous une forme inactive. Pour exercer son action létale, la ColM devrait alors subir un processus de maturation.

1.3.3. Maturation de la colicine M :

Une souche donnée de *E. coli* devient résistante à la ColM si elle est mutée au niveau de l'un des gènes *fhuA*, *tonB*, *exbB* et *exbD*. Néanmoins, toutes ces souches mutantes redeviennent sensibles à la ColM lorsque cette dernière est envoyée directement dans leur périplasme par le biais d'un choc osmotique. Il existe cependant des souches mutantes nommées *tolM* qui restent résistantes à la ColM même dans ces conditions (Braun *et al.*, 1980). Ces mutations *tolM* ont été localisées dans des zones du génome différentes de celles codant pour les protéines nécessaires aux étapes de réception et de translocation, suggérant ainsi l'implication d'une ou plusieurs autres protéines partenaires essentielles pour l'activité de la ColM.

La protéine FkpA a été identifiée comme étant le chaînon manquant dans le mode d'action de la ColM, les mutations *tolM* se situant en effet au sein du gène *fkpA* (Hullmann *et al.*, 2008). Il s'agit d'une protéine périplasmique, constituée de deux domaines, impliquée dans le repliement des protéines de membrane externe (Mogensen et Otzen, 2005) et dont la structure tridimensionnelle a été résolue (**Figure 46**) (Saul *et al.*, 2004). Son domaine N-terminal (résidus 15 à 114) porte l'activité chaperonne et son domaine C-terminal (115-224) l'activité peptidylprolyl *cis-trans* isomérase (PPIase). Ces deux domaines peuvent fonctionner de manière indépendante (Saul *et al.*, 2004) et sont tous les deux essentiels à l'activité de la ColM (Barnéoud-Arnoulet *et al.*, 2010b). La protéine FkpA semble exister uniquement sous une forme dimérique (Ramm et Plückthun, 2000). La dimérisation de la protéine s'opère au niveau du domaine chaperonne de chacun des monomères (**Figure 46**).

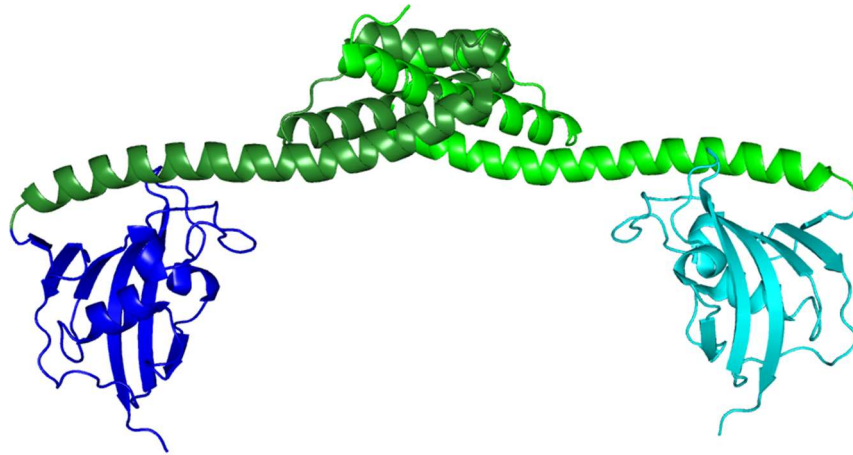


Figure 46 : Structure tridimensionnelle de FkpA sous sa forme dimérique. La structure de chacun des monomères est représentée en cartoon. Les domaines chaperonnes des deux monomères sont représentés respectivement en vert clair et vert foncé. Leurs domaines PPIase sont représentés respectivement en turquoise et en bleu foncé. L'interface de dimérisation est localisée au niveau des domaines chaperonnes (code PDB : 1Q6U).

FkpA est essentielle pour que la ColM puisse exercer son action létale sur une souche d'*E. coli*. Ainsi, une souche délétée pour le gène *fkpA* y devient totalement résistante. Si cette souche est maintenant transformée par un plasmide permettant l'expression de FkpA, alors la sensibilité à la ColM est restaurée (Hullmann *et al.*, 2008). Il est supposé que, lors de son import à travers la membrane externe, la ColM se déplie afin de pouvoir passer à travers le pore du récepteur. La protéine FkpA jouerait alors un rôle important dans la renaturation de la ColM. Une telle implication de FkpA a d'ailleurs été montrée *in vitro* puisque l'incubation de la ColM dénaturée en présence de FkpA purifiée a permis de restaurer l'activité de la ColM (Hullmann *et al.*, 2008). Cet effet n'a pas été retrouvé lorsque la même réaction était réalisée en présence de la molécule FK506, un inhibiteur de l'activité peptidylprolyl *cis-trans* isomérase (Hullmann *et al.*, 2008). Cette activité, portée par le domaine C-terminal de FkpA, apparaît donc essentielle dans le processus de renaturation de la ColM. Pour identifier la liaison sur laquelle FkpA peut exercer cette activité isomérase, l'ensemble des prolines de la ColM ont été mutées individuellement en alanine (Helbig *et al.*, 2011). Cette étude a permis d'identifier la liaison Phe¹⁷⁵-Pro¹⁷⁶ comme étant la cible potentielle de l'activité isomérase de FkpA, la mutation P176A entraînant une forte perte d'activité de la ColM à la fois *in vitro* et *in vivo*. Cette protéine mutante présente tout de même une activité cytotoxique résiduelle, indépendante de la protéine FkpA, si elle est envoyée directement dans le périplasma par un choc osmotique, c'est-à-dire sous une forme correctement repliée. En revanche, cette activité résiduelle reste dépendante de FkpA lorsque que le mutant P176A accède au périplasma de la cellule cible *via* FhuA ou par le biais d'une expression périplasmique, deux types de « transport » supposant un dépliement de la ColM. Dans le dernier cas, le mutant P176A a été fusionné à une séquence signal permettant d'adresser la protéine néo-synthétisée directement dans le périplasma *via* le système Sec (Helbig *et al.*, 2011). La proline 176 étant mutée en alanine et la dépendance à FkpA étant encore présente, ces résultats ont suggéré que l'isomérisation de la liaison Phe¹⁷⁵-Pro¹⁷⁶ n'est pas la seule action exercée par FkpA sur la ColM. Cette hypothèse semble confirmée par le fait que la ColM purifiée, envoyée directement dans le périplasma par un choc osmotique, est toujours dépendante de FkpA (Hullmann *et al.*, 2008; Barreteau *et al.*, 2010).

Quelle que soit la manière dont la ColM atteint le périplasma (FhuA/TonB, choc osmotique ou expression périplasmique), son activité semble toujours dépendante de FkpA (Hullmann *et al.*, 2008;

Barreteau *et al.*, 2010; Barnéoud-Arnoulet *et al.*, 2010). Deux études différentes ont cependant permis de montrer qu'une forme tronquée de ColM, correspondant uniquement au domaine catalytique, peut exercer une activité cytotoxique sur *E. coli* indépendamment de FkpA (Barreteau *et al.*, 2010; Barnéoud-Arnoulet *et al.*, 2010). Cette forme protéique de la ColM ne présente aucune cytotoxicité naturelle vis-à-vis d'*E. coli* étant donné qu'elle ne possède ni le domaine de translocation, ni le domaine de réception. Cependant, lorsqu'elle est envoyée directement dans le périplasme, par le biais d'un choc osmotique (Barreteau *et al.*, 2010) ou d'une expression périplasmique (Barnéoud-Arnoulet *et al.*, 2010), elle est encore capable d'induire la lyse d'*E. coli*. Dans les deux cas, il est apparu que cette lyse est indépendante de la protéine FkpA. Ce domaine catalytique isolé présente par ailleurs une activité de dégradation du lipide II *in vitro* 50 fois supérieure à celle de la protéine entière (Barreteau *et al.*, 2010), ce qui suggère que cette forme tronquée possède une conformation spatiale différente. Le processus de maturation par FkpA serait alors responsable de ce changement de conformation *in vivo*.

1.3.4. Activité de la colicine M :

Une fois le processus de maturation terminée, la ColM est alors opérationnelle pour dégrader son substrat, le lipide II.

L'activité antibactérienne de la ColM a été observée pour la première fois par Braun et ses collaborateurs en 1974 (Braun *et al.*, 1974). Dans cette étude, le traitement d'une culture d'*E. coli* par la ColM s'est caractérisé par une lyse rapide des bactéries en culture. Cette lyse a été corrélée à un relargage de protéines périplasmiques dans le milieu extérieur. Les cellules ainsi traitées présentent à leur surface des protubérances (**Figure 47**). Il a également été montré dans cette étude que le traitement de cellules par la ColM en présence de 16 % de sucrose aboutit à la formation de sphéropastes. Cette observation a permis de suggérer qu'elle agit au niveau du peptidoglycane étant qu'un phénotype similaire est observé pour des cellules traitées par la pénicilline ou le lysozyme.

Schaller et ses collaborateurs ont montré par la suite que la ColM inhibait la voie de biosynthèse du peptidoglycane (Schaller *et al.*, 1982). En utilisant de l'acide diaminopimélique (A₂pm) radiomarqué comme marqueur spécifique de la biosynthèse du peptidoglycane, ils ont montré que des cellules traitées par la ColM n'incorporent plus d'A₂pm dans leur peptidoglycane. L'arrêt de synthèse du peptidoglycane a lieu en amont de la lyse cellulaire et en est à l'origine. Il a par ailleurs été montré que la ColM provoque également un arrêt de synthèse de l'antigène O des LPS dans les bactéries traitées (Harkness et Braun, 1989a). A l'issue de cette étude, il a donc été suggéré que cette colicine puisse interférer avec le recyclage de l'undécaprényl phosphate, étant donné qu'il s'agit de la seule étape en commun entre la voie de biosynthèse du peptidoglycane et celle de l'antigène O des LPS (Harkness et Braun, 1989a, 1989b).

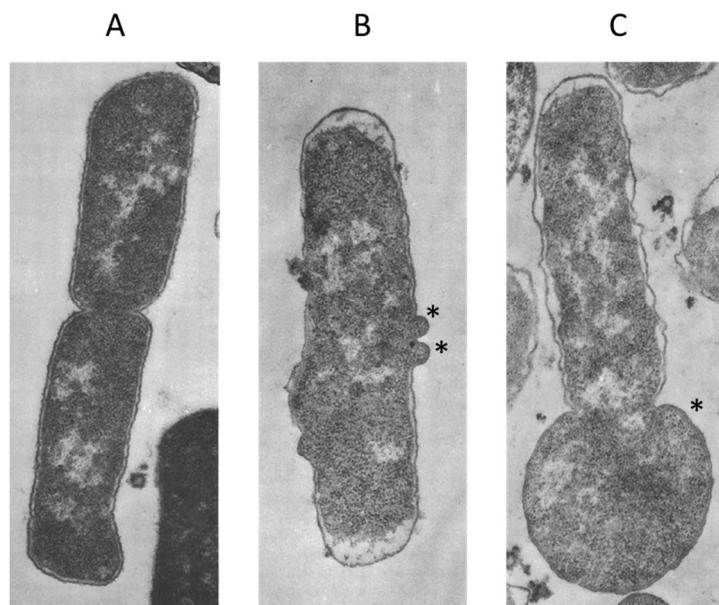


Figure 47 : Morphologie cellulaire d'une souche d'*E. coli* K-12 ROW/V/22.1 traitée par la colicine M. A : Aspect des cellules non traitées. B : Aspect des cellules après 30 min de traitement. La formation de protubérances (*) est observée à la surface cellulaire C : Aspect des cellules après 50 min de traitement. La formation d'une grosse protubérance (*) est observée à un pôle de la cellule. Ces images ont été réalisées au microscope électronique (d'après Braun *et al.*, 1974).

La cible précise de la ColM a par la suite été identifiée au laboratoire en 2006 (El Ghachi *et al.*, 2006). Dans cette étude, son effet inhibiteur a été testé sur toutes les étapes du cycle de l'undécaprényl phosphate susceptibles d'être affectées. Il a ainsi été montré que la ColM n'interfère pas, *in vitro*, avec le processus de recyclage du C₅₅-PP par la phosphatase BacA. Il est ensuite apparu clairement qu'elle est capable de dégrader *in vitro* à la fois le lipide I et le lipide II en deux produits qui ne peuvent être réutilisés directement par la cellule. Ces produits de dégradation ont été identifiés par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) et spectrométrie de masse comme étant de l'undécaprénol (C₅₅-OH) et du 1-PP-MurNAc-pentapeptide ou du 1-PP-MurNAc(-pentapeptide)-GlcNAc (**Figure 48**). Cette activité de dégradation des intermédiaires lipidiques est dépendante de la présence du cation divalent Mg²⁺. Un suivi d'incorporation de l'A₂p^m radiomarqué au sein de cellules traitées par la ColM a également été effectué afin de constater les effets de cette colicine *in vivo* sur la biosynthèse du peptidoglycane. Comme montré précédemment par Schaller et ses collaborateurs, un arrêt de cette synthèse est observé très rapidement suite au traitement des cellules par la ColM. Cet arrêt a été corrélé à une accumulation d'UDP-MurNAc-pentapeptide ainsi qu'à une diminution de la quantité de lipide I et de lipide II dans la cellule. Une accumulation des produits de dégradation des lipides I et II (C₅₅-OH, 1-PP-MurNAc-pentapeptide et 1-PP-MurNAc(-pentapeptide)-GlcNAc) a également été constatée. Dans ces conditions, la présence de 1-PP-MurNAc(-pentapeptide)-GlcNAc est cependant minoritaire (El Ghachi *et al.*, 2006). Sachant que les lipides I et II sont synthétisés sur la face cytoplasmique de la membrane interne et que lipide II est également accessible du côté périplasmique suite à sa translocation, la localisation du lieu d'action de la ColM a donc posé question. De nombreuses preuves ont permis de conclure que la ColM avait pour cible le lipide II situé sur la face périplasmique de la membrane interne : (i). la ColM doit provenir du milieu extérieur pour être active (Harkness et Braun, 1990) : en effet, nous avons observé au laboratoire que la surproduction de ColM à l'intérieur d'une cellule n'est pas létale pour cette dernière ; (ii). la protéine d'immunité de la ColM (Cmi) possède une ancre transmembranaire et un domaine périplasmique (Gérard *et al.*, 2011) ; (iii). la production périplasmique de la ColM est létale pour la cellule productrice sauf si cette dernière co-

exprime la Cmi (Barnéoud-Arnoulet *et al.*, 2010). En conséquence, l'accumulation du 1-PP-MurNac(-pentapeptide) observée dans les cellules traitées résulterait alors plutôt de la dégradation du 1-PP-MurNac(-pentapeptide)-GlcNac par la glucosaminidase NagZ, enzyme impliquée dans le recyclage du peptidoglycane (El Ghachi *et al.*, 2006). La ColM a donc pour cible naturelle le lipide II « périplasmique » qu'elle dégrade, par son activité *phosphodiesterase-like*, en C₅₅-OH et 1-PP-MurNac(-pentapeptide)-GlcNac.

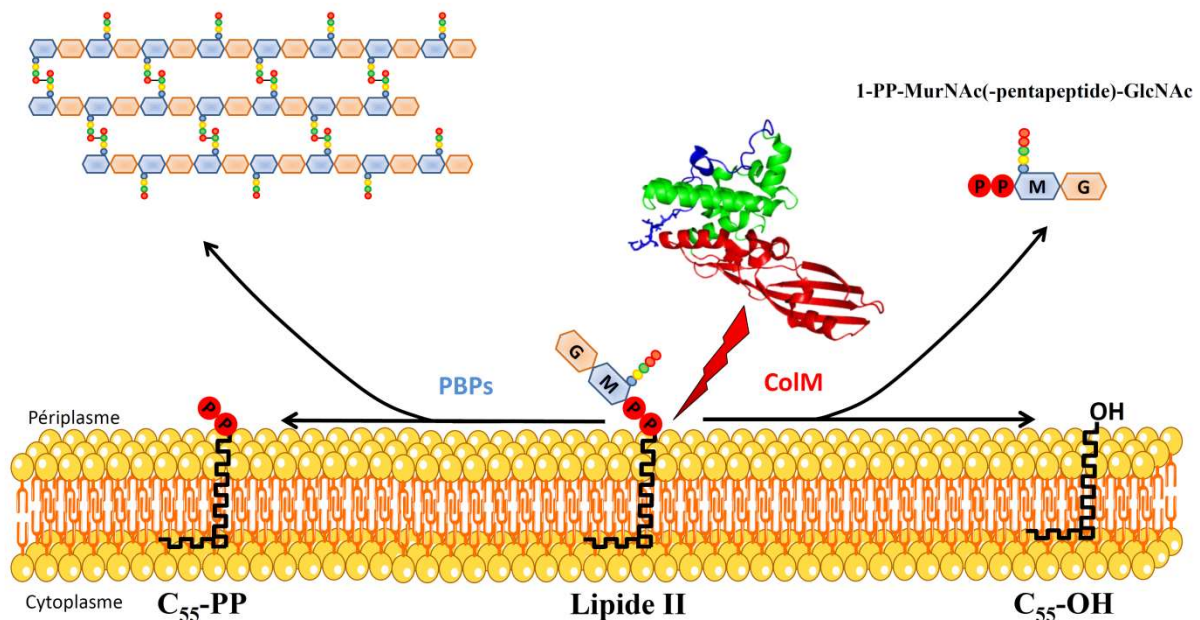


Figure 48 : Mode d'action de la colicine M. La ColM clive le lipide II au niveau de la liaison phosphodiester (éclair rouge). La coupure du lipide II aboutit à la formation de deux produits : l'undécaprénol et le 1-PP-MurNac(-pentapeptide)-GlcNac. La ColM est représentée en cartoon (code PDB : 2XMX). Le mode d'action des PBPs est également représenté sur la partie gauche de la figure.

Une étude de mutagenèse dirigée réalisée au laboratoire a permis de déterminer les résidus essentiels de la ColM impliqués dans ce mécanisme de coupure du lipide II (Barreteau *et al.*, 2010). La mutation des résidus D226, Y228, D229, H235 et R236 en alanine conduit à une chute drastique de l'activité enzymatique *in vitro*, qui apparaît dans tous les cas inférieure à 2 % de l'activité enzymatique de la protéine sauvage (**Tableau 2**). Ces mutants ponctuels ne présentent également aucune activité cytotoxique.

Les résidus ²²⁶DKYDFNASTHR²³⁶ sont globalement conservés parmi les protéines homologues de la ColM identifiées chez des espèces de *Pseudomonas*, *Pectobacterium* et *Burkholderia* (cf § V.2) (Barreteau *et al.*, 2009b; Grinter *et al.*, 2012a; Ghequire et De Mot, 2015; Ghequire *et al.*, 2017a). Ces résidus sont exposés à la surface de la ColM (**Figure 49**). L'aspartate D226 semble jouer un rôle prépondérant dans l'activité puisque les mutations D226A, D226E ou D226N conduisent à une perte totale d'activité (Barreteau *et al.*, 2010; Helbig et Braun, 2011). Ces résultats suggèrent donc que le groupement carboxyle de la chaîne latérale de ce résidu requiert un positionnement extrêmement fin pour que le clivage du lipide II puisse avoir lieu, ce qui ne semble pas être le cas pour le résidu D229 qui est également conservé. Bien que les résidus essentiels à la catalyse de ColM aient été identifiés, son mécanisme catalytique exact est encore inconnu.

Tableau 2 : Activité *in vitro* et *in vivo* de différents mutants de la colicine M. La cytotoxicité a été testée par dépôt d'une certaine quantité de protéine (en ng) sur un tapis cellulaire d'une souche d'*E. coli* BW25113. ND : activité non détectée (jusqu'à 10 µg de protéine purifiée utilisée dans le test) (d'après Barreteau *et al.*, 2010)

Protéine	Activité enzymatique ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Cytotoxicité (ng)
ColM	630 ± 57 (100 %)	0,4
ColM D226A	12 ± 5 (1,9 %)	ND
ColM Y228A	9 ± 4 (1,4 %)	ND
ColM D229A	2 ± 0,9 (0,3 %)	ND
ColM H235A	ND	ND
ColM R236A	ND	ND

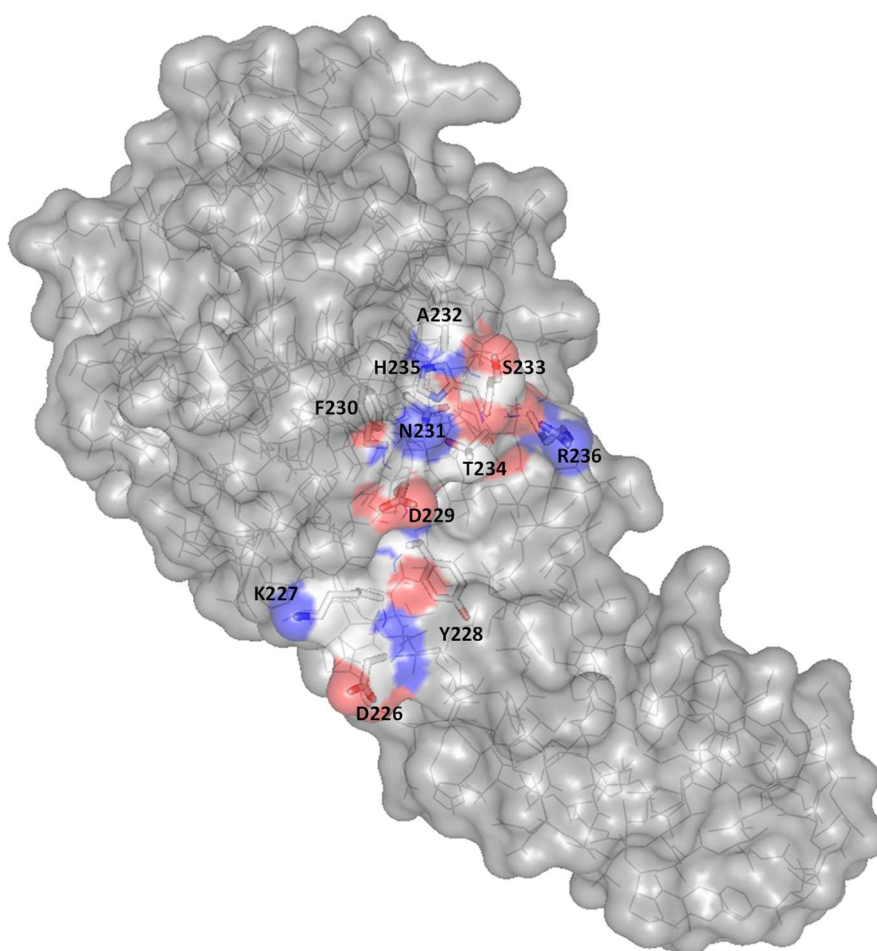


Figure 49 : Localisation des résidus du site actif à la surface de la ColM. Représentation en surface de van der Waals. Les chaînes latérales des résidus ²²⁶DKYDFNASTHR²³⁶ localisés à la surface de la ColM sont représentées sous la forme de bâtons. Pour ces résidus, un code couleur a été attribué aux atomes : carbone en blanc, azote en bleu et oxygène en rouge. Les résidus sont identifiés par leur position dans la structure primaire ainsi que par le code à une lettre correspondant.

Comme mentionné précédemment (cf § I.4), la structure du peptidoglycane est variable au sein du monde bactérien et cette variabilité se retrouve au niveau du lipide II, plus particulièrement

au niveau de la partie peptidique (Vollmer et al., 2008a). Bien que la ColM possède un spectre d'activité restreint uniquement à des souches d'*E. coli* ou d'espèces apparentées (Barreteau *et al.*, 2010; Harkness et Braun, 1989a), elle présente en revanche la capacité d'hydrolyser *in vitro* des lipides II caractéristiques d'espèces bactériennes à Gram positif telles que *E. faecalis*, *E. faecium* et *S. aureus* avec la même efficacité que pour le lipide II à A₂pm de *E. coli* (**Tableau 3**) (Patin *et al.*, 2012). Ces lipides contiennent en position 3 une L-Lys en lieu et place de l'A₂pm retrouvé habituellement chez les bactéries à Gram négatif. Par ailleurs, ces lipides II sont également ramifiés au niveau de la L-Lys par des peptides de différentes natures : L-Ala ou L-Ala-L-Ala (*E. faecalis*), D-iso-Asn (*E. faecium*), Gly₁ à Gly₅ (*S. aureus*).

Tableau 3 : Activité de la ColM vis-à-vis des lipides II ramifiés. ¹ L'activité relative de la ColM a été calculée à partir de celle mesurée pour le lipide II à *meso*-A₂pm, cible naturelle de la ColM, et exprimée comme activité de référence (100 %). ² Correspond à 0,3 nmol.min⁻¹.mg⁻¹. La nature peptidique de la ramification est indiquée en gras. L'espèce bactérienne correspondant à chaque lipide II est indiquée entre parenthèses (d'après Patin *et al.*, 2012).

Composition du la partie peptidique du lipide II	Activité résiduelle (%) ¹
L-Ala-γ-D-Glu- <i>meso</i> -A ₂ pm-D-Ala-D-Ala (Gram négatif)	100 ²
L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala (Gram positif)	90 ± 6
L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-(L-Ala)-D-Ala-D-Ala (<i>E. faecalis</i>)	87 ± 11
L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-(L-Ala) ₂ -D-Ala-D-Ala (<i>E. faecalis</i>)	77 ± 5
L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-(D-iAsn)-D-Ala-D-Ala (<i>E. faecium</i>)	94 ± 8
L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-(Gly)-D-Ala-D-Ala (<i>S. aureus</i>)	79 ± 8
L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-(Gly) ₃ -D-Ala-D-Ala (<i>S. aureus</i>)	89 ± 8
L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-(Gly) ₅ -D-Ala-D-Ala (<i>S. aureus</i>)	81 ± 11

La ColM est la seule colicine connue à ce jour pour interférer avec la voie de biosynthèse du peptidoglycane, cependant il ne s'agit pas de la seule bactériocine capable d'interagir avec ce polymère. Pour rappel, le lipide II est ciblé par les lantibiotiques tel que la nisine, les défensines, les ramoplanines ou encore les glycopeptides (**cf § II.2.2.4**). Par ailleurs, comme mentionné précédemment, la pesticine produite par *Y. pestis* possède une activité muramidase qui lui permet de dégrader la molécule de peptidoglycane mature (Hall et Brubaker, 1978; Ferber et Brubaker, 1979; Vollmer *et al.*, 1997).

1.3.5. Immunité vis-à-vis de la colicine M :

La protéine d'immunité de la ColM, Cmi (également appelée ImM), est localisée dans le périplasme (Olschläger et Braun, 1987; Gross et Braun, 1996). Elle est composée de 117 acides aminés dont les 23 premiers constituent une ancre transmembranaire permettant la fixation de la protéine au niveau de la membrane interne (Olschläger *et al.*, 1991). La présence de cette ancre n'est pas obligatoire pour conférer l'immunité (Gross et Braun, 1996; Gérard *et al.*, 2011). Il a en effet été montré que la présence du domaine soluble de la Cmi dans le périplasme est suffisante pour protéger

la cellule contre l'action de la ColM, même si l'effet protecteur est alors moindre que lorsque la Cmi est ancrée à la membrane.

La protéine Cmi existe à la fois sous forme monomérique et dimérique *in vivo* (Usón *et al.*, 2012), et la structure du domaine soluble de Cmi, sous sa forme monomérique, a été résolue pour la première fois au laboratoire (Gérard *et al.*, 2011). Elle est composée de 4 hélices α et 4 brins β formant un feuillet β qui s'enroule autour d'une longue hélice α centrale. Cette structure est stabilisée par la présence d'un pont disulfure entre les deux seules cystéines présentes dans la séquence, les Cys³¹ et Cys¹⁰⁷ (**Figure 50, A**). Par la suite, une structure de Cmi sous forme dimérique a également été publiée (Usón *et al.*, 2012). Cette structure se caractérise par un échange de domaines entre les deux monomères et par la formation de deux ponts disulfures intermoléculaires. La surface de dimérisation est composée par la longue hélice α centrale provenant d'un monomère et le feuillet β provenant de l'autre monomère. Les ponts disulfures intermoléculaires sont quant à eux formés entre la Cys³¹ du premier monomère et la Cys¹⁰⁷ du second monomère (**Figure 50, B**). La formation de ce pont disulfure est par ailleurs essentielle à l'activité de la Cmi, la mutation individuelle ou simultanée de ces deux cystéines en alanine conduisant à une perte totale d'activité de la protéine d'immunité (Gérard *et al.*, 2011). Il a également été montré que la formation de ce pont disulfure est dépendante de la présence de la protéine DsbA, une oxydase localisée dans le périplasma. Cmi présente également une forte similarité de séquence avec la famille protéique YebF, de fonction inconnue, notamment au niveau des résidus cystéines impliqués dans la formation du pont disulfure (Gérard *et al.*, 2011).

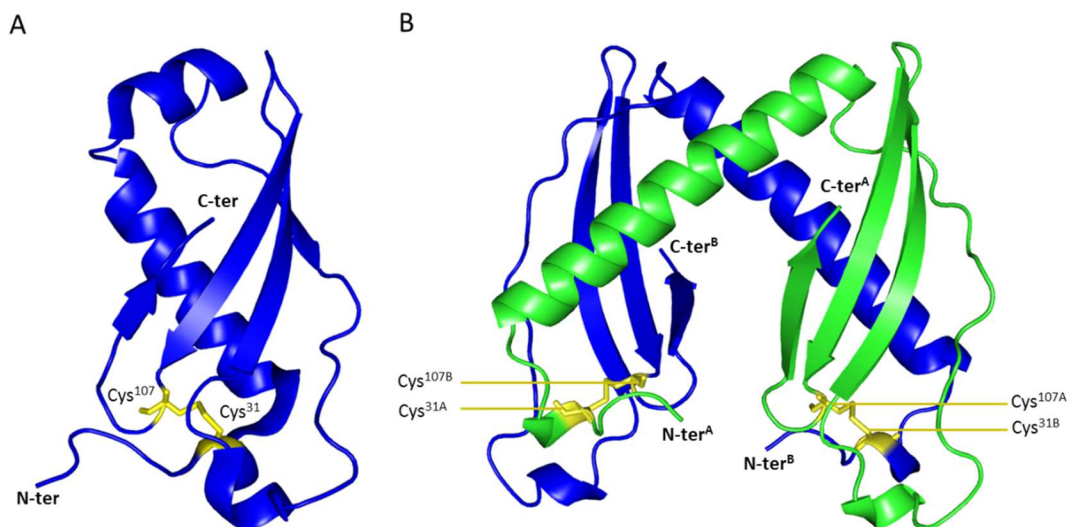


Figure 50 : Structure tridimensionnelle de la Cmi. A : Structure de Cmi sous sa forme monomérique (code PDB : 2XGL). Les extrémités N-terminale (N-ter) et C-terminale (C-ter) sont indiquées. Les résidus cystéines 31 et 107 (Cys³¹ et Cys¹⁰⁷), responsables de la formation du pont disulfure, sont colorés en jaune et représentés en bâtons. B : Structure de Cmi sous sa forme dimérique (code PDB 4AEQ). Chaque monomère est coloré différemment (vert pour le monomère A et bleu pour le monomère B). Les extrémités N-terminales (N-ter^A et N-ter^B) et C-terminales (C-ter^A et C-ter^B) des deux monomères sont indiquées. Les résidus impliqués dans la formation des ponts disulfures intermoléculaires sont identifiés. Les résidus Cys^{31A} et Cys^{107B}, appartenant respectivement aux monomères A et B, forment le premier pont disulfure. Les résidus Cys^{31B} et Cys^{107A} forment le second. Les structures de Cmi sous formes monomérique et dimérique sont représentées en cartoon.

Des études biochimiques ont également permis d'identifier, en plus des deux résidus cystéines, d'autres acides aminés essentiels à l'activité de la Cmi. Ainsi, les mutations E113A et Y114A, localisées dans la partie C-terminale de la protéine, sont responsables de l'inactivation de la Cmi (Gérard *et al.*, 2011). Il a également été montré que la mutation simultanée en alanine des résidus E81, D82 et E83, tous chargés négativement, est responsable d'une perte d'activité de la Cmi, qui n'est alors plus capable de protéger la cellule contre la ColM (Usón *et al.*, 2012). La structure de la ColM a permis d'identifier en surface une zone chargée positivement (Zeth *et al.*, 2008) : il a donc été suggéré que ces protéines puissent interagir par le biais d'interactions électrostatiques. Cependant, aucune interaction forte entre ces deux protéines n'a pu être identifiée à ce jour et le mécanisme d'action de la protéine d'immunité est encore inconnu. Certaines données suggèrent pourtant une interaction directe entre ColM et Cmi. En effet, la ColM est capable de protéger la Cmi d'une dégradation par la trypsine. De plus, dans une souche où les systèmes d'import de ColM sont surexprimés, la protection par la Cmi diminue à moins qu'elle ne soit également surexprimée, suggérant ainsi un titrage de la ColM par la Cmi (Olschläger *et al.*, 1991).

L'immunité conférée par la Cmi est retrouvée spécifiquement au sein des cellules productrices de ColM. Cependant, un autre type d'immunité, assurée par la protéine CbrA, a été identifié chez des cellules non productrices de cette colicine (Helbig *et al.*, 2012). CbrA est une oxydoréductase à flavine dont le co-facteur FAD n'est pas lié de façon covalente à la protéine. Elle présente une forte homologie de séquence avec les géranyl-géranyl réductases (Helbig *et al.*, 2012). La surexpression de CbrA rend les cellules d'*E. coli* résistantes à la ColM, mais sa fonction exacte n'est pour l'heure pas élucidée. Il a également été mis en évidence que sa surexpression rend les cellules résistantes aux chocs osmotiques, suggérant ainsi une implication dans la modification de la composition de la membrane externe (Helbig *et al.*, 2012). D'autre part, le traitement d'une culture d'*E. coli* par des doses sub-inhibitrices de ColM entraîne une induction de la transcription du gène *cbrA* (Kamenšek et Žgur-Bertok, 2013). La production de CbrA par une souche sensible, en réponse à une exposition à la ColM, confirme son rôle dans un mécanisme d'immunité spécifique vis-à-vis de cette colicine.

2. Les homologues de la colicine M :

Plusieurs homologues de la ColM produits par des espèces de *Pseudomonas spp.*, *Pectobacterium carotovorum* ou *Burkholderia spp.* ont été identifiés sur la base de leur forte similarité de séquence avec le domaine C-terminal de cette colicine (**Figure 51**) (Barreteau *et al.*, 2009b, 2012a, 2012b; Ghequire et De Mot, 2015; Ghequire *et al.*, 2017a; Grinter *et al.*, 2012a, 2012b, 2013, 2014).



Figure 51 : Alignement de séquence de la ColM avec ses homologues. Les résidus strictement conservés sont surlignés en rouge, et les résidus conservés en jaune. La forte homologie de séquence identifiée sur la partie C-terminale est encadrée en rouge. Les résidus essentiels à l'activité de la ColM sont indiqués en rouge sous l'alignement. Les structures secondaires de la ColM sont représentées au-dessus de l'alignement.

2.1. Les homologues issus de *Pseudomonas spp.* :

Différents homologues issus du genre *Pseudomonas* ont été identifiés et caractérisés au sein de notre équipe (Barreteau *et al.*, 2009b, 2012a). Ainsi les protéines PaeM, PflM et PsyM ont été identifiées respectivement chez *P. aeruginosa* JJ692, *P. fluorescens* Q8r1-96 et *P. syringae* pv. tomato DC3000 (Barreteau *et al.*, 2009b). Les gènes codant pour ces protéines ont été clonés et les protéines correspondantes surproduites et purifiées afin de les caractériser. Les protéines PaeM, PflM et PsyM présentent toutes les trois la même activité de dégradation *in vitro* du lipide II, aboutissant à la formation d'undécaprénol et de 1-PP-MurNac(-pentapeptide)-GlcNac. Comme pour la ColM, l'activité catalytique de ces différentes protéines a été montré être dépendante de la présence de Mg²⁺. Leur activité spécifique a été déterminée et comparée à celle de la ColM (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Activités spécifiques de la ColM et de ses homologues PaeM, PflM et PsyM issus respectivement de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *P. syringae* (d'après Barreteau *et al.*, 2009b, 2012).

Protéine	Activité spécifique (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)
ColM	0,4
PaeM	13
PflM	0,017
PsyM	1,07

La PaeM présente l'activité spécifique la plus élevée *in vitro*, avec une activité 30 fois supérieure à celle de la ColM. Les deux autres homologues, PflM et PsyM, présentent une activité plus faible, du même ordre de grandeur que celle de la ColM.

Le spectre d'activité *in vivo* de ces protéines a également été testé, à la fois sur des souches d'*E. coli* et sur un certain nombre de souches de *Pseudomonas* (Barreteau *et al.*, 2009b). Les protéines PaeM, PflM et PsyM ne présentent aucune cytotoxicité vis-à-vis d'*E. coli*, et leur spectre d'action sur les 42 souches de *Pseudomonas* testées s'est révélé très restreint puisque seules deux souches se sont révélées sensibles. Ainsi, la souche NCK007, correspondant à un isolat clinique de *P. aeruginosa*, est uniquement sensible à la PaeM, tandis que la souche DET08 de *P. aeruginosa* est sensible à la fois à PaeM et PflM (Barreteau *et al.*, 2009b). D'autres études ont permis d'identifier des souches sensibles aux différents homologues PaeM, PflM et PsyM. La souche LMG5456 de *P. syringae* pv. *lachrymans* est ainsi sensible à la PsyM (Grinter *et al.*, 2012b) et les souches CPHL12447 de *P. aeruginosa* et F113 de *P. fluorescens* respectivement à PaeM et PflM (Ghequire *et al.*, 2017b). Il est à noter que l'effet produit par la PaeM sur la souche sensible DET08 de *P. aeruginosa* en culture liquide est de type bactériostatique (Barreteau *et al.*, 2009b), alors qu'un effet bactériolytique est observé lorsque la ColM est ajoutée à une culture d'*E. coli* sensible.

Certains homologues de ColM ont fait l'objet d'une caractérisation structurale et fonctionnelle. La structure de la PsyM a été résolue en 2012 (Grinter *et al.*, 2012b), ce qui a permis d'effectuer la délimitation des différents domaines de la protéine (**Figure 52, A**). Le domaine de translocation est composé des résidus 1 à 39 et est intrinsèquement désordonné, comme le domaine N-terminal de la ColM. L'implication de ce domaine dans l'étape de translocation de la PsyM a été confirmée puisque des formes tronquées en N-terminal de 10 (PsyM Δ 1-10) ou 20 (PsyM Δ 1-20) résidus ne présentent plus d'activité vis-à-vis d'une souche sensible de *P. syringae*. Par ailleurs, les formes PsyM Δ 1-10 et

PsyM Δ 1-20 inhibent l'activité de la protéine sauvage lors d'un test de compétition, démontrant ainsi que ces deux formes protéiques sont toujours capables de se lier à leur récepteur. Cette liaison se fait par l'intermédiaire des résidus 40 à 127 constituant le domaine central de réception. Enfin, le domaine d'activité est délimité par les résidus 128 à 276 et présente une forte homologie structurale avec le domaine C-terminal de la ColM. En effet, la superposition des deux domaines catalytiques présente un RMSD (Root Mean Square Deviation) de 2,6 Å (**Figure 52, B**).

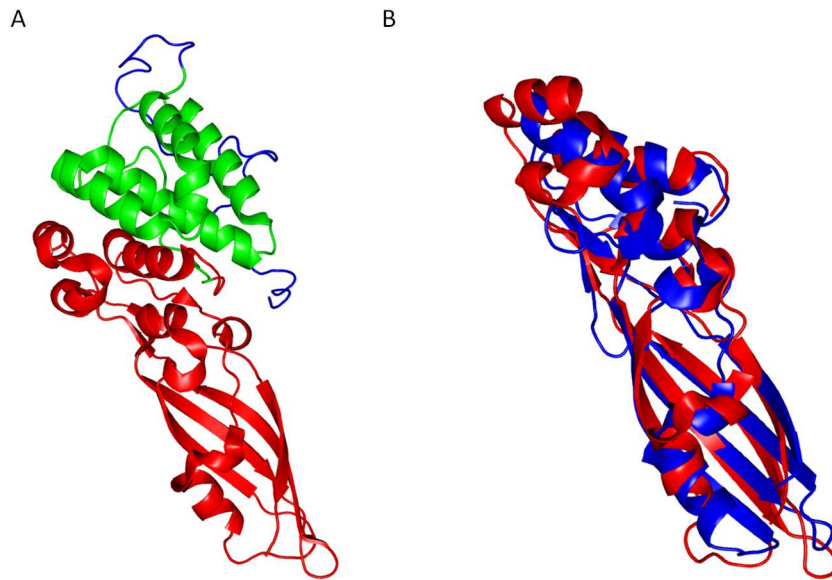


Figure 52 : Structure tridimensionnelle de la PsyM. A : Les différents domaines de PsyM sont colorés différemment sur la structure. Le domaine de translocation (résidus 1 à 39) est coloré en bleu, le domaine central de réception (résidus 40 à 127) en vert et le domaine catalytique (résidus 128 à 276) en rouge. B : Superposition du domaine catalytique de PsyM, (en rouge) avec celui de ColM (en bleu). La superposition, effectuée uniquement sur les C α , donne un RMSD de 2,6 Å. Les structures sont représentées en cartoon.

Cette forte similarité structurale est reliée à la forte similarité de séquence observée entre les domaines respectifs de ColM et PsyM. Une similarité structurale a également été observée au niveau des domaines de réception respectifs de ColM et PsyM, bien qu'aucune similarité de séquence n'ait été détectée. La différence majeure au niveau structural entre ces deux domaines de réception concerne l'hélice α 1, qui présente une structure plus compacte au sein de la PsyM que celle retrouvée chez la ColM. Par conséquent, l'alignement structural des deux protéines sur l'ensemble des domaines de réception et d'activité conduit à des variations structurales modérées puisque le RMSD est de 3,3 Å (Grinter *et al.*, 2012b). De plus, la résolution de la structure a permis de confirmer l'implication essentielle d'un cation divalent lors du processus catalytique. En effet, un ion Ca²⁺ coordonné par l'aspartate 232 a été identifié au sein du site actif de la protéine. La PsyM montre par ailleurs la même activité catalytique *in vitro* en présence de Ca²⁺, Mg²⁺ ou Mn²⁺. En revanche, la présence d'EDTA conduit à une perte totale d'activité (Grinter *et al.*, 2012b). La mutation D232A est également responsable d'une perte d'activité et la résolution de la structure de ce mutant a révélé la perte de l'ion Ca²⁺ au sein du site actif. Ces données ont donc permis de souligner l'importance de la présence du résidu D232 (correspondant au résidu D226 de ColM) dans la coordination d'un cation divalent potentiellement impliqué dans la fixation du pyrophosphate du lipide II (Grinter *et al.*, 2012b). Le fait que les deux protéines PsyM et ColM possèdent une forte similarité structurale à la fois au niveau de leur domaine d'activité et de leur domaine de réception suggère qu'elles sont issues d'un même

ancêtre commun à partir duquel elles auraient évolué de manière divergente, notamment pour cibler des récepteurs de membrane externe spécifiques (Grinter *et al.*, 2012b).

La protéine PaeM a également fait l'objet d'une étude structurale et fonctionnelle au sein de notre laboratoire (Barreteau *et al.*, 2012b). La résolution de sa structure a permis la délimitation des différents domaines fonctionnels (**Figure 53, A**). Ainsi, le domaine N-terminal de translocation est composé des résidus 1 à 32. Le domaine central, constitué de 4 hélices α , contient les résidus 33 à 136. La superposition de ce domaine sur 61 C α avec celui de la ColM montre un RMSD de 2,3 Å, bien que ces domaines ne présentent que 11 % d'identité de séquence. Leur différence majeure se situe dans l'orientation relative des hélices α 1 et α 2. En effet, ces deux hélices sont orientées de façon antiparallèle pour PaeM alors qu'elles forment un angle de 90° au sein de la structure de la ColM. La structure du domaine catalytique de la PaeM, constitué des résidus 137 à 289, est extrêmement similaire à celle du domaine C-terminal de la ColM (**Figure 53, B**). Il présente une déviation moyenne de 2,9 Å sur l'alignement de 138 C α . Comme pour la PsyM, cette similarité structurale est liée à la similarité de séquence entre les domaines catalytiques des ColM et PaeM.

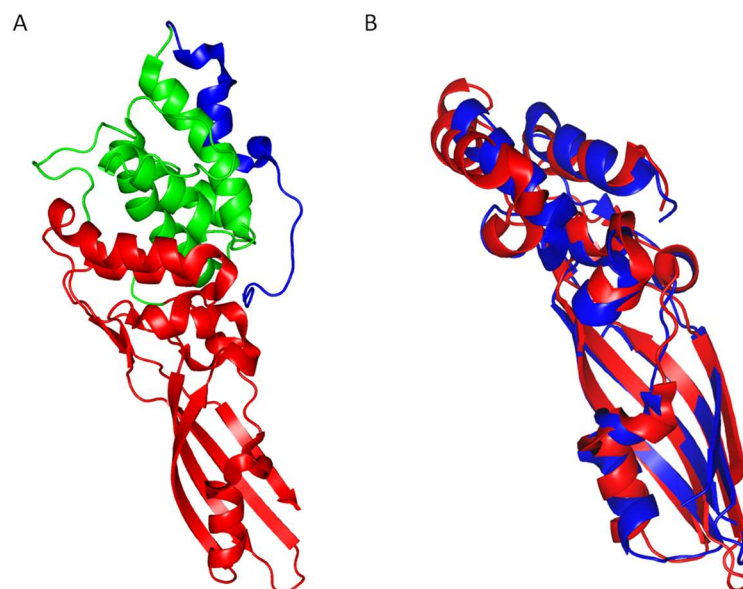


Figure 53 : Structure tridimensionnelle de la PaeM. A : Les différents domaines de la PaeM sont colorés différemment sur la structure. Le domaine de translocation (résidus 1 à 32) en bleu, le domaine central de réception (résidus 33 à 136) en vert et le domaine catalytique (résidus 137 à 289) en rouge. B : Superposition du domaine catalytique de la PaeM (en rouge) avec celui de la ColM (en bleu). La superposition, réalisée uniquement sur les C α , donne un RMSD de 2,9 Å. Les structures sont représentées en cartoon.

Malgré cette forte similarité, des différences structurales importantes existent entre ces deux protéines, notamment au niveau de leurs sites catalytiques respectifs, qui présentent des conformations très différentes (**Figure 54**). Ainsi, chez la PaeM, la chaîne latérale du résidu D241, qui coordonne un ion Mg²⁺, pointe vers l'intérieur du site actif, alors que la chaîne latérale du résidu D226 de la ColM pointe vers l'extérieur de la protéine. Ces deux chaînes latérales sont donc orientées dans des directions diamétralement opposées. La chaîne latérale du résidu D241 est au contraire superposée à celle du résidu Y228 de la ColM. Ces différences structurales dans l'orientation des chaînes latérales des résidus conservés (D241, Y243, D244, H250 et R251) constituent probablement l'un des facteurs majeurs permettant d'expliquer la différence d'activité *in vitro* entre la ColM et la PaeM. Ainsi, la conformation du site actif de la PaeM constituerait une forme proche de la

conformation du site actif retrouvée *in vivo*. Cependant, les chaînes latérales de certains résidus conservés ne sont pas orientées vers le cœur du site actif, ce qui suggère que la conformation observée n'est pas encore la conformation finale du site actif *in vivo*. Ce dernier doit probablement encore subir des réarrangements conformationnels suite à sa liaison au substrat. De plus, les domaines catalytiques isolés des protéines PaeM et ColM présentent une activité de dégradation du lipide II *in vitro* beaucoup plus élevée que les formes protéiques entières (Barreteau *et al.*, 2010; Barreteau *et al.*, 2012b). Cela suggère que la présence du domaine de réception, qui est en interaction avec le domaine catalytique, maintient la protéine dans une forme partiellement inactive.

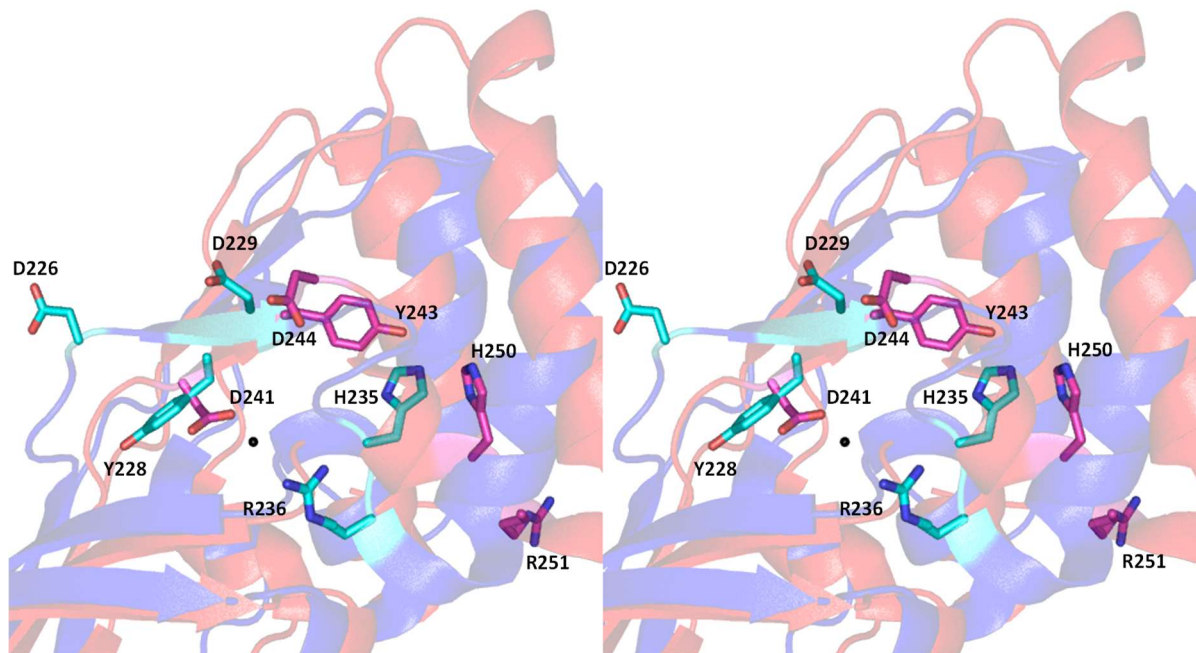


Figure 54 : Comparaison de l'orientation des chaînes latérales des résidus essentiels à l'activité de ColM et PaeM. Les domaines catalytiques de ColM (en bleu) et PaeM (en rouge) sont représentés en cartoon. Les résidus essentiels à l'activité de ColM et PaeM sont identifiés par le code à une lettre des acides aminés. Les chaînes latérales de ces résidus sont représentées en bâton. Un code couleur est attribué aux atomes rentrant dans la composition des chaînes latérales : C : turquoise pour ColM et mauve pour PaeM ; N : bleu foncé ; O : rouge. L'ion Mg^{2+} coordonné par la chaîne latérale du résidu D241 est représenté sous la forme d'une sphère noire. Représentation en vue stéréo.

Il a également été montré au laboratoire que la PaeM était capable d'exercer une activité cytotoxique vis-à-vis d'*E. coli* lorsqu'elle était envoyée directement dans le périplasme par un choc osmotique (Barreteau *et al.*, 2012b). Ce résultat confirme que les protéines de la famille ColM sont potentiellement capables d'agir sur d'autres espèces bactériennes que celles naturellement sensibles dès lors qu'elles ont la possibilité d'accéder à leur cible (le lipide II). De plus, la PaeM est également capable de cliver *in vitro* des lipides II de différentes structures retrouvés chez diverses espèces à Gram positif (Barreteau *et al.*, 2012b), comme cela a été montré pour la ColM (Patin *et al.*, 2012). Ces résultats ouvrent la voie à l'utilisation de cette famille de bactériocines ciblant le lipide II comme agents antimicrobiens à spectre large.

Lors de l'identification des homologues de ColM produits par certaines espèces de *Pseudomonas*, aucune protéine d'immunité associée n'avait clairement été identifiée (Barreteau *et al.*, 2009b). Cependant, une étude récente basée sur une analyse *in silico* de différents génomes de souches de *Pseudomonas* productrices de bactériocines homologues à ColM a permis d'identifier des gènes codant pour deux types de protéines d'immunité différentes (Ghequire *et al.*, 2017b). Ces gènes

sont localisés en aval du gène codant pour la bactériocine. Le premier type de protéine d'immunité, moins répandu que le second, a été isolé suite à l'analyse de 14 souches de *Pseudomonas*, principalement des souches de *P. syringae*. Le gène identifié code pour une protéine d'environ 100 résidus qui a été nommée PmiB (*Pseudomonas colicin-M* like *immunity type B*). Deux cystéines conservées sont retrouvées au sein des différentes séquences de PmiB. Ces deux cystéines ne sont pas sans rappeler celles retrouvées dans la structure de la Cmi, bien que cette dernière ne semble pas présenter d'homologie de séquence avec les PmiB. Ces protéines possèdent en N-terminal une séquence signal putative de lipoprotéine clivable (**Figure 55**), qui conduit probablement à la libération de la protéine dans le périplasma suite à sa translocation à travers la membrane interne. Le second type de gène d'immunité identifié code pour la production d'une protéine d'environ 137 résidus en moyenne, nommée PmiA (*Pseudomonas colicin-M* like *immunity type A*). Ces protéines sont constituées de 4 segments transmembranaires (**Figure 55**). Le premier segment est prédit comme étant une séquence signal clivable soit de type Tat, soit de type Sec. Les gènes correspondant aux protéines d'immunité associées à Paem, PflM et PsyM ont été clonés, et les protéines correspondantes ont été exprimées au sein de souches initialement sensibles à ces bactériocines. Les souches ainsi transformées ne présentent plus aucune sensibilité vis-à-vis de ces protéines, confirmant ainsi que les gènes identifiés codent bien pour des protéines d'immunité dédiées (Ghequire *et al.*, 2017b). En fonction des espèces de *Pseudomonas*, les séquences correspondant aux protéines PmiA sont plus ou moins conservées. Afin de tester l'influence de ces séquences conservées, des protéines phylogénétiquement proches de la protéine d'immunité PmiA_{PflMQ8r1-96} ont été exprimées au sein d'une souche sensible à la PflM. Ces protéines d'immunité provenant d'autres souches présentent 36 à 40 % d'identité de séquence avec PmiA_{PflMQ8r1-96}. Les homologues de la PflM provenant des souches correspondantes présentent quant à eux 68 % d'identité de séquence avec la PflM_{Q8r1-96} testée. De la même manière, la capacité de protection de protéines d'immunité phylogénétiquement plus éloignées de PmiA_{PflMQ8r1-96} (18 à 31 % d'identité de séquence) a été testée. Dans ce cas, les homologues de PflM_{Q8r1-96} présentent avec cette dernière 35 à 46 % d'identité de séquence. Il a été montré que les PmiA phylogénétiquement proches de PmiA_{PflMQ8r1-96} sont capables de protéger une souche sensible contre la PflM_{Q8r1-96}. En revanche, cette capacité d'immunité croisée est perdue pour les protéines PmiA phylogénétiquement éloignées.

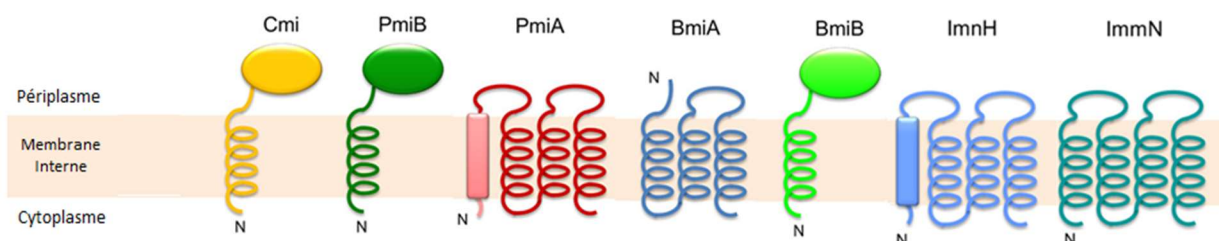


Figure 55 : Topologie membranaire des différentes protéines d'immunité associées aux homologues de la ColM. Les segments en hélice correspondent à des segments transmembranaires. Les segments rectangulaires correspondent à des séquences signal. Les domaines périplasmiques solubles sont représentés par des ovals. L'extrémité N-terminale pour chacune des protéines d'immunité est représentée par la lettre N. La topologie des protéines d'immunité de ColM (Cmi, en jaune) et de ColN (ImmN, en turquoise foncé) est également représentée (d'après Ghequire et De Mot, 2015; Ghequire *et al.*, 2017a, 2017b).

Récemment, une analyse *in silico* des génomes de *Pseudomonas* a permis d'identifier, au sein de plusieurs espèces de *Pseudomonas* telles que *P. fluorescens*, *P. libanensis* et *P. synxantha*, un gène codant pour un nouveau type de protéine possédant un domaine similaire au domaine catalytique de la ColM (Ghequire *et al.*, 2017a). Cette nouvelle bactériocine, PmnH, possède, en plus du domaine catalytique homologue à ColM, un deuxième domaine catalytique de type ionophorique similaire à celui de la ColN. Ce type de bactériocine possédant deux domaines catalytiques avait déjà été identifié chez *Pseudomonas*, mais dans ce cas les protéines hybrides possédaient deux domaines catalytiques avec des fonctions similaires. Les protéines PsdH1 et PsdH2 comprennent en effet deux domaines DNase (Ghequire et De Mot, 2014). Afin de caractériser ce nouveau type de bactériocine contenant deux domaines catalytiques, respectivement homologues aux ColM et ColN, le gène codant pour PmnH a été cloné à partir du génome de *P. synxantha*, et la protéine correspondante a été produite et purifiée. La PmnH possède en N-terminal une courte séquence riche en prolines similaire à celle déjà identifiée au sein de la PsyM (Grinter *et al.*, 2012b) ou de BurM (Ghequire et De Mot, 2015), probablement impliquée dans l'étape de translocation de la protéine à travers la membrane externe suite à l'interaction de cette séquence avec un homologue de la protéine TonB. La cytotoxicité de PmnH a été testée vis-à-vis de 35 souches de *Pseudomonas* et 11 % d'entre elles se sont révélées sensibles. La sensibilité de ces souches à PmnH est augmentée lorsque le milieu est carencé en fer. Ce résultat a permis d'identifier le récepteur aux ferrichromes FiuA, un récepteur de membrane externe TonB-dépendant (Hannauer *et al.*, 2010), comme étant la cible de la PmnH. Il a également été montré dans cette étude que FiuA est parasité par les PaeM et PflM (Ghequire *et al.*, 2017a).

L'activité cytotoxique de la PmnH semble uniquement liée à son domaine ionophorique. En effet, lorsqu'elle est délétée de ce domaine, plus aucune activité cytotoxique n'est observée. Le domaine catalytique homologue à ColM semble donc être dépourvu d'activité. Le motif conservé DxYD(x₅)HR retrouvé chez la ColM et ses homologues varie sensiblement au sein de la PmnH dont le motif est le suivant : HxYD(x₅)FK. Il apparaît que le résidu D226 de la ColM est ici remplacé par une histidine (H224). Or, il a clairement été montré que toute mutation du résidu D226 de ColM est responsable d'une abolition de l'activité de la protéine (Barreteau *et al.*, 2010; Helbig et Braun, 2011). De la même manière, le résidu R236 de la ColM se trouve remplacé par une lysine (K234) dans la PmnH. Cette variation au niveau du motif consensus semble donc être à l'origine de l'inactivité du domaine homologue de ColM.

Un gène d'immunité associé à PmnH a également été identifié et la capacité de la protéine correspondante à protéger une souche sensible contre la PmnH a été démontrée. La topologie de cette protéine d'immunité, ImnH, a été prédite : elle serait constituée de 4 segments transmembranaires dont le premier correspondrait à une séquence signal de type Sec (**Figure 55**). Bien que possédant une certaine homologie structurale, PmiA et ImnH ne présentent qu'une faible homologie de séquence. En revanche, la protéine d'immunité de la colicine N est également constituée de 4 segments transmembranaires (**Figure 55**) et partage une identité de séquence de 20 % avec ImnH, ce qui suggère que cette dernière protégerait contre l'activité du domaine ionophorique de la PmnH (Ghequire *et al.*, 2017a).

2.2. Les homologues issus de *Burkholderia* spp. :

Des gènes codant pour des burkhocines M (BurM) ont été identifiées au sein de 16 souches de *Burkholderia* suite à des analyses génomiques *in silico* (Ghequire et De Mot, 2015). Ces protéines se caractérisent par la présence d'une séquence signal en N-terminal probablement impliquée dans leur sécrétion. Ce peptide signal permettrait le recrutement soit du système Tat, soit du système Sec. On retrouve également au niveau de la séquence N-terminale une séquence conservée qui correspondrait *a priori* à une *TonB box* dont la séquence est spécifique à *Burkholderia* (Ghequire et De Mot, 2015). Dans cette étude, les gènes correspondant à deux burkhocines M, BurM1 produite par *B. ambifaria* MEX-5 et BurM2 produite par *B. ambifaria* AMMD, ont été clonés et les protéines correspondantes surproduites et purifiées. Leur activité cytotoxique a été évaluée sur un panel de 44 souches de *Burkholderia* dont 26 % se sont révélées sensibles à BurM1 et 7 % à BurM2. Toutes les souches sensibles à BurM2 le sont également à BurM1.

Des protéines d'immunité présentant une topologie similaire à PmiA et PmiB ont également été identifiées chez certaines souches de *Burkholderia* (Ghequire et De Mot, 2015). Ainsi, la protéine BmiA (*Burkhocin M* immunity type A) possède une topologie membranaire similaire à PmiA, mais ne possède que 3 segments transmembranaires. BmiB possède une topologie similaire à PmiB avec une ancre membranaire en N-terminal qui correspondrait potentiellement à une séquence signal (**Figure 55**). Les gènes codant pour ces protéines d'immunité peuvent être situés en aval ou en amont des gènes responsables de la production de ces burkhocines. Les gènes d'immunité de BurM1 et BurM2 ont également été clonés et les protéines ont été exprimées au sein d'une souche à la fois sensible à BurM1 et BurM2. La protéine d'immunité associée à BurM1 est de type BmiA, alors que la protéine d'immunité associée à BurM2 est de type BmiB. Lors des tests d'immunité, il est apparu que seule la protéine BmiA protège contre l'action de la BurM1 et que seule BmiB protège contre l'action de la BurM2. Ainsi, aucune immunité croisée n'a été observée (Ghequire et De Mot, 2015).

2.3. Les homologues issus de *Pectobacterium carotovorum* :

Des homologues de ColM ont également été identifiés chez *Pectobacterium carotovorum* (Grinter *et al.*, 2012a). En effet, les pectocines M1 (PcaM1) et M2 (PcaM2) sont produites respectivement par *P. carotovorum subsp. carotovorum* PC1 (*Pcc* PC1) et par *P. carotovorum subsp. brasiliensis* BPR1692 (*Pcb* BPR1692). Ces deux protéines présentent une organisation particulière par rapport aux autres homologues de ColM identifiés jusqu'à présent, puisque les domaines de translocation et de réception traditionnellement retrouvés en amont du domaine catalytique sont ici remplacés par un seul domaine ferrédoxine contenant un cluster [2Fe-2S] en N-terminal. Ce domaine, identifié chez PcaM1 et PcaM2, présente 60 % d'identité de séquence avec la ferrédoxine d'épinard. Le domaine catalytique, ayant permis l'identification de ces deux protéines, présente quant à lui 46 % d'identité de séquence avec le domaine catalytique de la ColM. Ces deux domaines sont reliés entre eux par l'intermédiaire d'un linker en hélice α . Les protéines PcaM1 et PcaM2, qui ont une identité de séquence de 58 %, présentent un spectre d'action restreint. Elles sont majoritairement actives vis-à-vis de souches de *P. carotovorum* et *P. astrosepticum* (Grinter *et al.*, 2012a). Un gène codant pour une protéine d'immunité a été identifié au sein de la souche productrice de PcaM1, situé immédiatement en aval du gène codant pour la bactériocine. La séquence codante de ce gène présente 24 % d'identité de séquence avec la Cmi, mais aucune activité de protection vis-à-vis de PcaM1 n'a été mise en évidence. Par ailleurs, aucune protéine d'immunité associée à PcaM2 n'a pour l'heure été identifiée (Grinter *et al.*, 2012a). PcaM1 et PcaM2 présentent toutes les deux, *in vitro*, une activité de dégradation du lipide II similaire à celle de la ColM (Grinter *et al.*, 2014).

Etant donné que ces protéines possèdent un domaine ferrédoxine en N-terminal, leur activité cytotoxique vis-à-vis de souches sensibles a été testée dans des milieux carencés en fer (Grinter *et al.*, 2012a). Leur activité cytotoxique s'est révélée augmentée dans ces conditions, suggérant que le récepteur parasité par PcaM1 et PcaM2 est impliqué dans l'import de fer dans la cellule. De plus, l'activité cytotoxique de ces bactériocines se trouve inhibée en présence d'une forte concentration de ferrédoxine d'épinard dans le milieu. Il a par ailleurs été montré que les deux protéines PcaM1 et PcaM2 parasitent le même récepteur (Grinter *et al.*, 2012a), lequel a récemment été identifié comme étant la protéine FusA (Grinter *et al.*, 2016). Il s'agit d'un récepteur de membrane externe TonB-dépendant dont la fonction naturelle est l'import de fer dans la cellule *via* la fixation de domaines ferrédoxine contenant un cluster fer-soufre. La structure de ce récepteur a été résolue : comme tous les récepteurs de membrane externe TonB-dépendants retrouvés chez *E. coli*, il présente une structure en tonneau β constituée de 22 brins. Le pore du tonneau est également bouché par un « *plug* » en N-terminal. En revanche, les boucles extracellulaires de FusA présentent une organisation unique, majoritairement structurée en feuillet β (**Figure 56**) (Grinter *et al.*, 2016). Le complexe formé par FusA et la pectocine PcaM1 présente une stoechiométrie de 1 : 1.

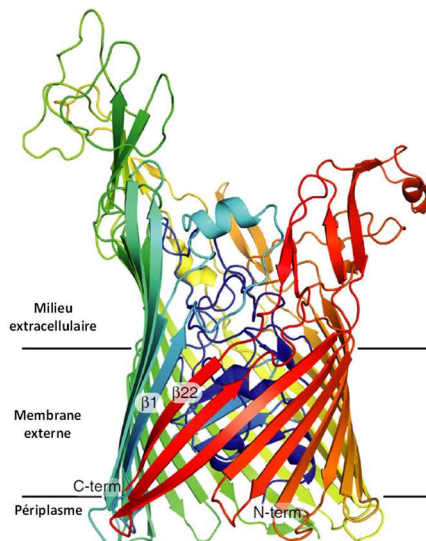


Figure 56 : Structure tridimensionnelle du récepteur de membrane externe FusA. La structure de FusA est représentée en cartoon. FusA est coloré en « arc en ciel », du bleu en N-terminal au rouge en C-terminal. Le premier ($\beta 1$) et le dernier ($\beta 22$) brin β du tonneau bêta sont identifiés. N-term : Extrémité N-terminale ; C-term : Extrémité C-terminale (d'après Grinter *et al.*, 2016).

La structure de la protéine PcaM2 a été résolue récemment (Grinter *et al.*, 2014). Contrairement à la ColM et à ses autres homologues (PaeM, PflM, PsyM et BurM), la PcaM2 ne présente pas de domaine N-terminal intrinsèquement désordonné. Cela suggère donc que les PcaM1 et PcaM2 empruntent un mécanisme de translocation à travers la membrane externe qui diffère de celui de la ColM et de ses autres homologues. La présence du linker en hélice α entre le domaine ferrédoxine et le domaine catalytique offre une certaine flexibilité à la PcaM2. Des expériences de SAXS (Small Angle X-Ray Scattering) ont en effet mis en évidence que cette protéine existe sous deux conformations en solution, une forme courbée et une forme étendue. Ces deux formes ont été cristallisées et leurs structures ont été résolues (**Figure 57**). La structure du domaine ferrédoxine de la PcaM2 est quasi-identique à celle de la ferrédoxine d'épinard (RMSD = 0,90 Å). Le domaine catalytique est lui aussi très proche structuralement du domaine catalytique de la ColM (RMSD = 1,7 Å), comme cela a été observé pour les autres homologues (Barreteau *et al.*, 2012b; Grinter *et al.*, 2014).

L'organisation du site actif est similaire à celle retrouvée chez la ColM, à l'exception du résidu R236 dont la chaîne latérale est orientée vers l'intérieur du site actif, contrairement à celle du résidu R236 de la ColM qui pointe vers l'extérieur de la protéine (Grinter *et al.*, 2014).

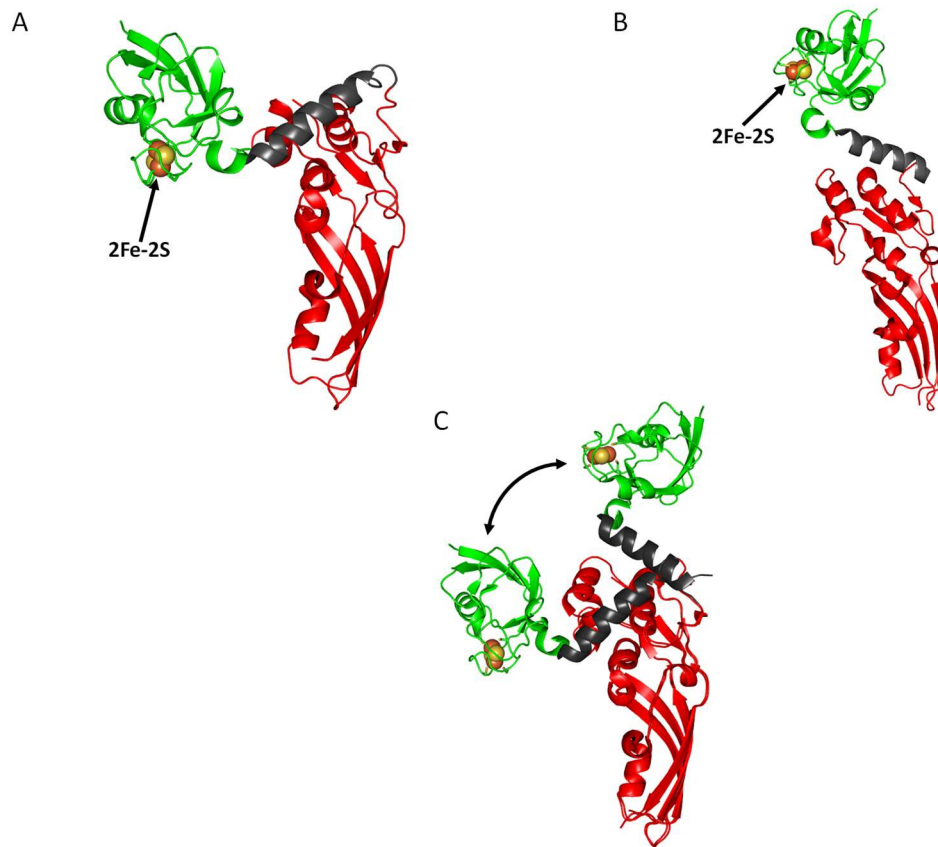


Figure 57 : Structure tridimensionnelle de la PcaM2. A : Structure tridimensionnelle de PcaM2 sous sa forme courbée (code PDB : 4N58). B : Structure tridimensionnelle de PcaM2 sous sa forme étendue (code PDB : 4N59). C : Superposition des structures sous formes courbée et étendue. L'alignement des structures a été réalisé sur l'ensemble des C α du domaine catalytique. La flèche illustre le passage d'une conformation à une autre en solution. Le domaine ferrédoxine (résidus 1 à 94) est coloré en vert et le domaine catalytique (résidus 115 à 271) en rouge. Les domaines ferrédoxine et catalytique sont reliés par un linker en hélice α (résidus 95 à 114). Le cluster [2Fe-2S] est représenté sous forme de sphères et est indiqué pour les structures A et B.

La résolution de structure des protéines FusA et PcaM2 a permis la réalisation d'expériences de *docking* pour simuler la liaison de la pectocine à son récepteur (Grinter *et al.*, 2016). Les deux formes cristallines de la PcaM2 ont ainsi été « dockées » à la surface du récepteur FusA, et les résultats obtenus suggèrent que la flexibilité de cette pectocine, conférée par son linker en hélice α , est essentielle pour les premières étapes de liaison au récepteur (**Figure 58**).

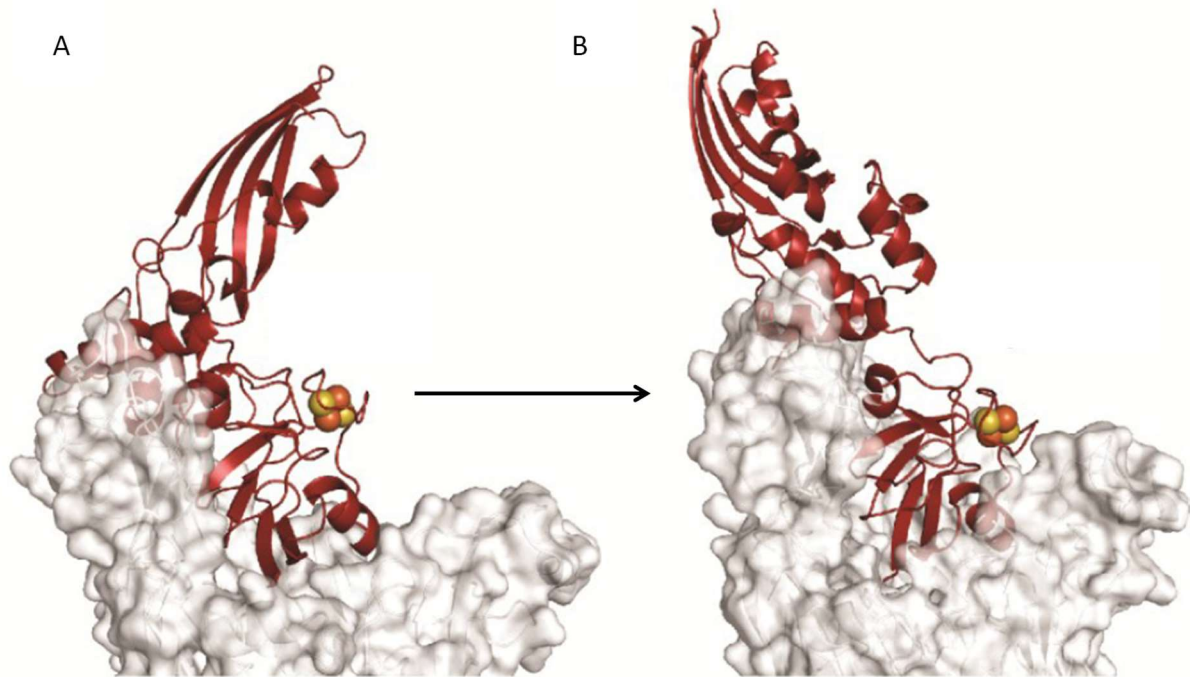


Figure 58 : Modèle de liaison de la PcaM2 à la surface de FusA. La forme courbée de la PcaM2 semble pouvoir se lier correctement à la forme ouverte de FusA (A). La forme étendue semble quant à elle se lier correctement à la forme fermée de FusA (B). Cela suggère qu'un réarrangement conformationnel de FusA et de PcaM2 s'opère suite à leur interaction. La flexibilité de la PcaM2 semble donc primordiale pour les premières étapes de la fixation à son récepteur. Ce dernier est représenté en surface de van der Waals et la PcaM2 est représentée en cartoon et colorée en pourpre (d'après Grinter *et al.*, 2016).

VI. Objectifs de l'étude :

La multirésistance bactérienne aux antibiotiques conventionnels constitue un problème majeur de santé publique qui est bien reconnu aujourd'hui. Cette situation inédite nécessite de trouver rapidement des stratégies innovantes pour découvrir de nouveaux agents antibactériens.

Le laboratoire de Dominique Mengin-Lecreulx, au sein duquel j'ai effectué ma thèse, développe depuis longtemps une étude pluridisciplinaire approfondie de la voie de biosynthèse du peptidoglycane dans sa globalité, alliant approches fondamentales et appliquées. C'est dans ce double contexte que le laboratoire a démarré, il y a une dizaine d'années, un projet de recherche centré sur l'étude de la colicine M (ColM), protéine aux propriétés antibactériennes interférant avec la voie de biosynthèse du peptidoglycane. Les études menées au sein de l'équipe ont grandement permis d'approfondir les connaissances sur la ColM, notamment suite à l'identification à la fois de sa cible naturelle, le lipide II (El Ghachi *et al.*, 2006), mais également des résidus essentiels à son activité (Barreteau *et al.*, 2010).

Différents homologues produits par des souches de *Pseudomonas*, *Burkholderia* et *Pectobacterium* ont été identifiés et caractérisés biochimiquement et/ou structuralement (Barreteau *et al.*, 2009b, 2012b). Par ailleurs, la capacité des protéines ColM et PaeM à hydrolyser des lipides II de structures variées, rencontrés notamment dans différentes espèces pathogènes de bactéries à Gram positif (*S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium*...) a été démontrée (Patin *et al.*, 2012; Barreteau *et al.*, 2012b), mettant ainsi en avant l'important potentiel de cette nouvelle famille d'enzymes quant à leur éventuelle utilisation dans l'avenir, comme alternative crédible aux antibiotiques conventionnels.

Cependant, des zones d'ombre existent encore, notamment en ce qui concerne le mécanisme catalytique de cette famille d'enzymes qui, à l'heure actuelle, reste encore inconnu. Afin de tenter de l'élucider, l'un des axes de mon travail de thèse a consisté en l'étude structurale de la PaeM avec ou sans ligand. Cet homologue de ColM a spécifiquement été choisi pour cette étude, car sa structure tridimensionnelle a été résolue au laboratoire en collaboration avec l'équipe « Fonction et Architecture des Assemblages Macromoléculaires » dirigée par le Pr. Herman van Tilbeurgh (Barreteau *et al.*, 2012b).

Comme la ColM et ses homologues possèdent un spectre d'action restreint (Barreteau *et al.*, 2009b; Grinter *et al.*, 2012b; Ghequire et de Mot, 2015; Ghequire *et al.*, 2017a, 2017b), le potentiel cytotoxique de différents homologues vis-à-vis d'*E. coli* a été testé par le biais d'une expression périplasmique, permettant d'expédier la protéine néo-synthétisée de façon directe dans le périplasma de la souche productrice, constituant ainsi le deuxième axe de recherche de mon travail de thèse. Cette méthode, précédemment utilisée pour la ColM (Barnéoud-Arnoulet *et al.*, 2010), a ainsi été généralisée pour les protéines PaeM, PflM, PsyM et PcaM afin déterminer leur capacité à éliminer une souche bactérienne non ciblée naturellement et pour tenter par la suite d'élargir leur spectre d'action, notamment par la création de protéines chimères.

Ce dernier point constitue le troisième axe de recherche de mon travail de thèse. Il a consisté en la création de bactériocines hybrides, ciblant spécifiquement *E. coli*, entre la ColM et certains de ses homologues afin de valider la preuve de concept.

La création et l'étude de bactériocines hybrides ont souvent été réalisées dans le but d'étudier l'organisation modulaire des colicines, et plus précisément l'implication et le rôle de chacun des domaines dans leur mode d'action. En 1991, par exemple, Bénédetti et ses collaborateurs avaient créé différentes protéines hybrides entre deux colicines ionophoriques, ColA et ColE1. Ces constructions avaient permis de valider la fonction du domaine N-terminal dans la spécificité de l'import, mais également de montrer que la protéine d'immunité associée à l'une ou l'autre colicine reconnaissait spécifiquement le domaine C-terminal de la colicine considérée (Bénédetti *et al.*, 1991; Frenette *et al.*, 1991).

En 2012, afin d'étudier la réception et la translocation de la ColM, Karen S. Jakes avait créé des colicines hybrides entre ColM et ColE1, et entre ColM et Colla. Dans le premier cas, le domaine de réception de ColM avait été remplacé par celui de la ColE1 au sein de la bactériocine hybride. Il est apparu qu'une telle construction se produisait fortement, mais majoritairement sous la forme de corps d'inclusion. Une fois solubilisée, cette protéine ne présentait aucune activité cytotoxique vis-à-vis d'*E. coli*, mais était cependant capable d'inhiber l'action de la ColE1 sauvage, démontrant ainsi que le domaine de réception était fonctionnel au sein de la chimère. Dans le second cas, le domaine de translocation de la ColM avait été remplacé par celui de la Colla, conduisant à la production d'une protéine soluble et active contre *E. coli*, bien que cette bactérie ne présente pas à sa surface le récepteur FhuA. La seule présence du récepteur Cir, utilisé comme translocateur par Colla, apparaissait donc ici suffisante pour conférer une sensibilité à cette protéine hybride (Jakes, 2012).

Des bactériocines hybrides ont également été construites à partir de bactériocines provenant d'espèces bactériennes autres qu'*E. coli*. De telles constructions ont été réalisées entre les pyocines S1 ou S2 et les colicines E2 ou E3, qui possèdent toutes une activité nucléasique. Ces protéines chimères ont permis de confirmer que les étapes de réception et de translocation étaient spécifiques d'espèces, mais également que des domaines d'activité provenant de pyocines étaient capables d'induire la mort d'une souche d'*E. coli*, et inversement. Ces expériences démontraient donc que les différents domaines constituant les bactériocines provenant d'espèces différentes sont potentiellement interchangeables (Kageyama *et al.*, 1996). De telles protéines seront, *a priori*, toujours actives contre la bactérie ciblée dès lors qu'elles auront traversé la membrane externe, étant donné que la bactérie cible ne sera pas en mesure de produire la protéine d'immunité associée. Un travail plus récent, mené par Lukacik et ses collaborateurs, a ainsi permis de confirmer que le mécanisme d'immunité pouvait être contourné par la création de bactériocines hybrides. Dans cette étude, le domaine catalytique de la pesticine, produite par *Y. pestis*, a été remplacé par le lysozyme produit par le bactériophage T4. Ces deux domaines possèdent une homologie structurale très forte, mais une homologie de séquence faible. Tout comme la pesticine, cette bactériocine hybride s'est avérée capable d'éliminer des souches de *Yersinia* ou *E. coli* pathogènes exprimant à leur surface le récepteur FyuA. Le grand potentiel de cette chimère réside dans le fait qu'elle est encore capable d'éliminer des souches produisant la protéine d'immunité Pim, contrairement à la pesticine (Lukacik *et al.*, 2012).

Le remplacement du domaine catalytique d'une bactériocine par un domaine structuralement et fonctionnellement très proche mais séquentiellement différent semble ainsi permettre de contourner les mécanismes d'immunité. L'ensemble de ces résultats permettent donc de valider l'approche choisie quant à la création de bactériocines hybrides, dans le but à la fois d'élargir le spectre d'action initial de la ColM et de ses homologues mais également de s'affranchir des mécanismes d'immunité.

Matériels et Méthodes

1. Produits et réactifs :

Les enzymes de restriction et les oligonucléotides synthétiques provenaient respectivement de New England Biolabs et Eurofins-MWG. Le *n*-dodécyl- β -D-maltopyranoside (DDM) a été acheté chez Anatrace®. Les lipides C₅₅-PP, C₅₅-P et C₅₅-OH provenaient de l'Institut de Biochimie et de Biophysique de l'Académie des Sciences de Pologne. Le C₁₀-P et le C₁₅-PP ont été achetés chez Sigma. Le *meso*-[¹⁴C]A₂pm était un don du CEA (Commissariat à l'Énergie Atomique). L'UDP-[¹⁴C]GlcNAc a été acheté chez Perkins. L'UDP-MurNAc-L-Ala-Y-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala et l'UDP-MurNAc-L-Ala-Y-D-Glu-*meso*-A₂pm-D-Ala-D-Ala ont été produits par synthèse enzymatique au laboratoire selon le protocole établi par Babič *et al.* (Babič *et al.*, 2007). Le polymère de nickel-nitrilotriacétate agarose (Ni-NTA) provenait de chez Qiagen®.

2. Souches bactériennes, plasmides et conditions de culture :

2.1. Souches :

Les différentes souches d'*E. coli* utilisées lors de ce travail sont présentées dans le tableau 5 suivant :

[Tableau 5](#) : Liste des souches d'*E. coli* utilisées.

Souche d' <i>E. coli</i> K12	Génotype	Référence
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 Ø80dlacZ ΔM15</i>	Bethesda Research Laboratories
C43(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Avidis
Rosetta(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1</i> (DE3) pRARE (Cam ^R)	Novagen
BL21	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS</i> λ DE3 = λ <i>sBamHI ΔEcoRI-B</i> <i>int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>	New England Biolabs
FB8 Rel+	F ⁻ <i>prototrophe</i>	Mengin-Lecreulx <i>et al.</i> , 1989
FB8 Δ <i>lysA</i>	FB8 Δ <i>lysA</i> :: Kan ^R	Mengin-Lecreulx <i>et al.</i> , 1989
BW25113	<i>lacI^q rrnB_{T14} ΔlacZ_{WJ16} hsdR514 Δ(araBAD)_{AH33}</i> Δ(<i>rhaBAD</i>) _{LD78}	Datsenko <i>et al.</i> , 2000
BW25113 Δ <i>fhuA</i>	BW25113 Δ <i>fhuA</i> :: Kan ^R	Baba <i>et al.</i> , 2006
BW25113 Δ <i>tonB</i>	BW25113 Δ <i>tonB</i> :: Kan ^R	Baba <i>et al.</i> , 2006
BW25113 Δ <i>fkpA</i>	BW25113 Δ <i>fkpA</i> :: Kan ^R	Baba <i>et al.</i> , 2006

2.2. Milieux de culture :

En fonction des expériences, les souches ont été cultivées :

- soit en milieu riche 2YT dont la composition était la suivante :
 - Pastone : 16 g.L⁻¹
 - Extrait de levure : 10 g.L⁻¹
 - NaCl : 5 g.L⁻¹

Pour obtenir de la gélose dure, de l'agar était ajouté à 18 g.L⁻¹. Pour obtenir de la gélose molle, il était ajouté à 9 g.L⁻¹.

- soit en milieu M63 dont la composition était la suivante :
 - KH₂PO₄ : 13,6 g.L⁻¹
 - (NH₄)₂SO₄ : 2 g.L⁻¹
 - MgSO₄·7H₂O : 0,2 g.L⁻¹
 - FeSO₄·7H₂O : 0,5 mg.L⁻¹

Ces milieux ont été stérilisés à l'autoclave (120°C, 20 min) avant utilisation. Lorsque les conditions de culture le nécessitaient, des antibiotiques ont été ajoutés extemporanément au milieu de culture aux concentrations suivantes :

- ampicilline : 100 µg.mL⁻¹
- kanamycine : 60 µg.mL⁻¹
- chloramphénicol : 25 µg.mL⁻¹.

2.3. Plasmides :

Les différents plasmides utilisés et construits lors de ce travail sont décrits dans le tableau 6 ci-dessous :

[Tableau 6](#) : Liste des plasmides utilisés au cours de ce travail.

Plasmide	Résistance	Protéine codée par le vecteur	Etiquette/Séquence signal	Référence
pET2130	Amp ^R	-	His ₆ -Tag en N-terminal	Barreteau <i>et al.</i> , 2009b
pET2160	Amp ^R	-	His ₆ -Tag en C-terminal	Barreteau <i>et al.</i> , 2009b
pASK-IBA4	Amp ^R	-	OmpA en N-terminal	IBA BioTAGnology; Barnéoud-Arnolet <i>et al.</i> , 2010b
pREP4groESL	Kan ^R	Chaperonnes	-	Amrein <i>et al.</i> , 1995
p/lysS	Cam ^R	Lysozyme T7	-	Studier, 1991
pMLD238	Kan ^R	ColM	His ₆ -Tag en C-terminal	Barreteau <i>et al.</i> , 2010

pMLD283	Amp ^R	ColM 1-120	His ₆ -Tag en N-terminal	Ce travail
pMLD284	Amp ^R	ColM ¹²¹ QM ¹²² :: EF	His ₆ -Tag en N-terminal	Ce travail
pMLD232	Amp ^R	Cmi	-	Gérard <i>et al.</i> , 2011
pFFG11	Amp ^R	Cmi	His ₆ -Tag en C-terminal	Gérard <i>et al.</i> , 2011
pMLD245	Amp ^R	PaeM	His ₆ -Tag en C-terminal	Barreteau <i>et al.</i> , 2009b
pTTB240	Amp ^R	PaeM D241A	His ₆ -Tag en N-terminal	Barreteau <i>et al.</i> , 2012b
pET2130 <i>paeM</i> <i>Δ1-30</i>	Amp ^R	PaeM Δ1-30	His ₆ -Tag en N-terminal	Ce travail
pET2160 <i>paeM</i> <i>Δ1-30</i>	Amp ^R	PaeM Δ1-30	His ₆ -Tag en C-terminal	Ce travail
pASK <i>paeM F232S</i>	Amp ^R	PaeM F232S	OmpA en N-terminal	Ce travail
pMLD268	Amp ^R	PfIM	His ₆ -Tag en N-terminal	Barreteau <i>et al.</i> , 2009b
pASK <i>pfIM</i>	Amp ^R	PfIM	OmpA en N-terminal	Ce travail
pMLD261	Amp ^R	PsyM	His ₆ -Tag en N-terminal	Barreteau <i>et al.</i> , 2009b
pASK <i>psyM</i>	Amp ^R	PsyM	OmpA en N-terminal	Ce travail
pMLD365	Amp ^R	PcaM1	His ₆ -Tag en C-terminal	Ce travail
pMLD464	Amp ^R	PcaM1 D222A	His ₆ -Tag en C-terminal	Ce travail
pMLD381	Amp ^R	PcaM1	OmpA en N-terminal	Ce travail
pMLD395	Amp ^R	PcaM1 D222A	OmpA en N-terminal	Ce travail
pMLD403	Amp ^R	PcaM1 Δ1-107	OmpA en N-terminal	Ce travail
pASK <i>pcaM1</i> <i>D222N</i>	Amp ^R	PcaM1 D222N	OmpA en N-terminal	Ce travail
pET2130 <i>cca1</i>	Amp ^R	CCA1	His ₆ -Tag en N-terminal	Ce travail
pASK <i>cca1 F244S</i>	Amp ^R	CCA1 F244S	OmpA en N-terminal	Ce travail
pET2130 <i>cca2</i>	Amp ^R	CCA2	His ₆ -Tag en N-terminal	Ce travail
pASK <i>cca2 Y239H</i>	Amp ^R	CCA2 Y239H	OmpA en N-terminal	Ce travail
pET2130 <i>cca3</i>	Amp ^R	CCA3	His ₆ -Tag en N-terminal	Ce travail

pASK <i>cca3 L141P</i>	Amp ^R	CCA3 L141P	OmpA en N-terminal	Ce travail
pET2130 <i>ccc1</i>	Amp ^R	CCC1	His ₆ -Tag en N-terminal	Ce travail
pASK <i>ccc1</i>	Amp ^R	CCC1	OmpA en N-terminal	Ce travail
pET2130 <i>ccc2</i>	Amp ^R	CCC2	His ₆ -Tag en N-terminal	Ce travail
pASK2130 <i>ccc2</i>	Amp ^R	CCC2	OmpA en N-terminal	Ce travail

3. Techniques de biologie moléculaire :

3.1. Oligonucléotides :

Les oligonucléotides utilisés pour la construction des différents plasmides sont présentés dans le tableau 7 suivant :

Tableau 7 : Oligonucléotides utilisés. Les sites de restrictions sont indiqués en gras, et l'enzyme de restriction correspondante est indiquée entre parenthèses. Le codon initiateur ATG est souligné. Pour les oligonucléotides utilisés en mutagenèse dirigée, le codon modifié est écrit en rouge.

Oligonucléotide	Séquence
paem_R	5'- GCGCA AGCT TTTAACCAGAAATATTTACAGGGATAGC -3' (HindIII)
paemΔ1-30H ₆ -N_F	5'- GCGC GGATCC GCGCCTAGTCCTGCCCAAGTCGGG -3' (BamHI)
paemΔ1-30H ₆ -C_F	5'- CGCG CCATGG GCGCCTAGTCCTGCCCAAGTCGGGTATATT-3' (NcoI)
paemΔ1-30H ₆ -C_R	5'-CGCG AGATCT ACCAGAAATATTTACAGGGATAGC-3' (BglII)
paem_pASK_F	5'-GTGAT CCATGG TTATGGATCTTGGA ACT ACCACTATAGTC-3' (NcoI)
paem_pASK_R	5'-CCTG AAAGCT TTTAACCAGAAATATTTACAGGGATAGC-3' (HindIII)
pflm_pASK_F	5'-GCGC GGATCC <u>CATG</u> GAATTCGAGCTTCCAGCTACTTATG-3' (BamHI)
pflm_pASK_R	5'-GCCG AAAGCTT CACCTATCGGGCGTAGCTAATAGGGA-3' (HindIII)
psym_pASK_F	5'-GCGC GAATTC <u>GATG</u> CCTATTGAGCTTCTCCGACATAC-3' (EcoRI)
psym_pASK_R	5'-CGCG CCTGCAG CTAGTTGCCACTAACCGTAACCGGCAAC-3' (PstI)
Pcam-O1	5'-CGCG CCATGG GCTACTTATAAAATTAAGATTTGACAGG-3' (NcoI)
Pcam-O2	5'-CGCG AGATCT TAAACGCTGACCACGCCAGAAATATC-3' (BglII)

Pcam-O3	5'-CGCG AAGCTT AATAACGCTGACCACGCCAGAAATATC-3' (HindIII)
Pcam-mut1 (D222A)	5'-GGATTCGTGCTTATAAT GCT CTTTATGATGCCAATCCC-3'
Pcam-mut2 (D222A)	5'-GGGATTGGCATCATAAAG AGC ATTATAAGCACGAATCC-3'
Pcam-mut3 (D222N)	5'- GGATTCGTGCTTATAAT AAT CTTTATGATGCCAATCCC-3'
Pcam-mut4 (D222N)	5'- GGGATTGGCATCATAAAG ATT ATTATAAGCACGAATCC-3'
Pcam-Δ1-107	5'-CGCG CCATGGG ATTACTTGGTGGCAACGATTCTCCAG-3' (NcoI)
colm_F	5'-GGAG GGATCC <u>ATG</u> GAAACCTTAACTGTTCATGCAC-3' (BamHI)
colm_1-120_R	5'-CGCG GAATTC TTTCATATTCATTGAGCGATAGTCATATTGACTTGGCGC-3' (EcoRI)
colm_123-271_F	5'-CGCG GAATTC AGCGGTAATGTCACTACACCAATTGTGGC-3' (EcoRI)
colm_R	5'- CCCGAAGCTT ATATTATCGCTTACCACTTTCTTTAATGTG-3' (HindIII)
paem_124-289	5'- CGCG GAATTC GAAGGTATCCCTAGCTGGGATCG -3' (EcoRI)
paem_127-289	5'- GCG CGAATTC CCTAGCTGGGATCGTCCTAAAATAG -3' (EcoRI)
paem_134-28	5'- GCG CGAATTC ATAGATACGTTCAATGGCGGG -3' (EcoRI)
pcam_93-268	5'- GCG CGAATTC TATTGGGTTATGATTCATATCG -3 (EcoRI)
pcam_114-268	5'- CGCG GAATTC GATTCTCCAGAACTTTTAGAC -3'(EcoRI)
chim_pASK_F	5'- CGCG CCATGG GAAACCTTAACTGTTCATG – 3' (NcoI)

3.2. PCR :

L'amplification de l'ADN par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a été effectuée avec un thermocycleur automatique Primus (MWG-Biotech). Les polymérases utilisées étaient l'Expand High Fidelity PCR (Roche) et la Taq polymérase (New England Biololabs). La purification des produits de PCR a été effectuée en utilisant le kit *Nucleospin® extract II* (Macherey-Nagel). L'amplification et la purification des fragments d'ADN ont été vérifiées sur gel d'agarose. Les séquences amplifiées qui ont été clonées dans des plasmides ont été vérifiées au préalable par séquençage (Eurofins-MWG).

3.3. Extraction d'ADN plasmidique :

L'isolement de plasmides a été effectué après une lyse alcaline des cellules selon le protocole décrit par Sambrook et collaborateurs (Sambrook *et al.*, 1989) en utilisant le kit *Nucleospin® Plasmid* (Macherey-Nagel).

3.4. Restriction et ligation des fragments d'ADN :

Les méthodes standard pour les digestions par endonucléases et les ligations ont été utilisées (Davis *et al.*, 1980; Sambrook *et al.*, 1989) dans les conditions préconisées par le fournisseur (New England Biolabs).

3.5. Construction des plasmides :

3.5.1. Construction des plasmides d'expression des homologues de ColM :

Le gène *pcaM1* a été amplifié à partir du chromosome de la souche PC1 de *P. carotovorum* en utilisant les oligonucléotides Pcam-O1 et Pcam-O2 (**Tableau 6**). Ces oligonucléotides ont été conçus pour permettre l'ajout respectivement d'un site de restriction NcoI en 5' et un site BglII en 3'. Le plasmide pET2160 et l'insert ont ensuite été digérés par les enzymes NcoI et BglII. L'insert a été ligaturé dans le plasmide pET2160 à l'aide de la ligase T4. Les produits de ligation ont été transformés au sein de cellules d'*E. coli* DH5α compétentes et les transformants isolés sur milieu sélectif (2YT-ampicilline). Ces clones ont ensuite été criblés par PCR et les plasmides issus de plusieurs clones positifs ont été extraits et vérifiés par séquençage. Le plasmide recombinant a été nommé pMLD365. Ce plasmide permet l'expression de la protéine PcaM1 avec une étiquette His₆ (extension Arg-Ser-His₆) en C-terminal.

La même méthodologie a été suivie pour la construction des plasmides pET2160 *paeM* Δ1-30 et pET2130 *paeM* Δ1-30 permettant l'expression de la protéine PaeM tronquée de ses 30 premiers acides aminés et possédant respectivement une étiquette His₆ en C-terminal ou en N-terminal (extension Met-His₆-Gly-Ser).

3.5.2. Construction des plasmides d'expression des différentes colicines-chimères :

La construction des gènes codant pour les différentes colicines-chimères utilisées lors de ce travail a été effectuée en deux étapes. La première étape permet de cloner la séquence codant pour les domaines de réception et de translocation de la colicine M et la deuxième étape de cloner, en aval de cette séquence, les différentes séquences codant pour les domaines catalytiques des protéines PaeM ou PcaM. Ainsi, le gène codant pour la protéine chimère CCA1 (*Chimère Coli-Aeruginosa 1*) a été construit de la manière suivante : la séquence codant pour les domaines de réception et de translocation de ColM (acides aminés 1 à 120) a été amplifiée à partir du plasmide pMLD238 en utilisant les oligonucléotides colm_F et colm_1-120_R qui permettaient l'ajout des sites de restriction respectivement BamHI en 5' et EcoRI en 3'. Le plasmide pET2130 et l'insert ont ensuite été digérés par les enzymes BamHI et EcoRI, puis ligués ensemble. Les produits de ligation ont été transformés au sein de cellules d'*E. coli* DH5α compétentes et les transformants sélectionnés sur milieu sélectif (2YT-ampicilline). Ils ont ensuite été criblés par PCR et les plasmides issus de clones positifs ont alors été vérifiés par séquençage. Le plasmide recombinant ainsi obtenu a été appelé pMLD283. La séquence codant pour le domaine d'activité de PaeM (acides aminés 124 à 289) a alors été amplifiée à partir du plasmide pMLD245, puis insérée entre les sites EcoRI et HindIII du pMLD283, selon la méthodologie décrite

précédemment. Le plasmide recombinant final permettant l'expression de la chimère CCA1 avec une étiquette His₆ (extension Met-His₆-Gly-Ser) a été appelé pET2130 *cca1*.

Le même protocole a été utilisé pour la construction des autres colicines-chimères (CCA2, CCA3 et les deux *Chimères Coli-Carotovorum*, CCC1 et CCC2).

3.5.3. Construction des plasmides permettant l'expression périplasmique :

Le vecteur pASK-IBA4 a été choisi pour étudier l'expression périplasmique de différentes protéines au cours de ce travail. Ce vecteur assure la fusion de la séquence signal OmpA en N-terminal de la protéine d'intérêt, ce qui permet d'exporter la protéine produite, dans un état dénaturé, directement dans le périplasma *via* le système Sec. La séquence signal est clivée durant l'export, ce qui assure la présence, dans le périplasma, des protéines de structure non modifiée. L'expression du gène codé dans ce vecteur est inductible par l'anhydrotétracycline.

Le gène *pcaM1* a été amplifié à partir du plasmide pMLD365 à l'aide des oligonucléotides *pcaM-O1* et *pcaM-O3* permettant l'ajout des sites de restriction NcoI en 5' et HindIII en 3'. Le plasmide pASK-IBA4 et l'insert ont ensuite été digérés par les enzymes NcoI et HindIII. L'insert a été ligaturé dans le plasmide pASK-IBA4 à l'aide de la ligase T4, puis les produits de ligation ont été transformés au sein de cellules d'*E. coli* DH5α compétentes. Les transformants ont été isolés sur milieu sélectif (2YT-ampicilline), criblés par PCR, et les plasmides de clones sélectionnés extraits, puis vérifiés par séquençage. Le plasmide recombinant ainsi obtenu a été nommé pMLD381. La même méthodologie a été utilisée pour la construction des plasmides permettant l'expression périplasmique des protéines PcaM1 D222A, PcaM1 D222N, PcaM1 Δ1-107, PaeM F232S, PflM, PflM Δ1-115, PsyM, PsyM Δ1-122, CCA1 F244S, CCA2 Y339H, CCA3 L141P, CCC1 et CCC2.

3.6. Mutagenèse dirigée :

La mutagenèse dirigée a été réalisée par amplification par PCR des plasmides entiers avec la polymérase Taq Pfu ultra du kit *QuikChange II XL mutagenesis* (Stratagene) en utilisant les couples d'amorces possédant les mutations souhaitées. Dans chaque cas, le produit de PCR a été digéré pendant 1 h par l'enzyme DpnI, afin de dégrader l'ADN matriciel, puis le produit de digestion a été transformé dans la souche *E. coli* XL1-blue (Stratagene) ou DH5α. Les transformants ont été isolés sur milieu sélectif (2YT-ampicilline) et les plasmides issus des clones sélectionnés extraits et vérifiés par séquençage.

3.7. Préparation des cellules compétentes et transformation :

Les cellules de *E. coli* ont été soit transformées par un choc thermique après avoir été rendues compétentes par un traitement au chlorure de calcium (Dagert et Ehrlich, 1979), soit par électroporation.

3.7.1. Transformation par choc thermique :

Les cellules d'une culture de 50 mL, en phase exponentielle de croissance, ont été sédimentées par centrifugation à 5800 × *g* pendant 10 min. Le culot de cellules a été repris dans 30 mL d'une solution stérile de CaCl₂ 50 mM à 4°C. La suspension a été laissée pendant 30 min dans la glace avant d'être à nouveau centrifugée. Le culot a alors repris dans 2 mL de la même solution de CaCl₂. Les cellules

compétentes ont été maintenues dans la glace pour une utilisation immédiate ou conservées à -80°C après addition de 20 % de glycérol. Un volume de 100 µL de bactéries compétentes a été mis en contact pendant 1 h sur glace avec l'ADN (plasmide purifié ou mélange de ligation). La suspension a alors été portée à 42°C pendant une 1 min, puis refroidie brutalement à 4°C. Enfin, un volume de 900 µL de milieu 2YT a été ajouté aux cellules qui ont été incubées pendant 1 à 2 h à 37°C. Les bactéries ont été étalées sur milieu sélectif, puis incubées à 37°C pour la nuit.

3.7.2. Transformation par électroporation :

Les cellules d'une culture de 50 mL, en phase exponentielle de croissance, ont été sédimentées par centrifugation à 5800 × *g* pendant 10 min. Le culot cellulaire a été lavé dans 50 mL d'eau distillée stérile à 4°C une première fois puis les cellules ont de nouveau été sédimentées par une étape de centrifugation. Un deuxième lavage a été effectué avec 50 mL d'eau distillée stérile à 4°C. Les cellules ont été centrifugées et le culot repris dans 2 mL d'eau distillée stérile. Un volume de 75 µL de cette suspension a été mis en contact avec l'ADN (plasmide purifié ou mélange de ligation) et transféré dans une cuve d'électroporation. Un choc électrique de 1,8 kV a été appliqué aux cellules, puis 900 µL de milieu 2YT ont immédiatement été ajoutés sur les cellules qui ont ensuite été incubées pendant 4 à 5 h à 37°C. Les bactéries ont été étalées sur milieu sélectif, puis incubées à 37°C pour la nuit.

4. Surproduction, extraction et purification des protéines recombinantes :

4.1. Surproduction :

Les conditions permettant la surproduction des protéines ColM, PaeM, PsyM et PflM ont été décrites préalablement (Barreteau *et al.*, 2009b; Barreteau *et al.*, 2010).

La souche d'*E. coli* C43(DE3) a été utilisée pour la surproduction de la protéine PaeM Δ1-30. Un volume de 10 mL d'une préculture de la souche transformée par le plasmide pET2130 *paeM* Δ1-30 a été utilisé pour ensemercer 1 litre de milieu 2YT-ampicilline, et cette culture de jour a été incubée à 37°C. Lorsque la culture avait atteint une DO_{600nm} égale à 0,8, la surproduction de la protéine a été induite par ajout dans le milieu d'IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) à une concentration finale de 1 mM. La surproduction a été menée à 30°C sur la nuit.

La souche d'*E. coli* C43(DE3) préalablement transformée par le plasmide pREP4groESL (Kan^R) a été utilisée pour la surproduction des protéines PcaM1, PcaM1 D222A et CCA3. Le plasmide pREP4groESL permet d'exprimer les protéines chaperonnes GroEL et GroES dont le rôle est d'éviter la formation de corps d'inclusion. Un volume de 10 mL d'une préculture de la souche C43(DE3) (pREP4groESL) transformée par le plasmide approprié (type pET, Amp^R) a été utilisé pour ensemercer 1 litre de milieu 2YT-antibiotiques. La culture est incubée à 37°C jusqu'à ce que la DO_{600nm} a atteint une valeur de 0,8. La surproduction des protéines PcaM1 et PcaM1 D222A a alors été induite par ajout d'IPTG à une concentration finale de 1 mM. La concentration d'IPTG utilisée pour l'induction de la protéine CCA3 était de 0,2 mM. Dans tous les cas, la surproduction a été menée à 22°C sur la nuit.

La souche d'*E. coli* Rosetta(DE3) transformée par les plasmides pREP4groESL et pLysS a été utilisée pour l'expression des protéines CCA1, CCA2, CCC1 et CCC2. Le plasmide pLysS (Cam^R) permet de produire le lysozyme T7 dont le rôle est de verrouiller l'expression du gène d'intérêt en absence

d'inducteur. Un volume de 10 mL d'une préculture de la souche Rosetta(pREP4groESL)(pLysS) transformée par le plasmide approprié a été utilisé pour ensemencer 1 litre de milieu 2YT-antibiotiques. La culture a été incubée à 37°C jusqu'à ce que la DO_{600nm} ait atteint une valeur de 0,8. La surproduction des protéines CCA1, CCA2, CCC1 et CCC2 a été induite par ajout d'IPTG à une concentration finale de 0,2 mM. La surproduction a été menée à 22°C sur la nuit dans tous les cas.

Les bactéries sont récoltées après une étape de centrifugation à $5800 \times g$ pendant 10 min. Le culot bactérien a ensuite été lavé avec 30 mL d'une solution de NaCl à 10 g.L^{-1} . Il pouvait être utilisé immédiatement ou conservé à -20°C pour une purification ultérieure.

4.2. Extraction :

Le culot bactérien a été repris dans 12 mL de tampon A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 200 mM, β -mercaptoéthanol 10 mM et $MgCl_2$ 0,5 mM) et les cellules ont été lysées par sonication (sonicateur Vibracell Bioclock, modèle 72412). Les cellules issues d'une surproduction de 3 h ont été lysées par 3 cycles de sonication de 10 min à une amplitude de 30 % avec une séquence de pulsations de 4 secondes suivie de 2 secondes d'interruption. Un cycle supplémentaire était nécessaire pour les culots bactériens provenant d'une surproduction sur la nuit. Durant cette étape de sonication, la suspension bactérienne était maintenue dans la glace.

Le sonicat a ensuite été ultracentrifugé à $200,000 \times g$ pendant 30 min à 4°C (centrifugeuse Beckman TL-100), afin de séparer la fraction non soluble (culot) de la fraction soluble (surnageant).

4.3. Purification par chromatographie d'affinité :

Toutes les protéines produites au cours de ce travail possédaient une étiquette 6×histidine (His_6) en N- ou C-terminal permettant ainsi leur purification par chromatographie sur nickel-nitrilotriacétate (Ni^{2+} -NTA)-agarose.

La fraction soluble issue de l'ultracentrifugation a été incubée avec 2 mL de Ni-NTA-agarose (Qiagen), préalablement lavé avec 10 volumes d'eau, puis équilibré avec 10 volumes de tampon A contenant 10 mM d'imidazole, sous agitation rotative douce pendant 30 min à 4°C. Le surnageant correspondant à la fraction non retenue (ou *Flow-Through*, FT) a été éliminé par une étape de centrifugation. Trois lavages (en batch) d'une durée de 20 min à 4°C ont ensuite été effectués avec 10 volumes de tampon A contenant 20 mM d'imidazole, afin d'éliminer les protéines ayant une faible affinité pour le Ni-NTA-agarose. En fonction de la protéine traitée, le troisième lavage a pu être effectué avec 40 mM d'imidazole. Le polymère était ensuite transféré sur colonne pour procéder à l'élution de la protéine d'intérêt. Celle-ci était décrochée par 5 éluions de 2 mL chacune avec du tampon A contenant 200 mM d'imidazole. Une aliquote de chaque fraction de purification a été analysée sur un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes et réductrices (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970), afin de déterminer dans quelles fractions se trouvait la protéine d'intérêt et d'en évaluer le niveau de pureté. Les fractions contenant la protéine d'intérêt ont été regroupées et dessalées par une étape de dialyse sur la nuit contre 100 volumes de tampon A.

4.4. Purification par chromatographie d'exclusion stérique :

Suite à l'étape de dessalage, la protéine purifiée a subi une étape de purification supplémentaire par chromatographie d'exclusion stérique. Cette technique de chromatographie permet de séparer les biomolécules selon leur taille et leur forme. L'objectif était d'éliminer les éventuels contaminants résiduels afin d'obtenir une solution protéique la plus pure possible. Cette seconde étape de purification a été réalisée à l'aide d'un système automatisé de type Äkta Prime (©GE Healthcare) sur une colonne Hi-Load 16/600 Superdex S200 (©GE Healthcare) dans la majorité des cas, équilibrée avec un volume de colonne (environ 120 mL) de tampon A filtré et dégazé. En fonction de la protéine purifiée, le tampon A pouvait contenir 0,5 mM de MgCl₂ et 5 % de glycérol.

La colonne a été préalablement calibrée avec différents composants purifiés de masses moléculaires connues dont les temps de rétention sont présentés dans le **tableau 8**.

Tableau 8 : Identités, masses moléculaires et temps de rétention des composés utilisés pour la calibration de la colonne Hi-Load 16/600 Superdex S200.

Composé	Masse moléculaire (Da)	Temps de rétention (min)
Bleu Dextran	2.10 ⁶	46
Conalbumine	75.10 ³	75
Ovalbumine	45.10 ³	81
Anhydrase carbonique	29.10 ³	88
Ribonucléase	13,7.10 ³	97
Aprotine	6,5.10 ³	106
Tyrosine	181	119

L'échantillon, composé des fractions d'élution issues de la chromatographie d'affinité dialysées puis concentrées sur une membrane de seuil de coupure de 10 kDa (Amicon Ultra, Millipore ou Visvaspin Hydrasart, Sartorius), a été injecté sur la colonne et le débit était fixé à 1 mL.min⁻¹. Des fractions de 1,5 mL ont été collectées et celles correspondant au pic d'élution de la protéine d'intérêt (déterminé grâce à la calibration de la colonne) ont été analysées sur un gel SDS-PAGE à 12 % afin d'en contrôler la pureté. Les fractions contenant la protéine d'intérêt ont ensuite été concentrées sur une membrane de seuil de coupure de 10 kDa jusqu'à l'obtention de la concentration souhaitée.

4.5. Purification par chromatographie échangeuse de cations :

Le principe de cette chromatographie est de retenir, sur une colonne chargée négativement, seulement les biomolécules chargées positivement.

La chromatographie échangeuse de cations n'a été testée qu'une fois, sur la colicine-chimère CCA1. Avant cette étape, la protéine avait été purifiée par chromatographie d'affinité soit en tampon A, soit en tampon B de composition HEPES 20 mM, pH 6,2, NaCl 50 mM et β-mercaptoéthanol 10 mM, qui permet d'augmenter la charge globale positive de la protéine CCA1 (pI = 8,4), par rapport au tampon A qui a un pH de 7,4.

Les fractions d'élution issues de la chromatographie d'affinité et dialysées ont été diluées 4 fois dans le tampon A ou le tampon B sans NaCl ni MgCl₂. Cette fraction protéique diluée était ensuite chargée sur la colonne échangeuse de cations (Hi-Load SP-FF, ©GE Healthcare ; volume de colonne =

5 mL) préalablement lavée avec 5 volumes de colonne d'eau distillée, puis équilibrée avec 5 volumes de colonne de tampon A ou B sans NaCl ni MgCl₂. Les protéines de charge globale positive fixées sur la colonne ont ensuite été éluées par un gradient discontinu de NaCl de 50 à 400 mM. Une aliquote de chaque fraction d'éluion a finalement été déposée sur un gel SDS-PAGE afin de déterminer dans lesquelles se trouvait la protéine d'intérêt.

4.6. Purification des protéines produites en corps d'inclusion :

Certaines protéines étudiées au cours de ce travail ont été produites majoritairement sous une forme insoluble, en formant des corps d'inclusion. Afin d'obtenir le maximum de protéine sous une forme soluble, une tentative de renaturation des corps d'inclusion a été entreprise selon deux méthodes : par dilution ou par dialyse.

4.6.1. Solubilisation des corps d'inclusion :

Un culot cellulaire issu d'une culture bactérienne de 500 mL ayant surproduit la protéine d'intérêt a été repris dans 12 mL de tampon A ou B. Les cellules ont été lysées par deux cycles de sonication selon le protocole décrit précédemment. Les corps d'inclusion ont été isolés du sonicat par une étape de centrifugation à 5800 × *g* pendant 10 min. Le culot de centrifugation, contenant les corps d'inclusion, a été repris dans 4 mL d'urée 8 M. L'urée est un agent chaotropique qui permet une dénaturation complète, mais réversible, des protéines produites sous forme de corps d'inclusion. La suspension a alors été incubée, ou non, pendant 1 h à température ambiante sous agitation rotative agitation douce, puis centrifugée à 10 000 × *g* pendant 10 min afin d'éliminer les débris cellulaires non solubilisés. Les protéines dénaturées contenues dans le surnageant de centrifugation ont ensuite été renaturées selon deux protocoles alternatifs :

4.6.2. Renaturation par dilution :

Dans ce protocole, le surnageant a été dilué cinquante fois dans du tampon A ou B. Lors de cette étape, le tampon a été supplémenté, ou non, en L-arginine à 0,4 M et/ou en glycérol à hauteur de 10 %, pour aider au repliement correct de la protéine (Yamaguchi *et al.*, 2013; Yamaguchi et Miyazaki, 2014). La solution a été incubée sous agitation rotative douce à différentes températures (4°C ou température ambiante) et la durée d'incubation a également été modulée (30 min, 4 h ou sur la nuit). La protéine en principe restructurée a ensuite été purifiée par chromatographie d'affinité selon le protocole décrit précédemment.

4.6.3. Renaturation par dialyse :

La renaturation par dialyse n'a été testée qu'une fois, sur la protéine CCA1. Dans ce protocole de renaturation, la solution contenant la protéine préalablement dénaturée a dans un premier temps été dialysée contre 100 volumes de tampon B contenant 4 M d'urée pendant 2 h à 4°C, puis contre 100 volumes de tampon B pendant une nuit à 4°C. Une telle renaturation par dialyse en deux étapes permet de diminuer progressivement la concentration en urée afin de favoriser la renaturation de la protéine. La protéine en principe restructurée a ensuite été purifiée par chromatographie d'affinité selon le protocole décrit précédemment.

5. Dosage des protéines :

Les valeurs théoriques des coefficients d'extinction molaire et les masses moléculaires des protéines étudiées dans ce travail ont été déterminées à l'aide de l'application *protparam* disponible sur le portail ExpASy (<https://www.expasy.org/>) (Gasteiger *et al.*, 2003).

5.1. Détermination de la concentration protéique par spectrophotométrie microvolume :

Dans la majorité des cas, la concentration des protéines a été déterminée au nanodrop 1000 (ThermoScientific). Le nanodrop mesure la concentration protéique en se basant sur la loi de Beer-Lambert : $A = \epsilon l C$ (où A est l'absorbance mesurée à 280 nm, ϵ le coefficient d'extinction molaire en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$, l l'épaisseur traversée en cm, et C la concentration de la protéine en $mol \cdot L^{-1}$), et la convertit en $mg \cdot mL^{-1}$. Avant toute mesure, un témoin négatif était réalisé avec le tampon dans lequel la protéine a été dialysée. Plusieurs mesures de concentrations ont été effectuées et moyennées. L'avantage du nanodrop est qu'il nécessite un très faible volume de solution protéique (2 μL) pour la mesure.

5.2. Détermination de la concentration protéique par analyse en acides aminés :

Lorsque la concentration protéique était trop faible pour pouvoir être mesurée à l'aide du nanodrop ($C < 0,1 mg \cdot mL^{-1}$), une analyse quantitative en acides aminés après hydrolyse acide a été effectuée afin de déterminer avec le maximum de précision la concentration de la protéine. Les échantillons étaient d'abord totalement hydrolysés en tubes scellés (HCl 6 M contenant 0,05 % de β -mercaptoéthanol, 105°C, 24 h), puis séchés sous vide en présence d'un agent desséchant (P_2O_5) et d'hydroxyde de potassium. Repris dans un tampon citrate de sodium à 67 mM et à pH 2,2, les hydrolysats ont été injectés dans l'analyseur Hitachi L-8800 (ScienceTEC). Les acides aminés issus de l'hydrolyse totale des protéines y ont été séparés sur une colonne échangeuse d'ions, puis détectés en utilisant la ninhydrine comme réactif post-colonne. Un mélange standard de 2 nmoles de chaque acide aminé (Ajinomoto-Takara Corporation) a été utilisé au préalable pour la calibration.

6. Protéolyse ménagée :

Dans le but d'obtenir une forme tronquée en N-terminal de la protéine PaeM, des essais de protéolyse ménagée ont été menés. Cette technique permet l'hydrolyse partielle des protéines par des enzymes protéolytiques qui coupent les protéines en peptides et les peptides en acides aminés.

Ces essais de protéolyse de protéolyse ménagée sur la protéine PaeM ont été réalisés avec trois protéases différentes : la trypsine (qui coupe après les résidus arginine ou lysine), la chymotrypsine (qui coupe après les résidus phénylalanine, tyrosine, tryptophane, méthionine ou leucine) et la protéinase K (qui coupe en aval des acides aminés possédant une chaîne latérale hydrophobe ou aromatique). Pour cela, la PaeM (15 μg) a été incubée en présence de l'une des trois protéases dans un mélange réactionnel de 50 μL . Différents rapports molaires PaeM/protéase (5:1, 10:1 ou 100:1), différentes températures (20°C, 30°C ou 37°C) et différents temps d'incubation (30 ou 60 min) ont été testés. A l'issue de la digestion, les différentes fractions ont été analysées sur un gel SDS-PAGE afin d'observer les profils de digestion.

7. Synthèse de substrats lipidiques et production d'un analogue du produit de réaction :

7.1. Synthèse et purification de C₅₅-PP-MurNAc(-pentapeptide)-[¹⁴C]GlcNAc :

Le lipide II classique (avec une chaîne lipidique à 55 atomes de carbone) radiomarqué est le substrat utilisé en routine pour la réalisation des tests d'activité *in vitro* de la ColM et de ses homologues. Il a été produit par une synthèse enzymatique. Le mélange réactionnel (volume final = 100 µL) était composé de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, MgCl₂ 40 mM, Triton X-100 0,75 %, UDP-MurNAc-L-Ala-γ-D-Glu-*meso*-A₂pm-D-Ala-D-Ala 210 µM, C₅₅-P 200 µM et UDP-[¹⁴C]GlcNAc 200 µM (40,7 kBq). La réaction de synthèse a été initiée par l'ajout de MraY de *Bacillus subtilis* purifiée (6 µg) (Bouhss *et al.*, 2004) et de MurG d'*E. coli* purifiée (6 µg) (Crouvoisier *et al.*, 1999). Le mélange a été incubé pendant 20 h à 37°C sous agitation (Thermomixer, Eppendorf). La réaction a été suivie par chromatographie sur couche mince, et des ajouts d'enzymes ont régulièrement été réalisés dans le milieu réactionnel en fonction de l'avancement de la réaction.

A l'issue de la synthèse, le lipide II a été purifié par une extraction au butanol et à l'acétate de pyridinium. Pour cela, 2 volumes de butanol et 1 volume d'acétate de pyridinium (6 M, pH 4,2) ont été ajoutés au mélange réactionnel. La solution obtenue a été mélangée au vortex pendant 3 min, puis centrifugée à 16 000 × *g* pendant 3 min. A l'issue de la centrifugation, la solution était constituée de deux phases : la phase inférieure correspondait à la phase aqueuse, contenant l'acétate de pyridinium, et la phase supérieure correspondait à la phase organique, contenant le butanol, dans lequel se trouvait le lipide II. En effet, comme il possède une chaîne lipidique à 55 atomes de carbone, il est soluble dans des solvants organiques. Cette phase supérieure a été mise de côté, et 1 volume de butanol a été ajouté à la phase inférieure. Ce nouveau mélange a été agité au vortex pendant 3 min et centrifugé comme précédemment. A l'issue de cette centrifugation, les deux phases butanoliques ont été regroupées et lavées avec 1 volume d'eau et 1 volume d'acétate de pyridinium (6 M, pH 4,2). Le mélange obtenu a été agité au vortex pendant 3 min et centrifugé à 16 000 × *g* pendant 3 min. La phase aqueuse a été éliminée et l'étape de lavage a été répétée une seconde fois. A l'issue des étapes de purification, les différentes fractions ont été analysées par chromatographie sur couche mince afin de vérifier la pureté du lipide II synthétisé.

7.2. Synthèse et purification de lipides II solubles :

7.2.1. à partir de néryl phosphate (C₁₀-P) :

Le lipide II en C₁₀ a été produit par une synthèse enzymatique comme le lipide II classique, sauf que les concentrations des nucléotides-sucres dans le mélange réactionnel étaient différentes et que du néryl phosphate était utilisé à la place de l'undécaprényl phosphate. Le mélange réactionnel (100 µL) était composé de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, MgCl₂ 40 mM, Triton X-100 0,75 %, UDP-MurNAc-L-Ala-γ-D-Glu-*meso*-A₂pm-D-Ala-D-Ala 150 µM, C₁₀-P 100 µM et UDP-[¹⁴C]GlcNAc 100 µM (20,4 kBq). La réaction de synthèse a été initiée par l'ajout de MraY d'*Aquifex aeolicus* purifiée (6 µg) (Chung *et al.*, 2013) et par l'ajout de MurG d'*E. coli* purifiée (6 µg) (Crouvoisier *et al.*, 1999). Le mélange réactionnel a été incubé pendant 20 h à 37°C sous agitation. La réaction a été suivie par chromatographie sur couche mince et là aussi, des ajouts d'enzymes ont régulièrement été effectués dans le milieu en fonction de l'avancement de la réaction.

7.2.2. à partir de farnésyl pyrophosphate (C₁₅-PP) :

Le lipide II en C₁₅ a également été produit par une synthèse enzymatique, à la fois sous une forme radiomarquée et sous une forme non radiomarquée. Différents essais de synthèse ont été effectués afin d'optimiser le rendement. La forme radiomarquée du lipide II en C₁₅ a donc été utilisée initialement pour suivre et adapter les conditions de synthèse.

Le mélange réactionnel (100 µL) utilisé lors des premiers essais était identique à celui utilisé pour la synthèse du lipide II en C₁₀. Seul le C₁₀-P était remplacé par du C₁₅-PP. Pour être pris en charge par MraY, il faut que le lipide soit sous une forme monophosphorylé. Pour cela, le mélange réactionnel était incubé avec l'undécaprényl pyrophosphate phosphatase PgpB purifiée d'*E. coli* (3,5 µg) (Touzé et al., 2008) pendant 15 min à 37°C sous agitation avant l'ajout des enzymes permettant d'initier la synthèse du lipide II.

La littérature a montré que l'augmentation de la quantité de C₁₅-P dans un mélange réactionnel, utilisé pour la synthèse de lipide I soluble fluorescent, augmentait de manière significative le rendement (Mitachi *et al.*, 2015). Dans cette expérience, il est montré que l'ajout de 3 équivalents de C₁₅-P pour 1 équivalent d'UDP-MurNAc-pentapeptide fluorescent augmentait le rendement de synthèse du lipide I.

La composition du mélange réactionnel a donc été adaptée pour maximiser la quantité de lipide II en C₁₅ produit. La concentration de l'ensemble des substrats a été augmentée et 2,5 équivalents de C₁₅-PP (par rapport à l'UDP-MurNAc-pentapeptide) ont été ajoutés dans le mélange réactionnel dont la composition finale était la suivante : Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, MgCl₂ 40 mM, Triton X-100 0,75 %, UDP-MurNAc-L-Ala-γ-D-Glu-*meso*-A₂pm-D-Ala-D-Ala 600 µM, C₁₅-PP 1,5 mM, UDP-GlcNAc 500 µM (10,2 kBq). La réaction de synthèse a été initiée par l'ajout dans le mélange réactionnel de MraY d'*Aquifex aeolicus* purifiée (6 µg) et de MurG d'*E. coli* purifiée (6 µg). Des ajouts d'enzymes ont régulièrement été effectués au cours de la réaction.

Pour la synthèse du lipide II en C₁₅ non radiomarqué, la composition du mélange réactionnel était identique à celle du mélange réactionnel optimisé décrit précédemment.

Ce lipide II à chaîne lipidique en C₁₅ a finalement été purifié par HPLC (en plusieurs injections) sur une colonne Nucleosil C18 (5 µm, 250 × 4,6 mm). Cette purification, suivie à 210 et 254 nm, a été réalisée par un gradient continu de méthanol (de 0 à 60 %) dans un tampon de phosphate de sodium 50 mM à pH 4,5, mené sur 90 min à un débit de 0,5 mL.min⁻¹. Dans ces conditions, le lipide II en C₁₅ possède un temps de rétention (Tr) de 80 min. Lors de chaque injection, le produit correspondant au pic sortant à ce Tr a été récolté et les différentes fractions collectées ont été rassemblées et séchées sous vide, reprises dans 600 µL d'eau et la concentration en lipide II a été déterminée par une analyse d'acides aminés selon le protocole décrit précédemment (cf § 5.2) ; afin de limiter la dégradation de l'acide muramique et de la glucosamine dans les conditions d'hydrolyse acide, la température était de 95°C pour une durée de 16 h.

7.3. Préparation et purification du 1-PP-MurNAc-pentapeptide :

Le 1-PP-MurNAc-pentapeptide, analogue du produit de réaction soluble 1-PP-MurNAc(-pentapeptide)-GlcNAc généré par l'activité enzymatique de ColM et ses orthologues, a été obtenu par oxydation de l'UDP-MurNAc-pentapeptide au métapériodate de sodium suivie d'une réaction de β-élimination (**Figure 59**) (Lowe *et al.*, 1979; Lowe and Beechey, 1982a, 1982b). Pour ce faire, 1 volume d'UDP-MurNAc-pentapeptide à 10 mM a été mélangé à 1 volume de métapériodate de sodium à 200 mM (volume réactionnel = 200 µL) et placé pendant 30 min à 35°C sous agitation (300 rpm) et à

l'obscurité. Puis 15 μL de NaOH 1M ont été ajoutés au mélange, qui a de nouveau été laissé à 35°C sous agitation durant 16 h. A l'issue de cette incubation, 20 μL de glycérol à 50% ont été ajoutés afin de neutraliser l'excès de métapériodate.

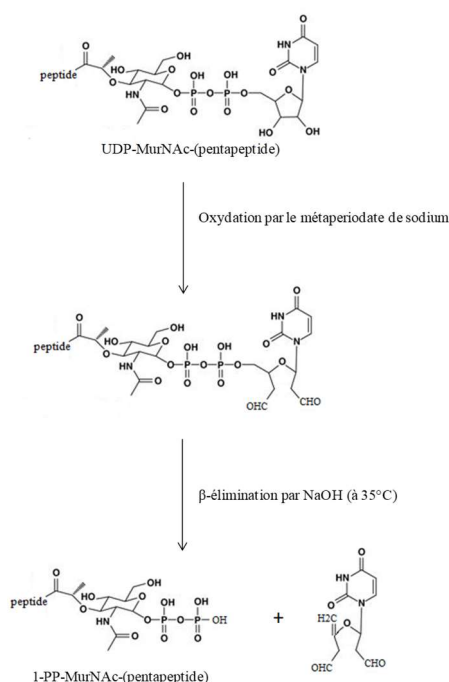


Figure 59 : Oxydation de l'UDP-MurNAc-pentapeptide par le métapériodate de sodium pour l'obtention de l'analogue de produit de réaction 1-PP-MurNAc-pentapeptide (d'après Lowe et Beechey, 1982b).

La purification du 1-PP-MurNAc-pentapeptide a été réalisée par HPLC à 207 nm sur une colonne de Nucleosil C18, en tampon de phosphate de sodium 50 mM à pH 4,5 pendant 30 min, suivi d'un gradient linéaire de méthanol (de 0 à 20%) dans ce même tampon durant les 30 min suivantes. Dans ces conditions, à un débit de 0,6 mL.min⁻¹, le 1-PP-MurNAc-pentapeptide présente un Tr d'environ 25 minutes. Le produit correspondant au pic sortant à ce Tr a été récolté, puis dessalé sur la même colonne, en utilisant un gradient de méthanol (de 0 à 50% en 50 min) dans du TFA à 0,05%, à un débit de 0,6 mL.min⁻¹ (Tr \approx 27 min). Le produit récolté a finalement été lyophilisé, puis quantifié par une analyse en acides aminés (**cf § 5.2**) ; afin de limiter la dégradation de l'acide muramique dans les conditions d'hydrolyse acide, la température était de 95°C pour une durée de 16 h.

8. Spectrométrie de masse MALDI-TOF :

8.1. Analyses du lipide II en C₁₅ et du 1-PP-MurNAc-pentapeptide

Suite à leur purification, le lipide II en C₁₅ et le 1-PP-MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala ont été analysés par spectrométrie de masse.

Le lipide II en C₁₅ lyophilisé a été préalablement repris par un volume approprié d'un mélange méthanol/eau 2:1 (v/v) de façon à obtenir une solution à 320 μM . Ensuite, 1 μL de matrice (solution de 6-aza-2-thiothymine (ATT) à 10 mg.mL⁻¹ dans l'acide citrique 0,1M) a été déposé sur la plaque, suivi par différents volumes du lipide II en C₁₅ (0,2, 0,3, 0,5 ou 1 μL). Le 1-PP-MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala lyophilisé a été, lui, repris dans l'eau de façon à obtenir une solution à 500 μM . Ensuite, 1 μL de matrice (solution d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) à 10 mg.mL⁻¹ dans le citrate de

diammonium 20 mM) a été déposé sur la plaque, suivi par différents volumes de 1-PP-MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala (0,5 ou 1 μ L).

Après évaporation des solvants, la désorption et l'ionisation des composés ont été obtenues en irradiant les échantillons au moyen du laser pulsé. Les spectres d'ionisation ont été enregistrés avec une tension d'accélération de - 20 kV. Les spectres MALDI-TOF ont été enregistrés sur un appareil Biotech Axima Performance (Shimadzu), équipé d'un laser à azote à 337 nm, en mode linéaire négatif. L'acquisition et le traitement des données ont été effectués avec le logiciel Biotech Launchpad 2.9.1 (Shimadzu) avec l'aide du Dr. Luis Augusto de l'équipe Endotoxines, Structures et Réponses de l'hôte. Pour chacun des composés, une calibration externe a été effectuée au préalable en prenant les rapports masse/charge (m/z) des pics $[M-H]^-$ issus d'un mélange d'UDP-MurNAc, d'UDP-MurNAc-dipeptide et d'UDP-MurNAc-pentapeptide.

8.2. Analyse de la protéine PcaM1 :

Une analyse par spectrométrie de masse a également été effectuée pour la protéine PcaM1. Pour cela, la protéine a préalablement été dessalée et concentrée sur ZipTip C₄ (Millipore) selon les recommandations du fabricant, de façon à la recueillir dans 10 μ L d'acétonitrile à 70 % contenant 0,1 % de TFA. Ensuite, 1 μ L de matrice (solution d'acide sinapinique à 10 mg.mL⁻¹ dans le TFA 0,1 % / acétonitrile 7:3 (v/v)) a été déposé sur la plaque. Différents volumes de la protéine PcaM1 (0,3, 0,5 ou 1 μ L) ont alors été déposés sur la matrice d'acide sinapinique. Après évaporation des solvants, la désorption et l'ionisation ont été obtenues en irradiant l'échantillon au moyen du laser pulsé. Les spectres d'ionisation ont été enregistrés avec une tension d'accélération de + 25 kV et un temps de retard d'extraction de 300 ns. Les spectres MALDI-TOF ont été enregistrés sur un Instrument PerSeptive Voyager DE-STR (Applied Biosystems), équipé d'un laser à azote à 337 nm, en mode linéaire avec extraction retardée. L'acquisition et le traitement des données ont été effectués avec le logiciel Data Explorer (Applied Biosystems) par le Dr. Didier Blanot. Une calibration externe a été effectuée au préalable en prenant les rapports m/z des pics $[M+H]^+$ et $[M+2H]^{2+}$ de l'anhydrase carbonique.

9. Détermination des activités enzymatiques et cytotoxiques des protéines purifiées :

9.1. Evaluation de l'activité enzymatique :

L'activité enzymatique des différents homologues de ColM a été déterminée *in vitro* par la quantification de la dégradation du lipide II classique dans un mélange réactionnel (10 μ L) contenant 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 20 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 10 mM β -mercaptoéthanol, 12,6 μ M C₅₅-PP-MurNAc(-pentapeptide)-[¹⁴C]GlcNAc, et 0,2 % de *n*-dodecyl- β -D-maltopyranoside (DDM), selon un protocole mis au point et optimisé au laboratoire (El Ghachi *et al.*, 2006; Barreteau *et al.*, 2009b). La réaction a été initiée par l'addition d'un volume d'enzyme de 5 μ L (dilué ou non de façon à n'avoir jamais plus de 30 % d'hydrolyse du substrat à l'issue de la réaction) et le mélange a été incubé pendant 30 min à 37°C sous agitation (Thermomixer, Eppendorf). La réaction a été arrêtée par une étape de chauffage de 2 min à 95°C.

Pour la détermination de la constante de Michaelis (K_m), les conditions du test étaient identiques à celles décrites précédemment, à l'exception de la concentration du lipide II qui variait de 6 à 100 μ M.

Dans tous les cas, le substrat et son produit de dégradation soluble (1-PP-MurNAc(-pentapeptide)-GlcNAc, ont été séparés par chromatographie sur couche mince sur des plaques de silice (Merck), avec une phase mobile composée de propanol-1/ammoniaque/eau (6:3:1 ; v/v/v). La quantification de la radioactivité a été réalisée à l'aide d'un scanner de radioactivité (Rita Star, Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH). Dans ces conditions, le lipide II radiomarqué et son produit de dégradation soluble étaient nettement séparés, leurs Rf étant respectivement de 0,7 et de 0,3.

9.2. Recherche de ligand de la protéine PaeM :

Pour identifier un ligand potentiel, l'activité enzymatique de PaeM a été quantifiée en présence de différents ligands potentiels ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, C₅-PP, C₁₅-PP, C₅₅-PP et UDP-MurNAc-pentapeptide) à une concentration finale de 1 mM et comparée à celle de la protéine en absence de ligand, selon le protocole décrit précédemment.

9.3. Evaluation de l'activité cytotoxique :

Différents tests de détermination d'activité *in vivo* ont été effectués sur les souches d'*E. coli* suivantes : DH5 α , BW25113, BW25113 $\Delta fkpA$, BW25113 $\Delta fhuA$, BW25113 $\Delta tonB$, et FB8.

9.3.1. Détermination de l'activité cytotoxique en milieu solide :

9.3.1.1. Par apparition de halo de lyse :

L'activité des différentes protéines d'intérêt a été déterminée en milieu solide (2YT) recouvert d'une gélose molle (3 mL)ensemencée avec la souche d'*E. coli* considérée (100 μL d'une culture de nuit) de façon à obtenir un tapis bactérien.

Des dépôts de 4 μL des différentes suspensions protéiques (diluées ou non) ont alors été réalisés sur les boîtes ainsi ensemencées, qui étaient ensuite incubées pendant une nuit à 37°C. L'activité cytotoxique de la protéine considérée était détectée par l'apparition, à l'endroit du dépôt initial, d'une plage de lyse, dont le diamètre a été mesuré.

9.3.1.2. Par dénombrement sur boîte :

L'activité cytotoxique des protéines PcaM1 sauvage et du mutant D222A suite à leur expression périplasmique au sein d'une souche d'*E. coli* FB8 a été évaluée par dénombrement sur boîte. Après induction de l'expression à $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,2$ avec de l'anhydrotétracycline à 200 ng.mL^{-1} , des échantillons ont été collectés toutes les 20 min et étalés sur milieu gélosé après une dilution appropriée. Les boîtes ont été incubées une nuit à 37°C et les colonies ont été dénombrées. Le dénombrement a été effectué pour des souches où l'expression des protéines PcaM1 et PcaM1 D222A était induite ou non.

9.3.1.3. Détermination de l'activité cytotoxique par expression périplasmique :

Les différents plasmides dérivés du vecteur pASK-IBA4 construits pour l'expression périplasmique de protéines ont été transformés dans différentes souches d'*E. coli* et les souches

résultantes ont été cultivées en milieu 2YT-ampicilline à 37°C sous agitation. A $DO_{600nm} = 0,2$, l'inducteur anhydrotétracycline (AHT) a été ajouté dans le milieu à différentes concentrations (0 à 400 $ng.mL^{-1}$) afin de permettre l'expression périplasmique des différentes protéines. La croissance bactérienne a alors été suivie à intervalles réguliers par mesure de la DO à 600 nm.

10. Analyses physiologiques :

10.1. Suivi d'incorporation de l' A_2pm dans le peptidoglycane :

La souche d'*E. coli* FB8 $\Delta lysA$, transformée par les plasmides pMLD381 ou pMLD395, et exprimant donc les protéines PcaM1 WT ou PcaM1 D222A a été cultivée dans 30 mL de milieu minimum M63 supplémenté avec 0,4 % de glucose et 100 $\mu g.mL^{-1}$ de lysine, de méthionine et de thréonine (Mengin-Lecreux *et al.*, 1989; El Ghachi *et al.*, 2006). A $DO_{600nm} = 0,2$, les cellules ont été additionnées d'AHT à 100 $ng.mL^{-1}$ afin d'induire l'expression des protéines, puis de *meso*- $[^{14}C]A_2pm$ (0,2 $kBq.mL^{-1}$) 10 minutes plus tard. L'internalisation du *meso*- $[^{14}C]A_2pm$ dans les cellules et son incorporation dans la voie de biosynthèse du peptidoglycane ont ensuite été suivies selon un protocole précédemment utilisé au laboratoire (El Ghachi *et al.*, 2006). Des prélèvements, correspondant à 1 mL de culture, ont été effectués régulièrement au cours du temps et ont été dilués dans 10 mL d'acide trichloroacétique (TCA) à 5 % à 4°C. Ce mélange a été conservé sur la glace pendant 60 min et le peptidoglycane radiomarqué, insoluble dans le TCA, a été récupéré par filtration sur disques de Whatman GF/C. Ces filtres ont été lavés avec du TCA 5 % et transférés dans des fioles à scintillations. Après addition de 2 mL d'eau et de 13 mL de scintillant (Unisafe 1 scintillator, Zinsser Analytic), la radioactivité a été quantifiée à l'aide d'un compteur à scintillation (Hidex 300SL).

10.2. Analyse de la distribution cellulaire du *meso*- A_2pm :

La souche FB8 $\Delta lysA$, transformée par les plasmides pMLD381 ou pMLD395, a été cultivée comme décrit ci-dessus dans 50 mL de milieu M63 supplémenté avec le glucose et les trois acides aminés lysine, méthionine et thréonine. A $DO_{600nm} = 0,2$, l'AHT a été ajoutée dans le milieu à une concentration finale de 100 $ng.mL^{-1}$, puis le *meso*- $[^{14}C]A_2pm$ 20 min plus tard. Après 30 min de marquage, les cultures ont été rapidement refroidies dans un bain de glace puis les cellules ont été collectées par centrifugation et les culots cellulaires alors repris dans 3 mL d'eau bouillante. Après 15 min à 100°C, la suspension a été refroidie dans la glace et centrifugée à $200\ 000 \times g$ pendant 20 min. Le surnageant a été récupéré puis lyophilisé. Le résidu sec et le culot de l'étape précédente ont tous deux été repris dans 250 μL d'eau et la radioactivité présente dans ces deux fractions a été quantifiée. Le culot, correspondant à la fraction insoluble, contient le peptidoglycane ainsi que les intermédiaires lipidiques (lipides I et II). La fraction soluble contient quant à elle le *meso*- $[^{14}C]A_2pm$ non incorporé ainsi que les précurseurs nucléotidiques (El Ghachi *et al.*, 2006). Ces deux fractions ont alors été analysées par chromatographie sur couche mince sur plaque de silice avec une phase mobile composée de propanol-1/ammoniaque/eau (6:3:1, v/v/v). Dans ces conditions, le peptidoglycane ne migre pas et reste au point de dépôt, tandis que les UDP-MurNAc-peptides, le *meso*- $[^{14}C]A_2pm$ et les intermédiaires lipidiques migrent avec des R_f respectifs de 0,35, 0,55 et 0,7. Lorsque l'expression périplasmique de PcaM1 WT a été induite, un pic additionnel correspondant à du 1-PP-MurNAc(-pentapeptide)-GlcNAc, le produit de dégradation du lipide II, a été observé à un R_f de 0,3.

10.3. Quantification des pools de pré-nols dans les membranes :

Les souches d'*E. coli* FB8 transformées par les plasmides pMLD381, pMLD395 et pMLD403, permettant respectivement l'expression périplasmique des protéines PcaM1, PcaM1 D222A et PcaM1 Δ 1-107 ont été ensemencées dans 100 mL de milieu 2YT-ampicilline. A $DO_{600nm} = 0,2$, la production des différents variants de PcaM1 a été induite par l'ajout dans le milieu d'AHT à une concentration finale de 200 ng.mL^{-1} . Environ 40 min après l'induction, chaque culture bactérienne a été divisée en deux échantillons de 50 mL, juste avant que la lyse bactérienne ne soit observée. Les cellules issues des deux échantillons ont été récoltées par centrifugation à $5800 \times g$ pendant 10 min à 4°C et les culots cellulaires lavés avec 30 mL de NaCl à 9 %. Ils ont ensuite été traités selon deux modes opératoires (Barreteau *et al.*, 2009a), adaptés des protocoles de Bligh et Dyer (Bligh et Dyer, 1959) et Kato et collaborateurs (Kato *et al.*, 1999), et couramment utilisés au laboratoire : le protocole de Bligh et Dyer permet de quantifier directement les pools de $C_{55}\text{-P}$ et $C_{55}\text{-OH}$ par une extraction au chloroforme/méthanol, tandis que le protocole de Kato permet de quantifier indirectement le pool de $C_{55}\text{-PP}$, toutes les molécules de $C_{55}\text{-PP}$ étant converties en $C_{55}\text{-P}$ grâce à une réaction d'hydrolyse alcaline.

Les phases chloroformiques contenant les différents prényls ($C_{55}\text{-PP}$, $C_{55}\text{-P}$ et $C_{55}\text{-OH}$) ont ensuite été séchées et analysées par HPLC. L'élution se fait par une phase mobile composée de propanol-2/méthanol (1:4, v/v), contenant 10 mM d'acide phosphorique, sur une colonne de Nucleosil C18 ($5 \mu\text{m}$, $250 \times 4,6 \text{ mm}$). Le débit était de $0,6 \text{ mL.min}^{-1}$ et les prényls ont été quantifiés à 210nm. Des standards commerciaux de $C_{55}\text{-P}$ et $C_{55}\text{-OH}$ ont préalablement été injectés dans les mêmes conditions afin de pouvoir réaliser la quantification.

10.4. Observations microscopiques :

Les cellules exprimant dans leur périplasme les protéines PcaM1 et PcaM1 D222A sont récoltées environ 40 min après l'induction de leur expression, juste avant que la lyse bactérienne ne soit observée. La croissance bactérienne est stoppée en refroidissant les cultures bactériennes dans la glace. L'aspect de ces cellules a alors été observé avec un microscope optique (DMIRE2, Leica) équipé d'une caméra CCD (CoolSNAP HQ2, Roper Scientific).

La préparation des lames et les manipulations microscopiques ont été réalisées par le Dr. Magali Prigent (Station d'Imagerie de l'I2BC).

11. Cristallogénèse :

11.1. Principe :

L'ensemble des essais de cristallisation ont été effectués en collaboration avec l'équipe « Fonction et Architecture des Assemblages Macromoléculaires » de l'I2BC dirigée par le Pr. Herman van Tilbeurgh.

Pour obtenir un cristal, il est nécessaire de diminuer la solubilité de la protéine afin de favoriser la formation d'interactions faibles entre les différentes molécules. Ces interactions permettent de passer d'un état soluble à un état solide. Si elles se font de manière ordonnée, alors un cristal se développera. En revanche, des interactions non spécifiques entraîneront la formation d'un précipité amorphe. Le passage de la phase soluble à la phase cristalline est favorisé par le changement des paramètres physico-chimiques de l'environnement. Expérimentalement, ces changements sont provoqués par la dilution de la protéine dans une solution de cristallisation composée d'agents cristallisants/précipitants et parfois de tampons et/ou d'additifs (sels, molécules chimiques...). Il est important de noter que la cristallogenèse est une approche empirique, et qu'il est impossible de prédire la composition de la solution permettant la formation d'un cristal pour une protéine donnée.

Dans les tests effectués au cours de ce travail, la technique de cristallisation par diffusion en phase vapeur (goutte assise ou goutte suspendue) a été utilisée. Dans cette technique, une goutte contenant la protéine et la solution de cristallisation est mise à s'équilibrer contre un réservoir rempli de solution de cristallisation. La concentration de l'agent cristallisant étant plus forte dans le réservoir qu'au sein de la goutte, cette dernière va s'évaporer pour atteindre la concentration de la solution du réservoir. Les concentrations en protéine et en agent cristallisant vont donc augmenter progressivement au cours du temps d'équilibrage, ce qui va conduire, si les conditions finales sont retrouvées dans la zone de nucléation, à l'apparition de cristaux. (**Figure 60**).

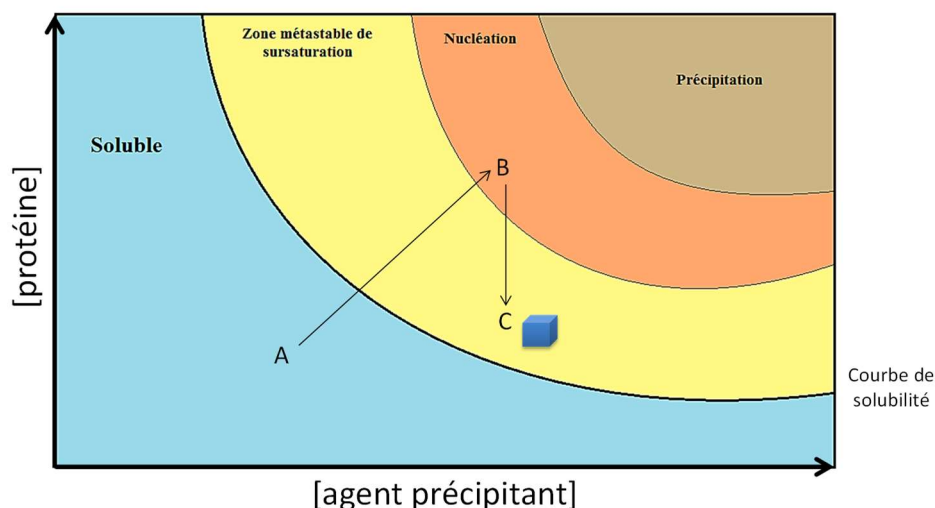


Figure 60 : Diagramme de phase. Le chemin permettant la formation d'un cristal est modélisé par les flèches. Le cristal formé est modélisé par un cube bleu. Les concentrations en agent précipitant et en protéine augmentent de manière simultanée lors de l'équilibrage de la goutte avec la solution du réservoir (A→B). La protéine se trouve alors dans la zone de nucléation (B), et la formation de germes cristallins est amorcée. Les molécules en solution participent à la croissance du cristal (B→C).

Pour pouvoir réaliser des essais de cristallisation, il faut que la solution protéique soit la plus pure possible. En effet, la présence de tout contaminant en quantité trop importante dans la goutte peut interférer avec la cristallisation, voire l'empêcher. Par conséquent, les protéines utilisées pour les

essais de cristallogenèse sont purifiées par chromatographie d'affinité, puis chromatographie d'exclusion stérique selon les protocoles décrits précédemment.

11.2. Criblage automatisé :

Les premiers essais de cristallisation ont été effectués par criblage, selon la technique de diffusion de vapeur en goutte assise dans des boîtes (TTP LabTech) de 96 puits, avec 3 cupules de dépôt par puits. Les solutions de cristallisation testées provenaient de différents kits commerciaux : Classics, Classics Lite, PEGs, PEGs II, JCSG+, AmSO₄, MbClass, Cryos et Protein Complex (Qiagen®). Les puits ont été remplis par le robot Genesis RSP (Tecan) avec 80 µL de solution provenant des kits. Les robots de pipetage Cartesian (Genomics solution) ou Mosquito (TTP Labtech) déposent dans les cupules 0,1 µL de ces solutions et 0,1 µL de solution protéique. Les trois cupules de dépôt permettent pour chaque condition de cristallisation, de tester trois concentrations croissantes de protéine. Les boîtes ont été scellées, puis stockées dans le robot de visualisation Rock Imager 182 (Formulatrix). La température au sein de ce robot était maintenue à 18°C.

11.3. Optimisation des conditions de cristallisation :

L'optimisation des pistes de cristallisation, obtenues suite au criblage automatisé, a été effectuée soit automatiquement, toujours en goutte assise dans des boîtes de 96 puits (TTP LabTech), soit manuellement par diffusion de vapeur en goutte suspendue dans des boîtes de 24 puits (Combo Plate™, Greiner). Dans ce dernier cas, chaque réservoir contenait 500 µL de solution de cristallisation et était recouvert d'une lamelle de verre siliconée, sous laquelle était suspendue une goutte constituée de 1 µL de solution de cristallisation et de 1 µL de la solution protéique. Des gradients à une ou deux dimensions ont été réalisés en faisant varier différents paramètres tels que la concentration en agent précipitant, la concentration en sels ou bien le pH.

11.4. Micro-ensemencement :

Afin d'augmenter la taille des cristaux et éventuellement leur qualité, du micro-ensemencement a été effectué pour la protéine PaeM Δ1-30. C'est une technique qui consiste à introduire au sein d'une goutte de cristallisation des germes cristallins de la protéine que l'on veut cristalliser. La présence de ces centres de nucléation va faciliter la cristallisation de la protéine autour de ces germes. Ces derniers sont obtenus par broyage de cristaux obtenus lors de précédents essais de cristallogenèse de la même protéine.

Pour la PaeM Δ1-30, des cristaux obtenus lors d'une optimisation manuelle ont été pêchés et déposés dans un tube contenant 100 µL de la solution de cristallisation du puits ainsi qu'une bille de verre. Cette dernière permet de broyer les cristaux lorsque la solution a été vortexée. La solution obtenue contenait alors des germes cristallins de la PaeM Δ1-30. Le micro-ensemencement a été réalisé lors d'un criblage automatisé, par la technique de diffusion de vapeur en goutte assise, sur les kits PEGs et PEGs II. Pour cela, 4 µL de la solution de micro-ensemencement (contenant les germes cristallins) a été diluée dans 40 µL de solution de la PaeM Δ1-30 purifiée à 3,2 mg.mL⁻¹. Les gouttes de cristallisation ont été formées à l'aide du robot Mosquito (TTP LabTech) et étaient constituées de 0,1 µL de solution protéique et de 0,1 µL de solution du puits.

Le micro-ensemencement a également été réalisé par diffusion de vapeur en goutte suspendue, dans des boîtes manuelles de 24 puits. Les gouttes étaient alors composées de 1 μ L de solution protéique contenant les germes cristallins et de 1 μ L de la solution du puits.

11.5. Essais de co-cristallisation et trempage des cristaux :

Dans le but d'obtenir une structure cristallographique en présence d'un ligand, des essais de co-cristallisation de deux formes protéiques de la Paem (Paem WT et Paem D241A) en présence de farnésyl pyrophosphate (C_{15} -PP) ont été menés. Le principe de la co-cristallisation est identique à celui de la cristallisation classique. La seule différence résidait dans la présence d'une molécule potentiellement capable d'interagir avec la protéine d'intérêt dans la goutte de cristallisation.

Les tests de co-cristallisation entre Paem WT et le C_{15} -PP ont été réalisés par un criblage automatique sur les kits commerciaux Classics, JCSG+, MbClass, PEGs et Protein Complex (Qiagen®). La solution protéique déposée dans les gouttes contenait la protéine Paem à 0,45 mM et le C_{15} -PP à 5 mM.

Les conditions testées pour la co-cristallisation entre Paem D241A et le C_{15} -PP correspondaient à l'optimisation d'une condition (Citrates de Na 0,02 M, NaH_2PO_4 0,1 M, pH 6,2, 15 % PEG 2000), ayant permis l'obtention de cristaux de la protéine Paem D241A seule. Un gradient en deux dimensions a été réalisé au sein duquel le pH variait de 5,8 à 7 sur 8 puits et la concentration en PEG 2000 variait de 10 à 20 % sur 6 puits. La solution protéique déposée dans les gouttes de cristallisation contenait respectivement la protéine Paem D241A à 0,46 mM ou 0,24 mM et le C_{15} -PP à 4,8 mM ou 3,2 mM.

Par la suite, certains cristaux de protéines obtenus ont été trempés dans une solution cryoprotectante supplémentée avec un autre ligand potentiel, avant congélation. Les cristaux obtenus pour la protéine Paem Δ 1-30 ont ainsi été trempés dans une solution cryoprotectante supplémentée avec 100 mM de pyrophosphate de sodium (Sigma) avant d'être congelés.

11.6. Collecte des données de diffraction et résolution de structure :

Les clichés de diffraction ont été acquis sur les lignes PROXIMA du synchrotron SOLEIL ou sur les lignes ID-23 et ID-29 du synchrotron de l'ESRF et ont été traités avec la suite logicielle XDS (Kabsch, 2010). Les modèles cristallographiques ont été obtenus grâce à la suite logicielle CCP4 (Winn *et al.*, 2011) par remplacement moléculaire de la protéine Paem (code PDB : 4G75) avec le programme Phaser (McCoy *et al.*, 2007) et affinées grâce aux programmes Refmac (Murshudov *et al.*, 2011) et Coot (Emsley *et al.*, 2010).

La collecte des données ainsi que la résolution des structures ont été réalisées par le Dr. Inès Gallay qui travaille au sein de l'équipe « Fonction et Architecture des Assemblages Macromoléculaires ».

12. Microcalorimétrie :

La calorimétrie repose sur le fait que toute réaction chimique implique une variation d'énergie, généralement accompagnée d'une libération (exothermique) ou d'une absorption (endothermique) de chaleur. La microcalorimétrie est utilisée pour l'étude de réactions impliquant des biomolécules et l'analyse d'interactions entre molécules (ITC) ou de changements de conformation tels que le repliement des protéines (DSC).

La microcalorimétrie a été utilisée au cours de ce travail pour détecter et déterminer les différents paramètres de l'interaction pouvant s'établir entre la protéine PaeM WT et le 1-PP-MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala. L'ensemble des expériences de microcalorimétrie a été effectué au sein de la plateforme de mesures des interactions macromoléculaires de l'I2BC, avec l'aide du Dr. Magali Aumont-Nicaise.

12.1. Titration par microcalorimétrie isotherme (ITC) :

La titration par calorimétrie isotherme est principalement dédiée à l'étude des interactions moléculaires. Il s'agit de la seule méthode permettant de mesurer une constante d'association (K_a) en solution sans avoir besoin de marquer les molécules. L'ITC permet de mesurer l'affinité entre deux composés ainsi que les paramètres thermodynamiques, tels que l'enthalpie (ΔH) ou l'entropie (ΔS), qui régissent cette interaction. Elle permet de mesurer l'énergie associée à l'interaction entre une protéine et un ligand (protéine, acide nucléique ou toute autre molécule chimique).

L'appareil de mesure est constitué d'une enceinte adiabatique qui contient deux cellules : une cellule de référence et une cellule de mesure. Dans la cellule de référence, on charge le tampon dans lequel la protéine et le ligand sont dissous. La cellule de mesure contient quant à elle la protéine d'intérêt. L'appareil possède également une seringue au sein de laquelle est chargé le ligand (**Figure 61**). Les deux cellules sont thermostatées à la température choisie. Pour effectuer une mesure, des injections multiples d'une petite quantité de ligand concentré sont effectuées dans la cellule de mesure à intervalles réguliers. La quantité d'énergie nécessaire pour maintenir la même température entre la cellule de référence et la cellule contenant la protéine après chaque injection est mesurée au cours du temps. La cellule de mesure est refroidie ou réchauffée pour revenir à la température initialement choisie. La série d'injections continue jusqu'à saturation. Les mesures ITC suivent le principe de la compensation de chaleur. La chaleur libérée ou absorbée à la suite de chaque injection est proportionnelle à l'aire de chaque pic enregistré (**Figure 62**).

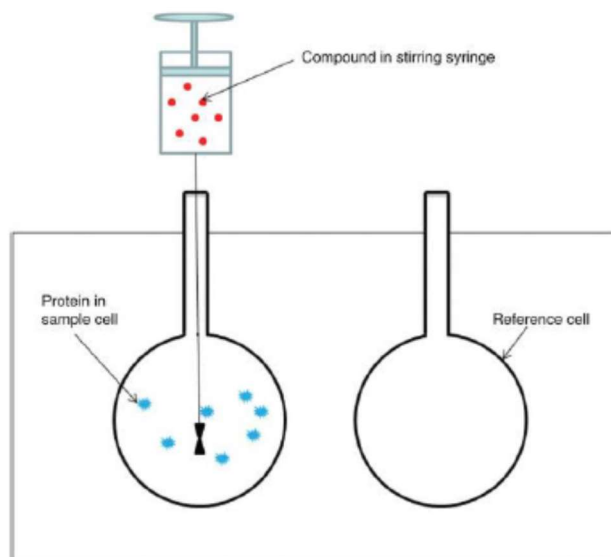


Figure 61 : Schéma d'un appareil d'ITC. La seringue contenant le ligand, la cellule de mesure contenant la protéine et la cellule de référence sont représentées.

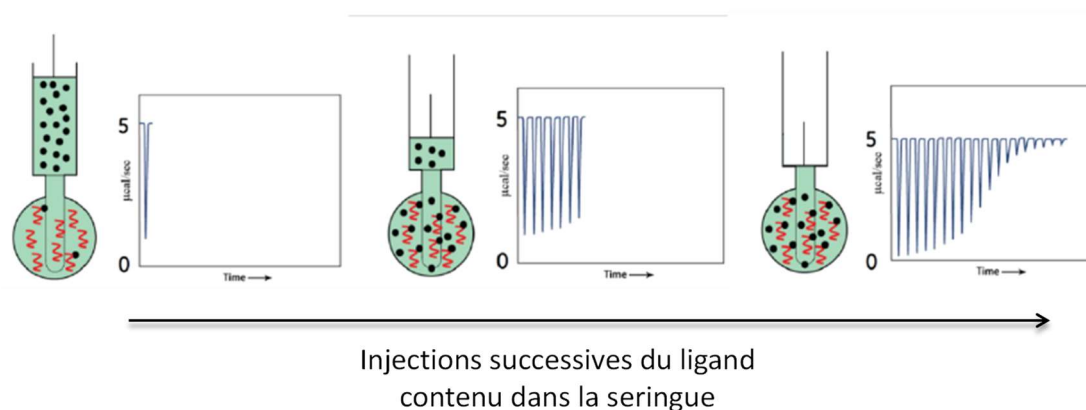


Figure 62 : Schéma d'une expérience d'ITC. Les injections successives sont modélisées et les variations de chaleur associées sont représentées sur l'isotherme. Lorsque la saturation est atteinte, la variation thermique mesurée est constante après chaque injection (isotherme de droite). Le signal enregistré correspond alors uniquement à la dilution du ligand dans le tampon.

Dans le cadre des mesures d'interaction entre la Paem et le 1-PP-MurNAC-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala, la protéine et le ligand ont été dissous dans le tampon A. Plusieurs mesures ont été effectuées avec des concentrations de Paem de 20 à 70 μ M et des concentrations en en ligand de 240 à 800 μ M. L'expérience d'ITC a été menée sur un appareil ITC200 (Microcal-Malvern). La Paem a été placée dans la cellule de mesure (200 μ L) et le ligand dans la seringue (40 μ L). L'expérience a été réalisée avec 20 injections de 2 μ L et la température a été maintenue à 20°C. L'intervalle de temps entre deux injections était de 180 s et la vitesse d'agitation de la seringue de 400 rotations par min.

12.2. Calorimétrie différentielle par balayage (DSC) :

Le DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) permet d'étudier la stabilité thermique d'une macromolécule par la mesure de la variation de sa capacité calorifique (C_p) en fonction de la température. A partir du thermogramme obtenu, il est possible de déterminer directement la variation d'enthalpie (ΔH) ainsi que la température de demi-dénaturation (T_m) associées à la dénaturation thermique de la protéine. Si la molécule étudiée subit une ou plusieurs transitions structurales induites par la température, la capacité calorifique moyenne, $C_p(T)$, présentera un ou plusieurs pics centrés au niveau du T_m de la protéine. La différence entre la chaleur spécifique de l'état natif et de l'état dénaturé de la protéine est représentée par la fonction ΔC_p . La variation d'enthalpie associée au processus de dénaturation est due à plusieurs facteurs, comme la rupture des interactions intramoléculaires telles que les liaisons hydrogène ou les interactions de van der Waals, mais elle est également due à la formation de nouvelles liaisons avec le solvant (protonation ou ionisation).

La stabilité de la PaeM a été mesurée seule ou en présence de ligand 1-PP-MurNAC-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala sur un VP-DSC (Microcal Corp®, Malvern). Avant toute mesure, plusieurs balayages ont été effectués en présence d'eau, puis de tampon A, afin de vérifier que le système était à l'équilibre. La stabilité thermique de la PaeM seule a été mesurée sur une solution protéique à 0,5 mg.mL⁻¹, soit 15 μ M. La stabilité thermique de la PaeM en présence du ligand a également été mesurée. La concentration de protéine utilisée était identique à celle utilisée lors de la mesure de stabilité pour la protéine seule. Le 1-PP-MurNAC-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala a été testé à une concentration de 75 ou 180 μ M. La vitesse de chauffe était fixée à 1 K.min⁻¹ pour toutes les mesures. Le taux de réversibilité du processus de dénaturation a été vérifié en effectuant deux balayages thermiques sur le même échantillon.

Résultats et Discussion

I. Synthèse de substrats solubles :

1. Synthèse de lipides II solubles :

Le lipide II classique retrouvé au sein de la membrane plasmique des bactéries possède une chaîne lipidique à 55 atomes de carbone, et ne peut, par conséquent, être solubilisé qu'en présence de détergent. Dans l'optique de faciliter l'étude de la colicine M et de ses homologues, que ce soit pour la réalisation de tests biochimiques ou pour la réalisation d'essais de cristallogenèse en présence d'un ligand, nous avons entrepris la synthèse de lipides II solubles possédant une chaîne lipidique à 10 (C_{10} -PP-MurNAc(-pentapeptide)-GlcNAc) ou à 15 atomes de carbone (C_{15} -PP-MurNAc(-pentapeptide)-GlcNAc). Pour cela, le substrat lipidique classique (C_{55} -P) a été remplacé par du néryl phosphate (C_{10} -P) ou par du farnésyl pyrophosphate (C_{15} -PP). Afin de pouvoir suivre l'avancement de la réaction lors de la mise au point des conditions de synthèse, de l'UDP- 14 C]GlcNAc a été utilisé. A l'issue de la réaction, les différents produits ont été séparés par chromatographie sur couche mince et la radioactivité a été quantifiée.

Le premier essai de synthèse de lipide II soluble, possédant une chaîne lipidique à 10 atomes de carbone, a été entrepris selon les conditions décrites dans la partie Matériels et Méthodes, en utilisant les protéines MraY_{Bs} de *B. subtilis* et MurG_{Ec} d'*E. coli*. Aucune synthèse de lipide II en C_{10} n'a été observée dans ces conditions (**Figure 63**), puisqu'aucun nouveau pic de radioactivité n'a été détecté et que la totalité de l'UDP- 14 C]GlcNAc était encore présente à l'issue des 120 min de réaction.

Suite à ce résultat infructueux, la protéine MraY_{Aa} issue d'*A. aeolicus* a été utilisée en lieu et place de la protéine MraY_{Bs}. MraY_{Aa} est en effet capable d'accommoder comme substrat des lipides courts tels que le C_{10} -P ou le C_{15} -P.

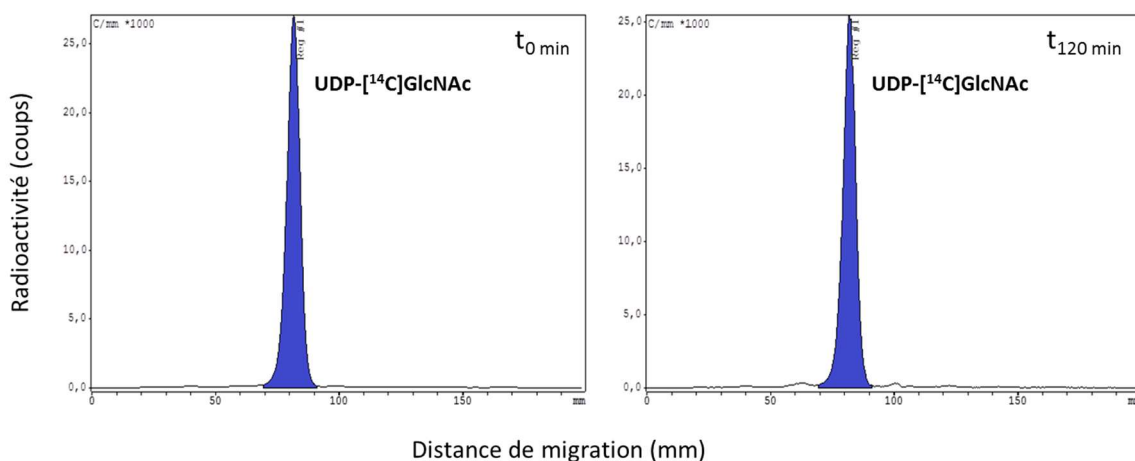


Figure 63 : Essai de synthèse de C_{10} -lipide II avec les enzymes MraY_{Bs} et MurG_{Ec}. L'avancement de la réaction de synthèse a été suivie par chromatographie sur couche mince à t_0 min et t_{120} min.

De nouveaux essais de synthèse de lipides II en C_{10} et en C_{15} ont donc été menés en utilisant les protéines MraY_{Aa} et MurG_{Ec}, selon le même protocole. Il est important de noter qu'une étape

préalable de déphosphorylation du C₁₅-PP en C₁₅-P par la protéine PgpB a été nécessaire avant de débiter la synthèse du lipide II en C₁₅, l'enzyme MraY requérant un substrat monophosphorylé.

L'avancement de la réaction a été suivi par chromatographie sur couche mince sur plaque de silice suivie d'une quantification de la radioactivité. Par conséquent, seuls les substrats et produits radiomarqués sont visibles sur le chromatogramme. Les résultats des essais de synthèse des lipides II en C₁₀ et en C₁₅ sont présentés respectivement dans les **figures 64 et 65**.

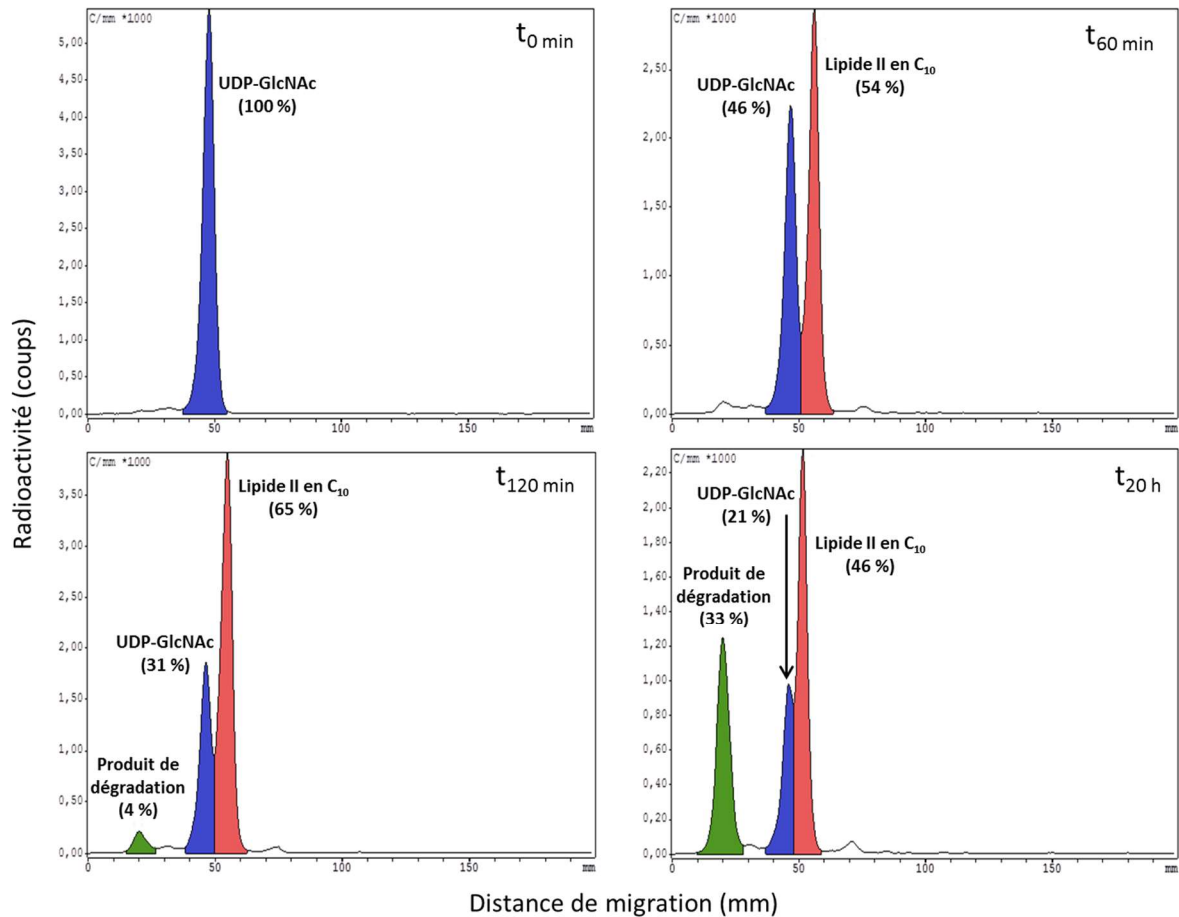


Figure 64 : Suivi de synthèse du lipide II en C₁₀. L'avancement de la réaction de synthèse a été suivi par chromatographie sur couche mince à t₀ min, t₆₀ min, t₁₂₀ min et t₂₀ h. Le pic bleu correspond à l'UDP-[¹⁴C]GlcNAc, le pic rouge au lipide II en C₁₀ et le pic vert à un produit de dégradation spontanée. Le pourcentage de chacun des composés quantifiés est indiqué sur chaque chromatogramme. Le dépôt pour chaque point de suivi a été effectué à 2 cm du bord inférieur de la plaque.

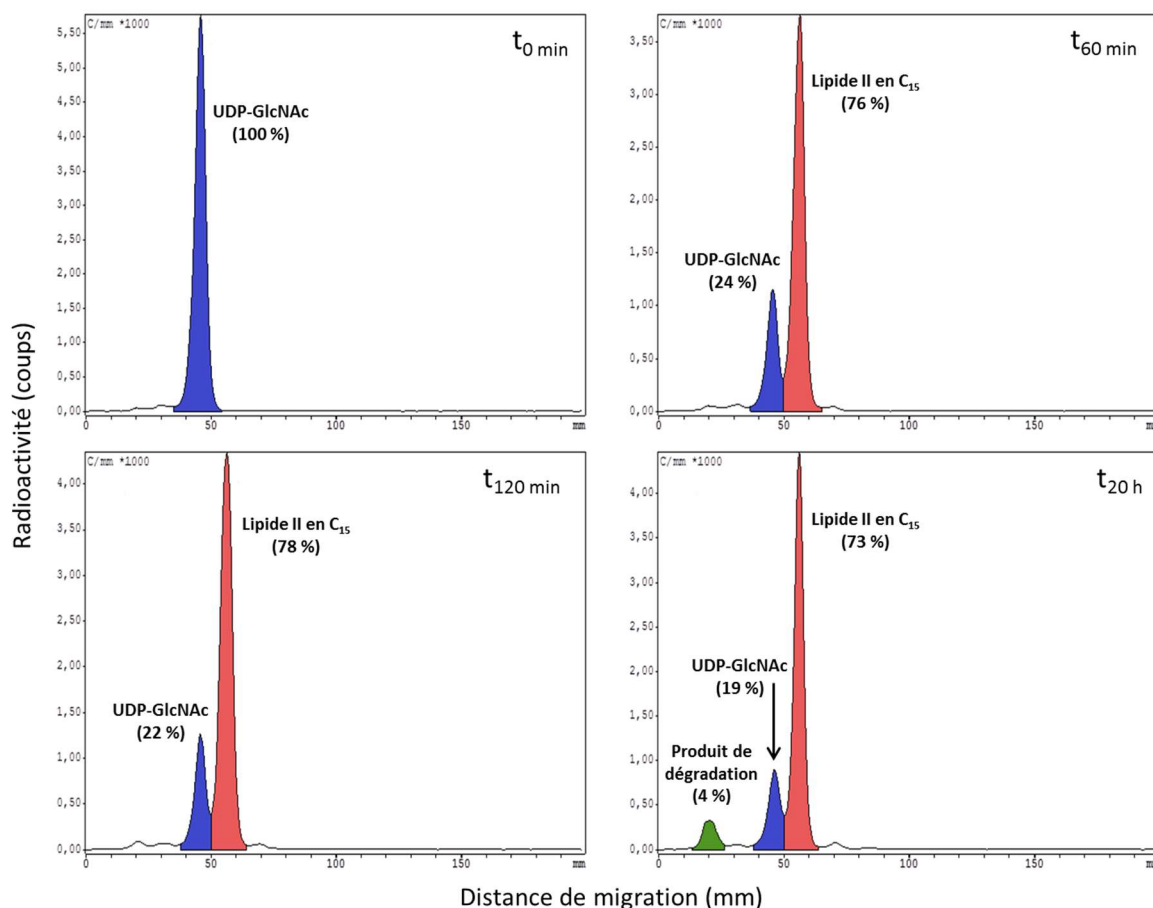


Figure 65 : Suivi de synthèse du lipide II en C₁₅. L'avancement de la réaction de synthèse a été suivi par chromatographie sur couche mince à t₀ min, t₆₀ min, t₁₂₀ min et t₂₀ h. Le pic bleu correspond à l'UDP-[¹⁴C]GlcNAc, le pic rouge au lipide II en C₁₅ et le pic vert à un produit de dégradation spontanée. Le pourcentage de chacun des composés quantifiés est indiqué sur chaque chromatogramme. Le dépôt pour chaque point de suivi a été effectué à 2 cm du bord inférieur de la plaque.

Ces essais ont montré que la synthèse enzymatique de lipide II en C₁₀ et C₁₅ était possible en utilisant les enzymes MraY_{Aa} et MurG_{Ec}. Pour les deux types de synthèse, l'UDP-GlcNAc était le réactif limitant (cf **Matériels et Méthodes ; § 7**) ; par conséquent, le pourcentage de lipide II formé et quantifié correspond au rendement de la réaction enzymatique, soit 65 % de synthèse pour le lipide II en C₁₀ et 78 % pour le lipide II en C₁₅. L'analyse des chromatogrammes a cependant montré dans les deux cas que la synthèse n'était pas complète, puisque de l'UDP-GlcNAc était encore présent dans les mélanges réactionnels à l'issue des 20 h d'incubation.

Par ailleurs, nous avons noté l'apparition d'un pic supplémentaire au cours du temps, qui correspond probablement à un produit de dégradation spontanée du lipide II, puisque l'augmentation de l'intensité de ce pic entre t₁₂₀ min et t₂₀ h a été corrélée à une diminution de la quantité de lipide II synthétisé. Les conditions de chromatographie sur couche mince utilisées permettent de séparer les produits selon leur hydrophobie : plus un composé est hydrophobe, plus il migre loin. La molécule correspondant au pic additionnel n'a pas migré et est restée au point de dépôt, permettant ainsi de conclure sur sa nature hydrophile. Par ailleurs, cette molécule étant détectée par le scanner de radioactivité, elle contenait forcément du GlcNAc. A partir de ces informations, nous avons pu émettre plusieurs hypothèses concernant la nature de ce produit : il peut s'agir de 1-PP-MurNAc(-pentapeptide)-GlcNAc, de 1-P-MurNAc(-pentapeptide)-GlcNAc ou de MurNAc(-pentapeptide)-GlcNAc. La nature exacte de la molécule correspondant à ce pic doit encore être confirmée.

Enfin, il est également important de noter que la dégradation spontanée que nous avons observée était plus importante pour le lipide II en C₁₀ que pour celui en C₁₅. En effet, pour la synthèse du lipide II en C₁₀, la proportion de ce produit de dégradation s'élevait à 33 % contre 8 % pour la synthèse du lipide II en C₁₅ à l'issue des 20 h d'incubation. Le lipide II en C₁₅ semble donc plus stable que celui en C₁₀. Cette différence de stabilité pourrait éventuellement provenir de l'isomérisation des prényls phosphate que nous avons utilisés comme substrats (**Figure 66**). En effet, la configuration de la dernière double liaison de ces deux lipides est différente. Le néryl phosphate utilisé présente une configuration de type (ω , Z) alors que le farnésyl phosphate présente une configuration de type (ω , E, E). Cela signifie que, dans la chaîne lipidique, la dernière liaison précédant le groupement phosphate est dans une configuration *cis* (Z) au sein du lipide II en C₁₀, et dans une conformation *trans* (E) au sein du lipide II en C₁₅. A noter que la configuration de cette même double liaison est de type *cis* au sein de l'undécaprényl pyrophosphate présent dans le lipide II classique (**Figure 66**) (Manat *et al.*, 2014). Nous n'avons par ailleurs jamais observé l'apparition d'un pic de dégradation lors des synthèses de lipide II en C₅₅, ce qui va à l'encontre de notre hypothèse.

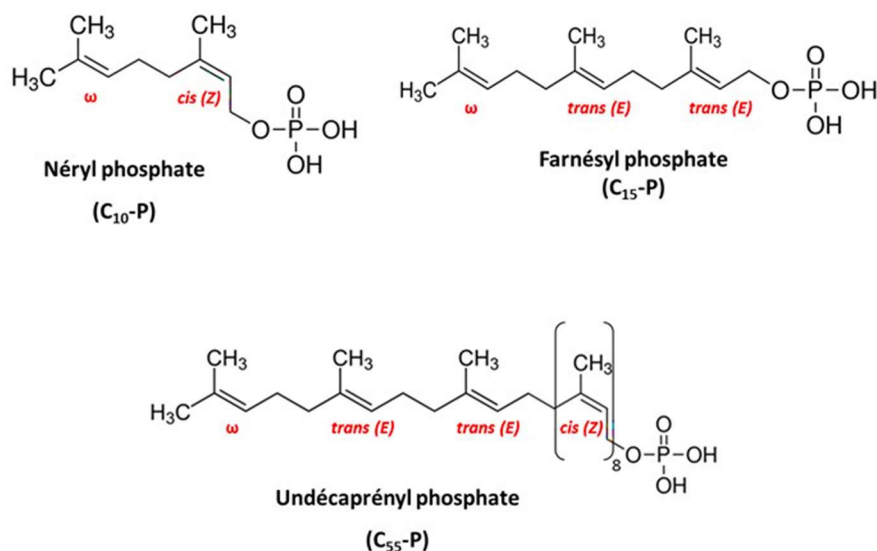


Figure 66 : Isomérisation du C₁₀-P, du C₁₅-P et du C₅₅-P. La configuration de chacune des doubles liaisons est indiquée en rouge pour chaque lipide.

2. Détermination de l'activité catalytique des protéines ColM, PaeM et PcaM1 vis-à-vis des lipides II solubles :

Afin de déterminer si les analogues solubles de lipide II synthétisés étaient substrats de la PaeM, son activité de clivage des lipides en C₁₀ et en C₁₅ a été étudiée de manière qualitative. Pour cela, de la PaeM purifiée a été ajoutée dans le mélange réactionnel de synthèse des deux lipides, et le tout a alors été incubé à 37°C pendant 30 min. A l'issue de cette incubation, le mélange réactionnel a été analysé par chromatographie sur couche mince afin de séparer les différents composés radioactifs en présence. L'activité enzymatique des protéines ColM et PcaM1 a également été testée vis-à-vis de ces deux substrats (**Figure 67**).

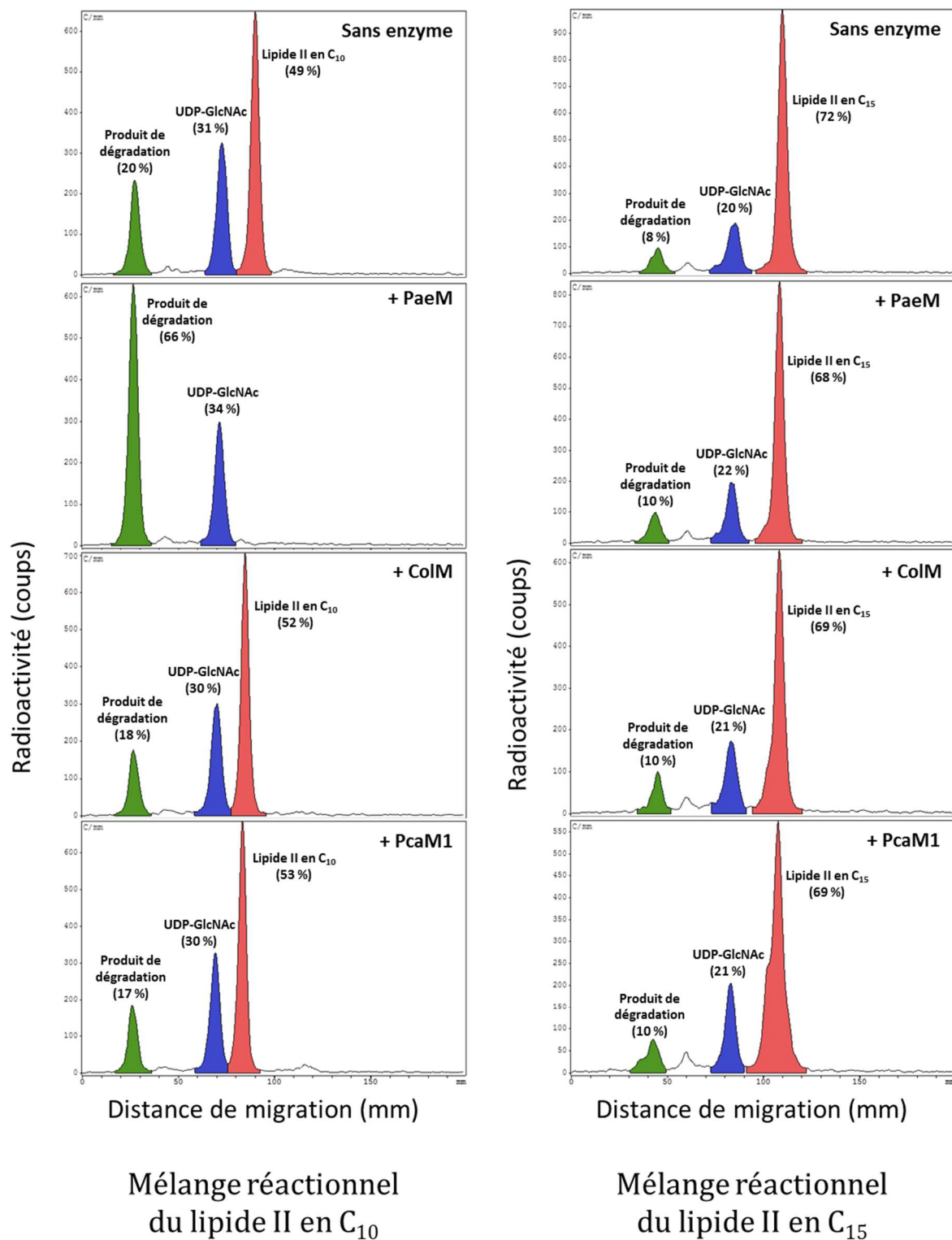


Figure 67 : Dégradation *in vitro* des lipides II en C₁₀ et C₁₅ par les enzymes ColM, PaeM et PcaM1. Le mélange réactionnel à l'issue de la synthèse du lipide II en C₁₀ (à gauche) ou en C₁₅ (à droite) a été incubé en absence ou en présence de la PaeM, de la ColM ou de la PcaM1. Les différents produits de réaction ont été séparés par chromatographie sur couche mince. Le pic bleu correspond à l'UDP-GlcNAc, le pic rouge au lipide II en C₁₀ ou C₁₅ et le pic vert au produit de dégradation spontanée du lipide II en C₁₀ ou C₁₅ ainsi qu'au 1-PP-MurNAc(-pentapeptide)-[¹⁴C]GlcNAc. Le dépôt a été effectué à 2 cm du bord inférieur de la plaque.

Nous avons ainsi pu déterminer que le lipide II en C₁₅ n'était substrat d'aucune des trois protéines testées, et que le lipide II en C₁₀ l'était uniquement pour la PaeM, puisque la seule activité de dégradation a été observée en présence de cette dernière : en effet, le pic au niveau du point de dépôt représente 20 % du total de la radioactivité quantifiée en absence d'enzyme et 66 % en présence de PaeM. Par ailleurs, le pic correspondant au lipide II en C₁₀ a totalement disparu en présence de cette dernière. L'analyse des chromatogrammes a également permis de mettre en évidence que le 1-PP-MurNAc(-pentapeptide)-GlcNAc, généré suite à la coupure du lipide II en C₁₀ par la PaeM, migrerait exactement au même endroit que le produit de dégradation identifié précédemment. Cette observation est en faveur de l'hypothèse selon laquelle ce produit pourrait être du 1-PP-MurNAc(-pentapeptide)-GlcNAc provenant d'une dégradation spontanée de ces lipides II solubles. Remarquons néanmoins qu'en raison de leur caractère polaire, les deux autres produits de dégradation possibles (le 1-P-MurNAc(-pentapeptide)-GlcNAc et le MurNAc(-pentapeptide)-GlcNAc) ont certainement des valeurs de R_f peu différentes dans ce système de solvants.

De manière intéressante, et contrairement à la PaeM, les protéines ColM et PcaM1 ne sont pas capables de cliver le lipide II en C₁₀, même lorsque d'importantes quantités de protéine (jusqu'à 70 µg de protéine purifiée) ont été ajoutées aux mélanges réactionnels. Cette différence d'activité catalytique des trois homologues vis-à-vis du lipide II en C₁₀ peut être reliée à leur activité spécifique respective. En effet, il a précédemment été montré que la PaeM était, parmi les différents homologues identifiés à ce jour, celle qui présentait l'activité spécifique de dégradation du lipide II classique la plus élevée. Elle est de 13 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ contre 0,6 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ pour la ColM et 0,53 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ pour la PcaM1 (Barreteau *et al.*, 2010, 2012b; Chérier *et al.*, 2016). Cette différence d'activité spécifique a été corrélée aux différences conformationnelles présentes au sein des sites actifs respectifs des protéines PaeM et ColM, et plus particulièrement au niveau de l'orientation des chaînes latérales des résidus essentiels à l'activité catalytique de ces enzymes (**cf Introduction § V.2.**) (Barreteau *et al.*, 2012b). Il a ainsi été supposé que le site actif observé au sein de la structure de la PaeM était dans une conformation intermédiaire proche de la conformation pleinement active, lui permettant ainsi de reconnaître et d'interagir avec le lipide II en C₁₀. A l'inverse, la conformation des sites actifs des protéines ColM et PcaM1 ne leur permettrait pas de reconnaître ce substrat, empêchant de ce fait son clivage.

Il est également intéressant de noter que dans les conditions testées, la PaeM est capable de cliver le lipide II en C₁₀ mais pas le lipide II en C₁₅ (**Figure 67**). Cette différence en termes de spécificité de substrat peut possiblement être dépendante de l'isomérisation des lipides utilisés lors la synthèse de ces analogues de lipide II solubles. Comme mentionné précédemment, la configuration de la dernière double liaison précédant le groupement pyrophosphate est en effet de type *cis* pour le lipide II en C₁₀ ainsi que pour le lipide II classique et de type *trans* pour celui en C₁₅. Cette différence de configuration pourrait donc être responsable de l'absence d'activité de la PaeM vis-à-vis du lipide II en C₁₅. Ce résultat laisse donc supposer que l'isomérisation de cette liaison interviendrait en partie dans la reconnaissance du substrat par la PaeM, et probablement par les autres membres de cette famille d'enzymes.

A priori plus stable que le lipide II en C₁₀ et non hydrolysable par les différents homologues de la ColM, le lipide II en C₁₅ constitue donc un excellent ligand potentiel pour mener des études

structurales. Cependant, il faut dans un premier temps déterminer si ce substrat établit une liaison assez forte avec les enzymes en question avant d'envisager son utilisation lors d'essais de co-cristallisation. Ce type de tests nécessitant une quantité importante de ligand, les conditions de synthèse du lipide II en C₁₅ ont été optimisées afin d'en augmenter le rendement.

3. Optimisation des conditions de synthèse du lipide II en C₁₅ :

Afin de pouvoir produire ce lipide en quantité plus importante, des essais de synthèses ont été menés en augmentant la quantité de chacun des substrats, selon le protocole décrit dans la partie Matériels et Méthodes.

Lors du premier essai de d'optimisation, le mélange réactionnel contenait 50 nmol d'UDP-GlcNAc (10,4 kBq), 50 nmol de C₁₅-PP et 60 nmol d'UDP-MurNAc-pentapeptide (UM5). A l'issue de la synthèse dans ces conditions, le rendement, calculé à partir de la radioactivité, était de 59 % (**Figure 68**).

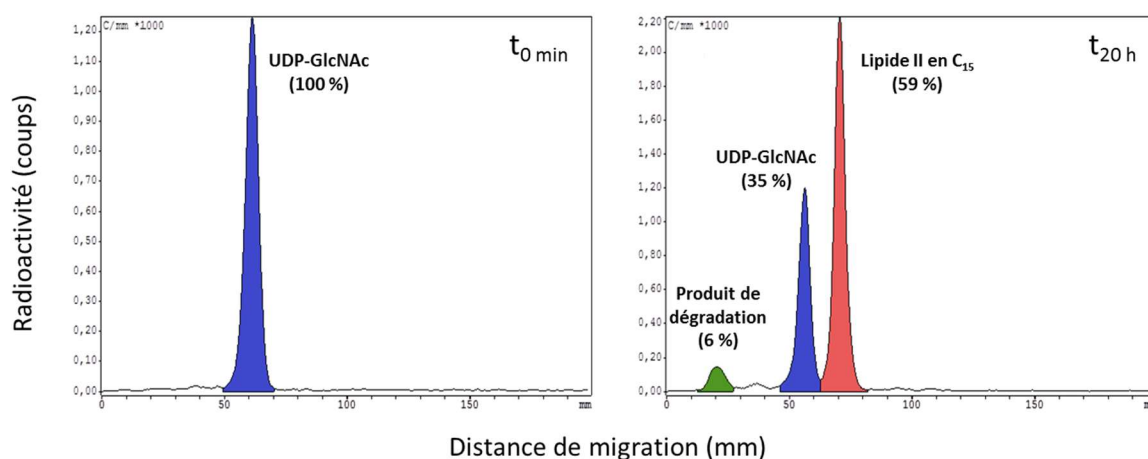


Figure 68 : Synthèse de lipide II en C₁₅. L'avancement de la réaction a été suivi par chromatographie sur couche mince à t₀ min et t₂₀ h. Le pic bleu correspond à l'UDP-GlcNAc, le pic rouge au lipide II en C₁₅, et le pic vert à un produit de dégradation spontanée. Le pourcentage de chacun des constituants est indiqué. Le dépôt pour chaque point de suivi a été effectué à 2 cm du bord inférieur de la plaque.

La littérature a montré que l'utilisation d'un excès de C₁₅-P lors de la synthèse de lipide I fluorescent augmentait le rendement de la réaction (Mitachi *et al.*, 2015). La même approche a donc

été tentée dans un second essai d'optimisation, où le mélange réactionnel contenait 50 nmol d'UDP-GlcNAc (10,4 kBq), 150 nmol de C₁₅-PP et 60 nmol d'UM5.

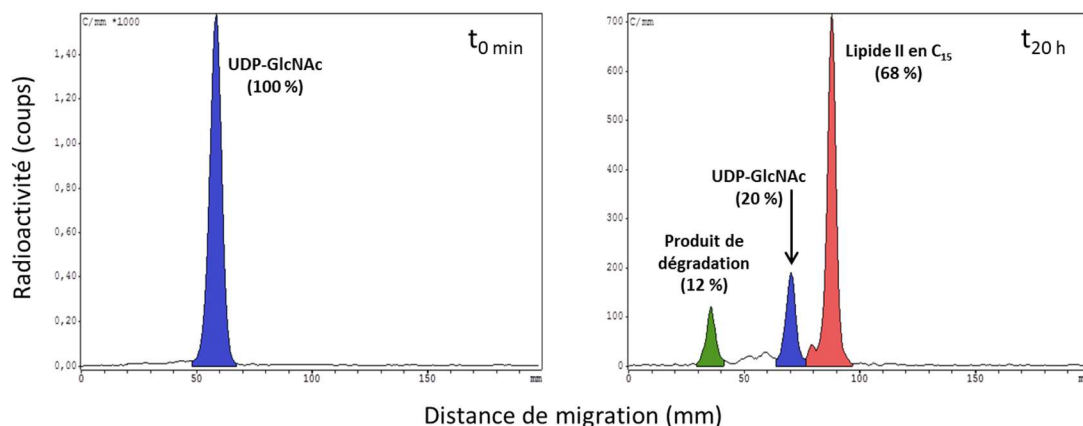


Figure 69 : Synthèse de lipide II en C₁₅ en présence d'un excès de C₁₅-PP. L'avancement de la réaction a été suivi par chromatographie sur couche mince à t₀ min et t₂₀ h. Le pic bleu correspond à l'UDP-GlcNAc, le pic rouge au lipide II en C₁₅, et le pic vert à un produit de dégradation spontané du lipide II en C₁₅. Le pourcentage de chacun des constituants est indiqué. Le dépôt de chaque point de suivi a été effectué à 2 cm du bord inférieur de la plaque.

Dans ces conditions, le rendement calculé de la réaction était de 68 % (**Figure 69**). Ce taux de transformation est donc 10 % supérieur à celui obtenu dans les conditions précédentes. L'utilisation en excès de C₁₅-PP dans le milieu réactionnel semble donc améliorer le rendement. Nous avons cependant constaté dans ces conditions que la dégradation spontanée était légèrement supérieure. Néanmoins, ces secondes conditions de synthèse ont été retenues pour synthétiser du lipide II en C₁₅ non radiomarqué afin d'envisager des futurs essais d'interaction et de co-cristallisation.

4. Purification et confirmation de l'identité du lipide II en C₁₅ :

A l'issue d'une synthèse à plus grande échelle (250 nmol UDP-GlcNAc, 750 nmol C₁₅-PP et 300 nmol UM5), le lipide II en C₁₅ a été purifié par HPLC selon le protocole décrit dans la partie Matériels et Méthodes. La concentration en lipide II purifié a ensuite été déterminée par une analyse en acides aminés. Elle était de 160 μM pour un volume de 600 μL, soit 96 nmol de lipide II en C₁₅. Le rendement isolé à l'issue de la purification était donc de 38 %.

Afin de confirmer l'identité du substrat synthétisé, ce dernier a été analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF, selon le protocole décrit dans la partie Matériels et Méthodes (**Figure 70**). Sa masse théorique monoisotopique est de 1374,54962 Da. Par conséquent, en mode linéaire négatif, l'ion moléculaire [M-H]⁻ doit apparaître à m/z = 1373,5 Da.

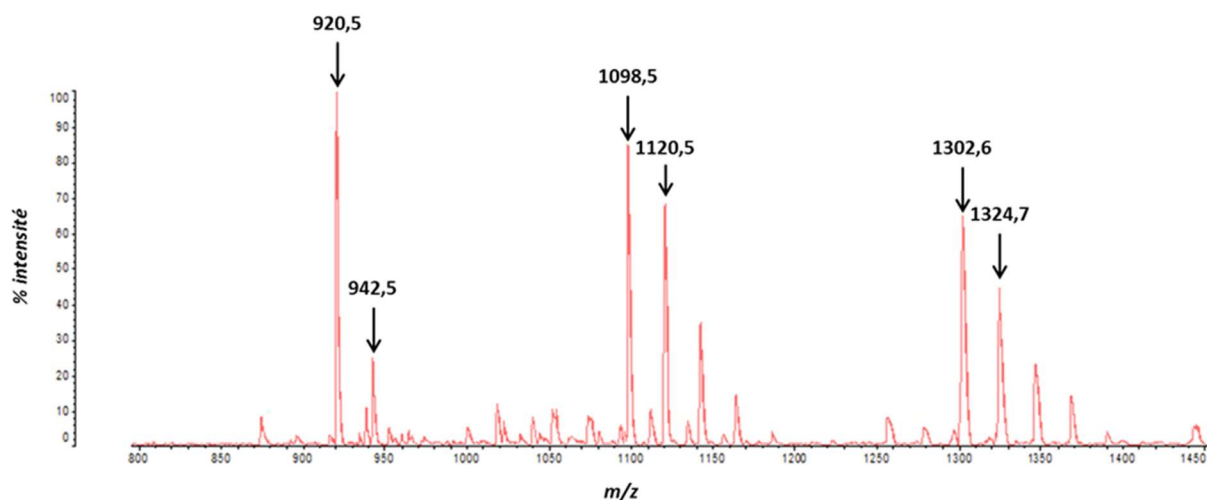


Figure 70 : Spectre de masse du lipide II en C₁₅ purifié. Les rapports m/z des pics, discutés dans le texte, sont indiqués sur le spectre.

Aucun pic correspondant au lipide II en C₁₅ n'a pu être identifié à la masse attendue suite à l'analyse du spectre. En revanche, un pic de $m/z = 1302,6$ a été détecté. Cette masse présente une différence de 71 Da avec le rapport m/z calculé, différence qui peut être expliquée par la perte de l'alanine terminale du motif peptidique du lipide II en C₁₅. En effet, la préparation protéique de MraY_{Aa} utilisée lors de la synthèse de ce substrat n'était pas parfaitement pure et il est donc possible qu'une activité D,D-carboxypeptidase ait été co-purifiée avec l'enzyme et soit à l'origine de la perte du résidu D-Ala terminal du pentapeptide. Cela est corroboré par le rapport Ala/A_{2pm} de 2,0 donné par l'analyse en acides aminés du produit. Ce pic observé a donc été associé au signal du C₁₅-MurNAC(-tétrapeptide)-GlcNAC, et la valeur de $m/z = 1302,6$ obtenue est celle de l'ion moléculaire [M-H]⁻ de la molécule.

Un pic de $m/z = 1098,5$ a également été détecté, correspondant à une perte de masse de 204 Da par rapport au pic du C₁₅-MurNAC(-tétrapeptide)-GlcNAC. Cette valeur coïncide avec la perte du motif/résidu GlcNAC et la molécule à l'origine de ce pic est donc probablement du C₁₅-MurNAC(-tétrapeptide). Sa formation peut être la conséquence de deux phénomènes distincts :

- La présence, dans la solution analysée, de lipide I en C₁₅ due à une réaction MurG incomplète.
- La fragmentation de la liaison glycosidique entre GlcNAC et MurNAC lors du bombardement de l'échantillon.

Le rapport GlcN/A_{2pm} fourni par l'analyse en acides aminés étant de 1,1, la première hypothèse peut être réfutée, et la perte de GlcNAC provient donc uniquement de la fragmentation de la liaison glycosidique lors du bombardement. Remarquons que ce phénomène est très fréquent en spectrométrie de masse.

Un troisième pic à $m/z = 920,5$ a aussi été détecté sur le spectre de masse. Cette valeur est concordante avec une perte de masse de 382 Da par rapport au pic à $m/z = 1302,6$, coïncidant ainsi avec la perte de C₁₅-PP. Ce pic, correspondant à du MurNAC(-tétrapeptide)-GlcNAC, serait le résultat de la fragmentation de la liaison glycosyl-phosphate du lipide II en C₁₅ lors du bombardement, phénomène analogue à celui décrit plus haut.

Enfin, les pics à m/z 1324,7, 1120,5 et 942,5, correspondent à des adduits de sodium des trois ions mentionnés précédemment.

L'analyse par spectrométrie de masse de la solution de lipide II en C₁₅ purifié a donc permis de confirmer l'identité du substrat synthétisé, mais a également mis en évidence la présence d'un motif tétrapeptide plutôt que pentapeptide sur le résidu MurNAc. Cependant, la composition de la partie peptidique du lipide II n'ayant pas d'incidence sur l'activité de la ColM (Patin *et al.*, 2012), il est peu probable que la perte du dernier résidu de D-Ala soit un obstacle à l'utilisation de ce substrat soluble lors des futurs essais d'ITC et de co-cristallogénèse.

5. Synthèse, purification et confirmation de l'identité du 1-PP-MurNAc-pentapeptide :

Le 1-PP-MurNAc-pentapeptide, analogue du produit de réaction soluble 1-PP-MurNAc(-pentapeptide)-GlcNAc généré par l'activité enzymatique de la ColM et de ses homologues, a été obtenu par oxydation de l'UDP-MurNAc-pentapeptide (2 μ mol, version avec L-Lys en position 3) au métapériodate de sodium suivie d'une réaction de β -élimination. L'action du métapériodate a permis l'ouverture du cycle ribose au niveau du diol vicinal en 2' et 3', ainsi que l'oxydation de ce diol en aldéhydes. Dans un second temps, de la soude a été ajoutée au mélange réactionnel afin de favoriser la β -élimination du substituant en 5', à savoir le 1-PP-MurNAc-pentapeptide.

La purification de ce produit a été réalisée par HPLC en deux étapes, la première en tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 4,5 et la seconde en utilisant un gradient de méthanol (de 0 à 50 %) dans de l'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,05 %, comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes (cf § 7.3). A l'issue de ces deux étapes de purification, sa concentration a été déterminée par analyse en acides aminés. Elle était de 0,5 mM pour un volume de 3 mL, soit 1,5 μ mol de produit. Le rendement isolé était donc de 75 %.

Afin de confirmer son identité, le produit 1-PP-MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala ainsi synthétisé a été analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF selon le protocole décrit dans la partie Matériels et Méthodes (Figure 71). Sa masse théorique monoisotopique est de 923,29263 Da.

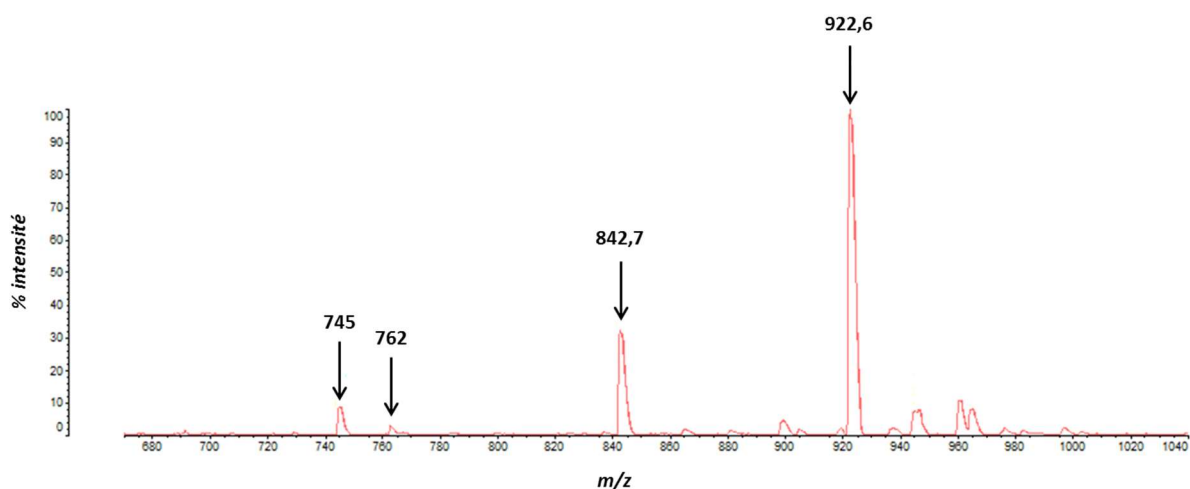


Figure 71 : Spectre de masse du 1-PP-MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala purifié. Les rapports m/z des pics, discutés dans le texte, sont indiqués sur le spectre.

L'analyse du spectre de masse a permis d'identifier un pic majoritaire à $m/z = 922,6$ qui correspond parfaitement à la masse attendue pour l'ion moléculaire $[M-H]^-$ de la molécule de 1-PP-MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala en mode négatif.

Un pic à $m/z = 842,7$ a également été détecté. Cette valeur correspond à une différence de masse de 80 Da par rapport au pic identifié précédemment, coïncidant avec la perte d'un groupement phosphate. La molécule associée à ce pic est donc probablement du 1-P-MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala. On peut également distinguer sur le spectre de masse un troisième pic très minoritaire de $m/z \approx 762$. Cette valeur correspond également à une différence de 80 Da par rapport au pic de $m/z = 842,7$, coïncidant ainsi avec la perte du second groupement phosphate. Du MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala est donc sans doute à l'origine de ce troisième pic.

Là encore, deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer le clivage respectif des deux liaisons anhydride phosphorique et glycosyl-phosphate : le résultat d'une fragmentation lors de l'analyse de masse, ou une hydrolyse partielle due au traitement par le TFA employé lors de l'étape de dessalage du 1-PP-MurNAc-pentapeptide. Notons toutefois que l'on observe un petit pic à $m/z \approx 745$, lequel pourrait correspondre à une perte d'eau consécutive à la fragmentation de la liaison glycosyl-phosphate, phénomène fréquemment rencontré dans ces circonstances : la présence de cet ion militerait plutôt en faveur d'une fragmentation, au moins en ce qui concerne l'origine du MurNAc-pentapeptide.

Cette analyse par spectrométrie de masse a permis de confirmer la nature du produit synthétisé. Cependant, avec cette seule analyse, on ne peut exclure la possibilité que notre produit soit contaminé par du 1-P-MurNAc-pentapeptide et/ou du MurNAc-pentapeptide.

II. Etudes structurales et biochimiques de la protéine PaeM et de deux variants :

1. Production et purification de la PaeM :

Une partie de mon projet de thèse a consisté en l'étude structurale de la protéine PaeM. Les essais de cristallogenèse nécessitent une quantité importante de protéine sous une forme homogène et stable. La protéine PaeM a été produite en contexte hétérologue dans une souche d'*E. coli* C43(DE3), avec une étiquette histidine en C-terminal et purifiée en deux étapes de chromatographie, selon un protocole utilisé en routine au laboratoire (Barreteau *et al.*, 2012b). Le profil électrophorétique de la protéine à l'issue des différentes étapes de purification ainsi que le chromatogramme correspondant à la chromatographie par exclusion stérique sont présentés dans la **figure 72**.

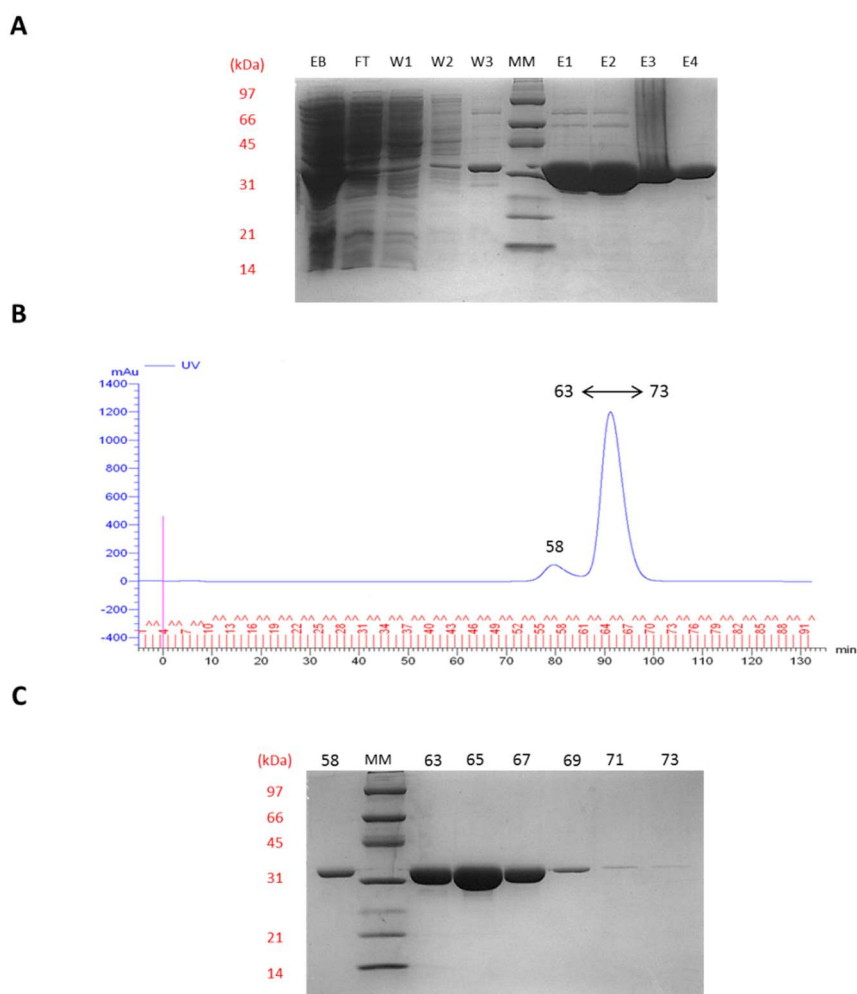


Figure 72 : Profil de purification de la protéine PaeM. A : Profil électrophorétique de la PaeM à l'issue de la chromatographie d'affinité. EB : Extrait Brut ; FT : Flow Through ; W1-W2 : Fractions de lavage à 20 mM d'imidazole ; W3 : Fraction de lavage à 40 mM d'imidazole ; E1-E4 : Fractions d'élutions à 200 mM d'imidazole. B : Chromatogramme d'exclusion stérique. C : Profil électrophorétique des différentes fractions d'élution issues de la chromatographie d'exclusion stérique. Les différentes fractions déposées correspondent à celles identifiées sur le chromatogramme. MM : marqueur de poids moléculaires. Les valeurs des poids moléculaires en kDa sont indiquées en rouge.

A l'issue de la première étape de chromatographie d'affinité sur résine Ni²⁺-NTA-agarose, le profil électrophorétique (conditions réductrices et dénaturantes) montre, comme attendu, une

importante production de protéine (**Figure 72, A**). Les fractions d'élution ont par la suite été regroupées et soumises à la seconde étape de chromatographie par exclusion stérique. L'analyse du chromatogramme obtenu révèle la présence de deux pics (**Figure 72, B**). L'analyse de la composition de chaque pic par SDS-PAGE a révélé qu'ils contenaient tous deux uniquement la protéine PaeM (**Figure 72, C**). Le deuxième pic correspond à un temps de rétention de 86 min, en adéquation avec le temps de rétention théorique calculé pour la PaeM sous une forme monomérique. Le premier pic, avec un temps de rétention plus faible, correspond à l'élution de la PaeM sous une forme dimérique ou agrégée. Les fractions d'élution correspondant à la protéine sous une forme monomérique ont été regroupées et concentrées par ultrafiltration sur membrane (seuil de coupure : 10 kDa) jusqu'à la concentration souhaitée.

La protéine homogène et monodisperse obtenue à l'issue de ces étapes de purification a été utilisée pour la réalisation de différents tests biochimiques ainsi que pour la réalisation des essais de cristallisation.

2. Identification d'un ligand potentiel de la PaeM :

Le mécanisme catalytique de la ColM et de ses différents homologues est à l'heure actuelle encore inconnu. L'obtention de la structure tridimensionnelle de l'une de ces protéines avec un ligand au sein du site actif apparaît essentielle pour pouvoir l'élucider. Le substrat naturel lipide II, par son caractère hydrophobe, est difficilement exploitable pour réaliser des essais de co-cristallisation. En effet, ce dernier doit être solubilisé en détergent, ce qui peut nuire aux essais de cristallogénèse. La recherche de ligands potentiels solubles a ainsi été menée soit par la réalisation de tests d'activité *in vitro* soit par la réalisation d'expériences de microcalorimétrie.

2.1. Par le test de détection d'activité enzymatique :

Différentes molécules solubles présentant une ressemblance structurale avec le lipide II ont été testées *in vitro* pour leur capacité à interférer avec l'activité de dégradation du lipide II de la PaeM. Ainsi, l'activité résiduelle de cette enzyme a été mesurée en présence de pyrophosphate de sodium (NaPPi), d'isopentényl pyrophosphate (C₅-PP), de farnésyl pyrophosphate (C₁₅-PP) ou d'UDP-MurNAc-pentapeptide (UM5) et a été comparée à l'activité de la PaeM en absence de ces différentes molécules. L'effet inhibiteur de l'undécaprényl pyrophosphate a également été examiné malgré son caractère hydrophobe. Chaque molécule a été testée au moins trois fois et l'activité résiduelle de la PaeM, moyennée et exprimée en pourcentage pour chacune des molécules testées est présentée dans le **tableau 9**.

Tableau 9 : Activité résiduelle (en pourcentage) de la PaeM en présence des différentes molécules testées. ¹ L'activité résiduelle de la PaeM a été calculée à partir de celle mesurée pour le lipide II dans les conditions standards et exprimée comme activité de référence. ² Correspond à 13 nmol.min⁻¹.mg⁻¹.

Ligand	Activité résiduelle ¹
--------	----------------------------------

-	100 ²
NaPPI	123 ± 15
C ₅ -PP	47 ± 15
C ₁₅ -PP	43 ± 15
C ₅₅ -PP	80 ± 24
UM5	77 ± 11

Une baisse significative (> 50 %) de l'activité mesurée peut être interprétée comme étant le résultat d'une interaction de la molécule testée avec l'enzyme. Parmi les cinq ligands potentiels criblés, seuls le C₅-PP et le C₁₅-PP ont induit une baisse significative de l'activité montrant ainsi une interaction probable entre ces deux molécules et la PaeM. Cependant, il est important de noter que la concentration en ligand utilisée lors de ces tests (1 mM) était nettement supérieure à celle en substrat (12,6 µM). Ce ligand a donc un effet inhibiteur relativement modéré.

2.2. Par microcalorimétrie :

La PaeM a pour substrat naturel le lipide II, mais elle est également capable de cliver le lipide I *in vitro* avec la même efficacité (Barreteau *et al.*, 2009b). L'hydrolyse du lipide I par la PaeM conduit à la formation de deux produits : l'undécaprénol et le 1-PP-MurNac-pentapeptide. Dans l'optique d'identifier un ligand soluble pour la PaeM, sa capacité d'interaction avec le 1-PP-MurNac-L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala a été étudiée par des expériences de microcalorimétrie.

La recherche d'une éventuelle interaction entre la PaeM et ce ligand a dans un premier temps été effectuée par la réalisation d'expériences de titration par calorimétrie isotherme (ITC) selon le protocole décrit dans la partie Matériels et Méthodes. Lors de ces essais, les mesures ont été effectuées avec des concentrations de PaeM comprises entre 20 et 70 µM et des concentrations en 1-PP-MurNac-L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala comprises entre 240 et 800 µM. Malheureusement, aucune interaction n'a pu être détectée dans les différentes conditions testées.

La détection d'une interaction entre la PaeM et ce ligand a ensuite été menée par le biais de la réalisation d'expériences de calorimétrie différentielle par balayage (DSC). La stabilité thermique de la protéine en absence ou en présence d'une concentration élevée de 1-PP-MurNac-L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala a ainsi été étudiée. Lors de ces essais, la protéine PaeM a été utilisée à une concentration de 15 µM et le ligand à une concentration finale de 75 ou 180 µM.

L'étude par DSC de la protéine seule a permis de déterminer sa température de demi-dénaturation (T_m) qui est de 54,46°C. L'analyse du thermogramme obtenu montre également que la dénaturation de la PaeM est irréversible. En effet, une agrégation est observée au dessus de 65°C, ce qui se traduit sur le thermogramme par une chute de la capacité calorifique vers des valeurs négatives (**Figure 73**). Il apparaît également que le pic est asymétrique et ne peut pas être lissé avec une simple transition correspondant au passage de la protéine d'un état natif à un état dénaturé en une seule étape. En effet, on remarque que le modèle proposé (courbe rouge) peut être décomposé en deux pics (courbes en pointillés). La présence de ces deux pics peut être le résultat de différents phénomènes :

- La protéine est composée de domaines qui ne se dénaturent pas de la même façon.

- La solution protéique n'est pas homogène (présence d'agrégats, protéine mal repliée, protéolyse d'une partie de la population).
- La protéine passe par un état intermédiaire lors de sa dénaturation.

Ces seuls résultats de DSC ne permettent pas de trancher entre ces différentes hypothèses. Cependant, au vu de la structure de la PaeM composée de trois domaines, il est possible d'imaginer que le domaine central et le domaine catalytique se dénaturent de manière indépendante, étant donné qu'une part importante du domaine N-terminal est intrinsèquement désordonnée.

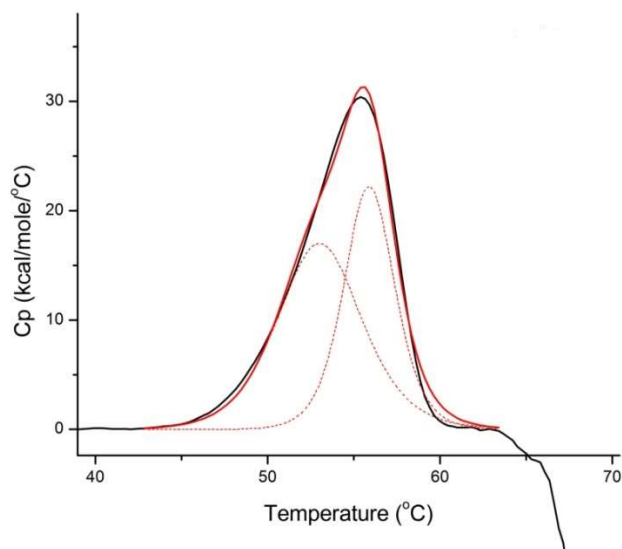


Figure 73 : Thermogramme de la PaeM seule. La courbe noire correspond à la courbe de dénaturation expérimentale de la protéine PaeM. La courbe rouge correspond au modèle de dénaturation lissé à partir des données expérimentales. Il apparaît que la dénaturation de la protéine PaeM ne se fait pas selon un modèle simple en une étape.

L'ajout du 1-PP-MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala dans la solution protéique n'a amélioré que très modérément la stabilité thermique de la protéine (**Figure 74**), puisque les T_m mesurés en présence de 75 μ M (courbe rouge) ou 180 μ M (courbe bleu) de ce ligand sont respectivement de 55,08°C et 55,28°C. Cette légère augmentation de la température de demi-dénaturation de la PaeM en présence du ligand n'est pas significative et ne permet pas de déterminer si une interaction s'établit entre la PaeM et le 1-PP-MurNAc-pentapeptide. De plus, les enthalpies de dénaturation (ΔH) qui correspondent à l'énergie nécessaire à la dénaturation de la protéine et sont mesurées par l'intégration de la surface des thermogrammes (ΔH_{cal}), montrent que l'énergie nécessaire à la dénaturation de la protéine en présence de ligand n'est pas supérieure à celle de la protéine seule (**Tableau 10**). Ce résultat va également dans le sens d'un effet stabilisateur très modéré du 1-PP-MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala sur la PaeM mais ne permet pas de conclure à une interaction entre la PaeM et le ligand.

Tableau 10 : Température de demi-dénaturation et enthalpies de dénaturation de la PaeM en absence ou en présence de 1-PP-MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala.

	T_m (°C)	ΔH_{cal} (kcal.mol ⁻¹)
--	---------------	-----------------------------------------------

PaeM	54,46	197
PaeM + 75 μ M 1-PP-MurNAc-pentapeptide	55,08	168
PaeM + 180 μ M 1-PP-MurNAc-pentapeptide	55,28	176

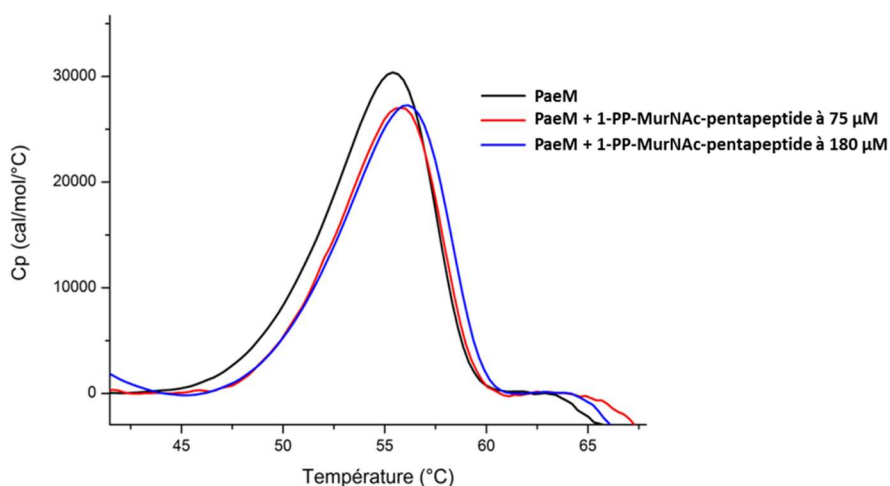


Figure 74 : Thermogramme de la PaeM en absence ou en présence de 1-PP-MurNAc-pentapeptide. La courbe noire correspond à la courbe de dénaturation de la protéine seule, la courbe rouge et la courbe bleue en présence de 75 μ M et 180 μ M de 1-PP-MurNAc-pentapeptide respectivement.

L'ensemble des résultats obtenus par microcalorimétrie ne permettent pas de mettre en évidence d'interaction entre la PaeM et le 1-PP-MurNAc-pentapeptide. Cette absence d'interaction observée peut avoir un lien avec le rôle physiologique de la protéine. En effet, la PaeM a pour but d'éliminer une cellule cible en interférant avec la biosynthèse du peptidoglycane par le biais de la dégradation du lipide II. Pour induire la lyse de la bactérie ciblée, elle doit donc *a priori* dégrader le maximum de molécules de lipide II de façon à empêcher la synthèse du peptidoglycane. Par conséquent, suite au clivage d'une molécule de lipide II, elle doit relarguer le plus rapidement possible les deux produits de dégradation de façon à réaliser un nouvel acte catalytique. Aucune inhibition de l'activité par le produit de dégradation ne doit donc être possible afin de permettre à la PaeM d'être la plus active possible.

Aux vues des différents résultats obtenus, à la fois par la réalisation des tests d'activité *in vitro* mais également par les expériences de microcalorimétrie, le C₁₅-PP qui possède l'effet inhibiteur le plus important dans les conditions testées est la molécule qui a été retenue pour effectuer les premiers essais de co-cristallisation de la protéine PaeM en présence d'un ligand.

3. Essais de co-cristallisation de la PaeM avec le C₁₅-PP :

Pour les essais de co-cristallisation, la solution protéique de PaeM a été concentrée à 15 mg.mL⁻¹, soit 0,45 mM, et le C₁₅-PP ajouté à une concentration finale de 5 mM. Le ligand a été mis en

excès par rapport à la protéine de façon à favoriser une interaction entre les deux partenaires au sein de la goutte de cristallisation. Ces essais ont été réalisés selon la technique de cristallisation par diffusion de vapeur en goutte assise sur des plaques de 96 puits. Afin de tester un maximum de conditions simultanément, un criblage automatisé a été réalisé sur les kits commerciaux suivants : « Classics », « PEGs », « MbClass », « JCSG+ » et « Protein Complex » (série NEXTAL de Qiagen). Des essais de cristallisation de la PaeM seule à 15 mg.mL⁻¹ ont également été menés en même temps, afin d'avoir un témoin de cristallisation.


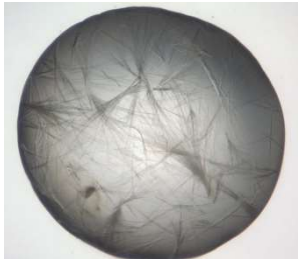

Ces essais ont permis d'obtenir des cristaux de la PaeM seule dans plusieurs conditions, présentées dans le **tableau 11**.

Tableau 11 : Conditions de cristallisation obtenues pour la PaeM seule.

Condition de cristallisation	Composition de la solution de cristallisation
Kit « Classics », condition H04	0,2 M MgCl ₂ 0,1 M Tris HCl pH 8,5 30 % PEG 4000
Kit « PEGs », condition F12	0,1 M MES pH 6,5 25 % PEG 2000 MME
Kit « Mb Class », condition D01	0,05 M Tris HCl pH 8,5 30 % PEG 400 0,05 M LiSO ₄
Kit « MbClass », condition D02	0,1 M HEPES sodium salt pH 7,5 48 % PEG 400
Kit « MbClass », condition H01	0,1 M Mg(CH ₃ COO) ₂ 0,1 M sodium citrate pH 5,6 8 % PEG 10 000
Kit « Protein Complex », condition F03	0,1 Mg(CH ₃ COO) ₂ 0,1 M MES pH 6,5 10 % PEG 10 000

Les essais menés sur la protéine PaeM en présence de C₁₅-PP ont permis l'obtention de cristaux dans trois conditions de cristallisation, présentées dans le **tableau 12**.

Tableau 12 : Conditions de cristallisation de la PaeM en présence de C₁₅-PP

Condition de Cristallisation	Composition de la solution de cristallisation	Image des cristaux
Kit « Classics », condition H04	0,2 M MgCl ₂ 0,1 M Tris HCl pH 8,5 30 % PEG 4000	
Kit « Protein Complex », condition E04	0,1 M HEPES pH 7 8 % PEG 8000	
Kit « Protein Complex », condition F03	0,1 Mg(CH ₃ COO) ₂ 0,1 M MES pH 6,5 10 % PEG 10 000	

La condition E04 du kit « Protein complex » a permis d'obtenir des cristaux entre le 40^{ème} et le 125^{ème} jour après le dépôt de la protéine. Ces cristaux correspondent à des clusters d'aiguilles. La condition F03 du même kit a permis l'obtention de cristaux entre le 40^{ème} et le 179^{ème} jour après le dépôt de la protéine. Cette condition a également permis de cristalliser la protéine seule. Les cristaux obtenus pour la protéine seule et ceux obtenus en présence de C₁₅-PP avaient le même aspect avec une forme de bâtonnet.

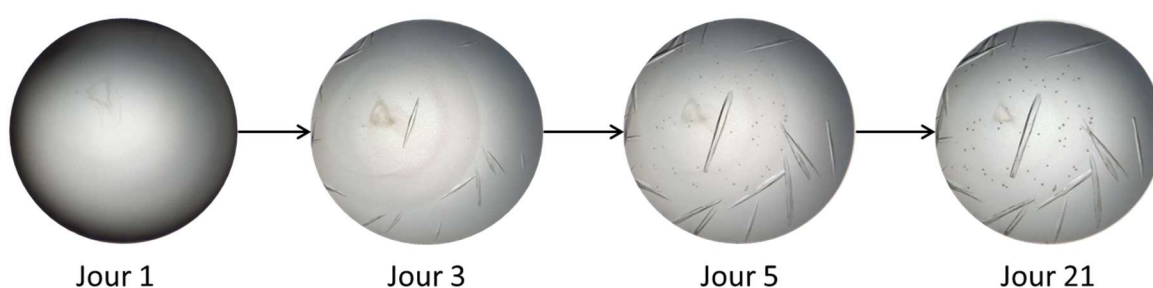
Par la suite, toutes les tentatives menées pour reproduire des cristaux dans les deux conditions mentionnées ci-dessus n'ont pas abouti. Par ailleurs, la cinétique d'apparition des cristaux dans ces conditions étant très longue, aucune optimisation n'a été engagée jusqu'à présent pour tenter d'obtenir des cristaux de meilleure qualité.

En revanche, la condition H04 du kit « Classics » a permis d'obtenir, en absence et en présence de C₁₅-PP, des cristaux d'une taille plus importante et au bout d'un temps plus court puisque les premiers cristaux étaient apparus au bout de 3 jours. Cette condition de cristallisation est celle dans

laquelle nous avons préalablement obtenu des cristaux ayant permis la résolution de la structure de la PaeM seule à haute résolution (1,7 Å) (Barreteau *et al.*, 2012b).

Des différences notables au niveau de la cristallogénèse de la PaeM seule ou en présence de C₁₅-PP ont été observées (**Figure 75**). En effet, la cinétique d'apparition est différente puisque les cristaux formés par la PaeM seule apparaissent au bout de 5 jours alors que ceux formés par la PaeM en présence de C₁₅-PP apparaissent dès 3 jours. La morphologie des cristaux formés est également très différente puisque les cristaux de la PaeM en présence du ligand présentent une forme régulière de navette alors que ceux obtenus avec la protéine seule présentent une forme relativement irrégulière. Ces deux informations concernant la cristallogénèse de la PaeM, avec ou sans ligand, suggèrent que la protéine en présence de C₁₅-PP ait pu cristalliser sous une forme complexée.

A



B

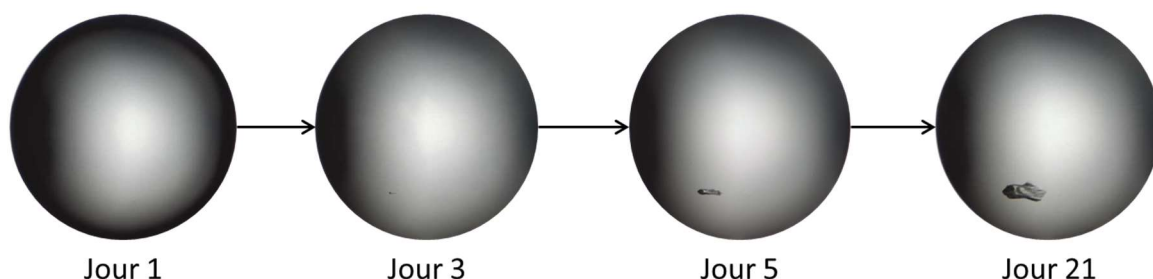


Figure 75 : Cinétique d'apparition des cristaux au sein de la condition H04 du kit « Classics » en présence (A) ou en absence (B) de C₁₅-PP.

Des optimisations autour de cette condition H04 ont été menées en faisant varier différents paramètres tels que le pH et/ou la concentration en PEG. Des tentatives de reproductibilité d'obtention des cristaux ont également été menées en utilisant la solution commerciale initiale. Lors de l'ensemble de ces essais, les mêmes concentrations en PaeM et en C₁₅-PP ont été utilisées.

Un jeu de données de diffraction aux rayons X a été collecté à 2,3 Å de résolution, sur la ligne ID23-2 à l'ESRF pour un cristal de PaeM co-cristallisé en présence de C₁₅-PP. Sa structure a été résolue par remplacement moléculaire en utilisant comme modèle initial la structure de la PaeM seule (code PDB : 4G75). Les cristaux ont diffracté dans le même groupe d'espace et les mêmes paramètres de maille que les cristaux de la PaeM seule (SG = P2₁2₁2₁, **a** = 42,96 Å ; **b** = 73,53 Å ; **c** = 100,38 Å ; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$) (Barreteau *et al.*, 2012b) et il n'a pas été observé de densité électronique résiduelle correspondant

au ligand. Donc, même si la protéine a été mise à cristalliser en présence de C₁₅-PP, les cristaux se sont avérés être des cristaux de protéine seule.

Bien que les premiers résultats aient été prometteurs, notamment suite à l'identification d'une condition ayant permis l'obtention de cristaux pour la PaeM en présence de C₁₅-PP au bout de seulement trois jours, l'analyse par diffraction aux rayons X a montré qu'il s'agissait de cristaux de la protéine seule. Ensuite, toutes les tentatives menées pour essayer d'obtenir à nouveau des cristaux ont échoué.

Face à ces résultats, il a été décidé de revoir la stratégie de cristallisation dans le but d'obtenir une structure en complexe avec un ligand :

- D'une part, la synthèse de nouveaux ligands. En effet, j'ai entrepris la synthèse de lipides II solubles afin de pouvoir les utiliser *in fine* lors de futurs essais de co-cristallisation (**cf Résultats § Synthèse de substrats solubles**). Ces derniers possèdent, en théorie, l'ensemble des déterminants nécessaires à la reconnaissance par la PaeM puisque seule la chaîne lipidique est différente.
- D'autre part, la production d'une forme inactive de la PaeM. J'ai produit le mutant catalytique D241A de façon à ce que ce dernier ne puisse pas hydrolyser les lipides II solubles lors des essais de co-cristallisation.

4. Essais de cristallogénèse de la protéine PaeM D241A :

Lors de l'étude fonctionnelle de la PaeM au laboratoire, plusieurs mutants ponctuels inactifs ont été construits (Barreteau *et al.*, 2012b). Parmi ces derniers, le mutant D241A était celui qui présentait la plus faible activité enzymatique puisque son activité catalytique *in vitro* ne représentait que 0,6 % de l'activité enzymatique de la protéine sauvage. Des essais de cristallisation de ce mutant ont donc été réalisés dans le but de déterminer des conditions reproductibles d'obtention de cristaux potentiellement utilisables par la suite lors d'essais de co-cristallisation avec un ligand.

4.1. Production et purification de la PaeM D241A :

Comme la protéine sauvage, le mutant D241A a été produit en contexte hétérologue dans la souche d'*E. coli* C43(DE3) transformée avec le plasmide pTTB240, exprimé avec une étiquette histidine en N-terminal et purifié selon le protocole utilisé en routine au laboratoire (Barreteau *et al.*, 2012b). La purification en deux étapes (chromatographie d'affinité sur résine Ni²⁺-NTA-agarose puis gel filtration) a permis d'obtenir de la PaeM D241A sous une forme homogène et mono-disperse, comme en témoignent le chromatogramme issu de la gel-filtration et le résultat du SDS-PAGE (**Figure 76, B et C**).

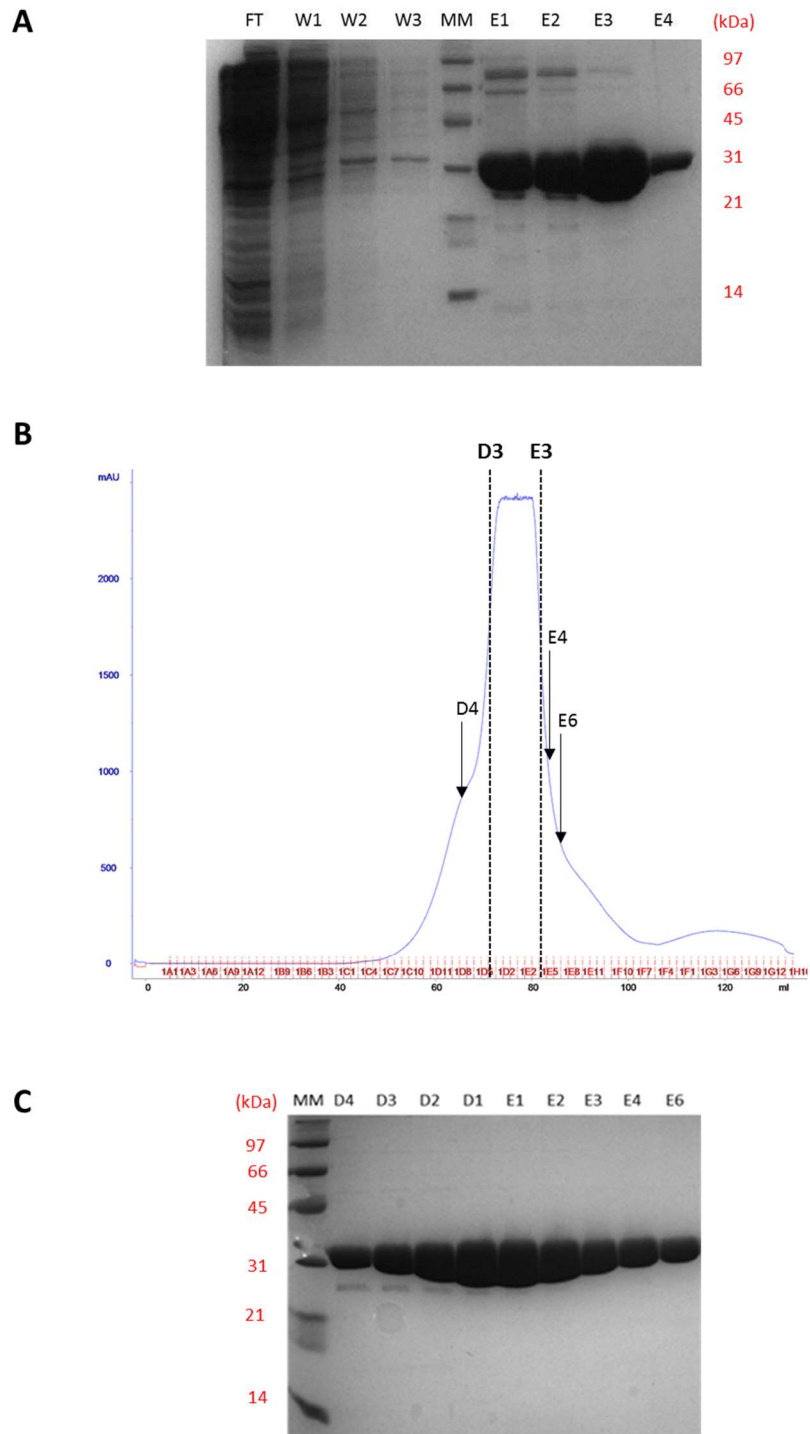


Figure 76 : Profil de purification de la protéine PaeM D241A. A : Profil électrophorétique de la PaeM D241A à l'issue de la chromatographie d'affinité. FT : Flow Through ; W1-W2 : Fractions de lavage à 20 mM d'imidazole ; W3 : Fraction de lavage à 40 mM d'imidazole ; E1-E4 : Fractions d'élutions à 200 mM d'imidazole. B : Chromatogramme d'exclusion stérique. C : Profil électrophorétique des différentes fractions d'élution issues de la chromatographie d'exclusion stérique. Les différentes fractions déposées correspondent à celles identifiées sur le chromatogramme. MM : marqueur de poids moléculaires. Les valeurs des poids moléculaires en kDa sont indiquées en rouge à côté des gels.

4.2. Cristallogénèse de la protéine PaeM D241A :

Pour ces essais de cristallogénèse, la PaeM D241A a été utilisée à trois concentrations différentes : 15,5, 7,8 et 3,9 mg.mL⁻¹. Un criblage automatisé selon la technique de diffusion de vapeur en goutte assise a été réalisé sur les 6 kits commerciaux suivants : Classics, AmSO4, MbClass, JCSG+, PEGs et PEGs II. Ces tests ont donc permis de tester 576 conditions de cristallisation différentes pour chaque concentration de protéine.

Des cristaux ont été obtenus dans plusieurs conditions. L'ensemble des résultats est regroupé dans le **tableau 13**.

Tableau 13 : Conditions de cristallisation de la PaeM D241A. Ce tableau indique, pour chaque condition de cristallisation, la composition de la solution de cristallisation ainsi que la concentration à laquelle la protéine a cristallisé. Les conditions écrites en rouge sont celles ayant permis l'obtention de cristaux qui ont été pêchés et analysés par diffraction aux rayons X.

Condition de cristallisation	Composition de la solution de cristallisation	[PaeM D241A]
Kit « Classics », condition H12	0,1 M MES pH 6,5 12 % PEG 20 000	15,5 mg.mL ⁻¹
Kit « MbClass », condition D10	0,02 M sodium citrate 0,1 M sodium dihydrogen phosphate pH 6,2 15 % PEG 2000	3,9 mg.mL ⁻¹
Kit « Mb Class », condition H04	0,1 M LiSO ₄ 0,1 M HEPES sodium salt pH 7,5 0,1 M potassium/sodium tartrate	15,5 mg.mL ⁻¹ 7,8 mg.mL ⁻¹
Kit « JCSG+ », condition B02	0,2 M sodium thiocyanate 20 % PEG 3350	7,8 mg.mL ⁻¹
Kit « JCSG+ », condition E08	1 M tri-sodium citrate 0,1 M sodium cacodylate pH 6,5	7,8 mg.mL ⁻¹
Kit « JCSG+ », condition G06	0,24 M sodium malonate pH 7,0 20 % PEG 3350	15,5 mg.mL ⁻¹ 7,8 mg.mL ⁻¹ 3,9 mg.mL ⁻¹
Kit « PEGs », condition A11	0,1 M MES pH 6,5 25 % PEG 1000	7,8 mg.mL ⁻¹

Kit « PEGs », condition E12	0,2 M ammonium iodide 20 % PEG 3350	15,5 mg.mL ⁻¹
Kit « PEGs », condition F06	0,2 M potassium nitrate 20 % PEG 3350	15,5 mg.mL ⁻¹ 7,8 mg.mL ⁻¹
Kit « PEGs », condition G10	0,2 M potassium sulfate 20 % PEG 3350	15,5 mg.mL ⁻¹ 7,8 mg.mL ⁻¹ 3,9 mg.mL ⁻¹
Kit « PEGs », condition H01	0,2 M potassium/sodium tartrate	15,5 mg.mL ⁻¹ 7,8 mg.mL ⁻¹ 3,9 mg.mL ⁻¹
Kit « PEGs II », condition B12	0,2 M LiSO ₄ 0,1 M TRIS pH 8,5 30 % PEG 3000	15,5 mg.mL ⁻¹ 7,8 mg.mL ⁻¹ 3,9 mg.mL ⁻¹
Kit « PEGs II », condition C07	0,2 M LiSO ₄ 0,1 M TRIS pH 8,5 16 % PEG 4000	15,5 mg.mL ⁻¹ 7,8 mg.mL ⁻¹
Kit « PEGs II », condition C11	0,2 M LiSO ₄ 0,1 M TRIS pH 8,5 20 % PEG 4000	15,5 mg.mL ⁻¹ 7,8 mg.mL ⁻¹
Kit « PEGs II », condition G01	0,01 M tri-sodium citrate 16 % PEG 6000	15,5 mg.mL ⁻¹
Kit « PEGs II », condition H09	0,05 M magnesium acetate 10 % PEG 8000 0,1 M sodium acetate	15,5 mg.mL ⁻¹

De manière intéressante, ce mutant ponctuel de la PaeM a cristallisé dans un nombre plus important de conditions que la protéine native, alors que ces deux protéines ont *a priori* une structure et des propriétés physico-chimiques très proches. Parmi l'ensemble des conditions identifiées, les cristaux issus des conditions F06 du kit « PEGs », H04 et D10 du kit « MbClass » (**Figure 77**) ont été analysés par diffraction aux rayons X. Ils ont diffracté respectivement à une résolution de 2,45 Å, 3,6 Å

et 2,04 Å et un jeu de données a été collecté dans chaque cas. Il est important de noter que la condition D10 du kit « MbClass » a permis d'obtenir deux types de cristaux au sein de la même goutte de cristallisation : des cristaux en forme de baguettes et des cristaux cubiques (**Figure 77, B**). Ce sont ces derniers pour lesquels un jeu de données a été collecté.

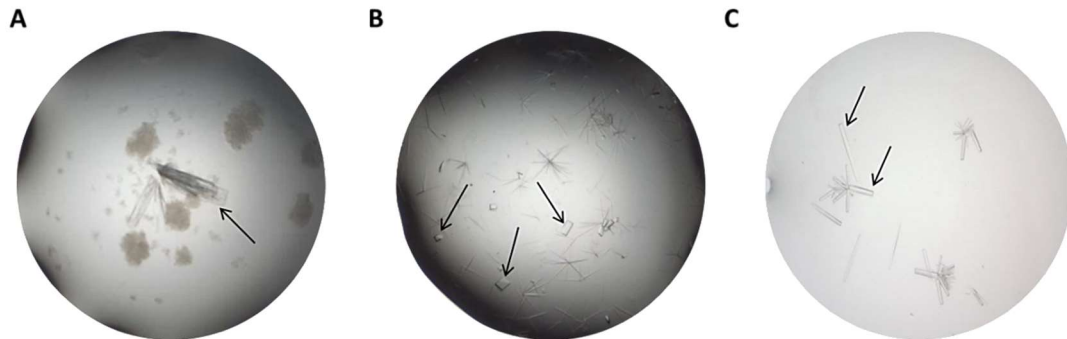


Figure 77 : Images des cristaux de la PaeM D241A. A : Cristaux obtenus dans la condition F06 du kit « PEGs » avec la protéine à 15,5 mg.mL⁻¹. B : Cristaux obtenus dans la condition D10 du kit « MbClass » avec la protéine à 15,5 mg.mL⁻¹. C : Cristaux obtenus dans la condition H04 du kit « MbClass » avec la protéine à 7,8 mg.mL⁻¹. Les flèches indiquent les cristaux qui ont été pêchés.

La structure de la PaeM D241A a été résolue par remplacement moléculaire en prenant comme modèle la structure de la protéine PaeM native résolue préalablement (code PDB : 4G76). La structure est représentée dans la **figure 78**.

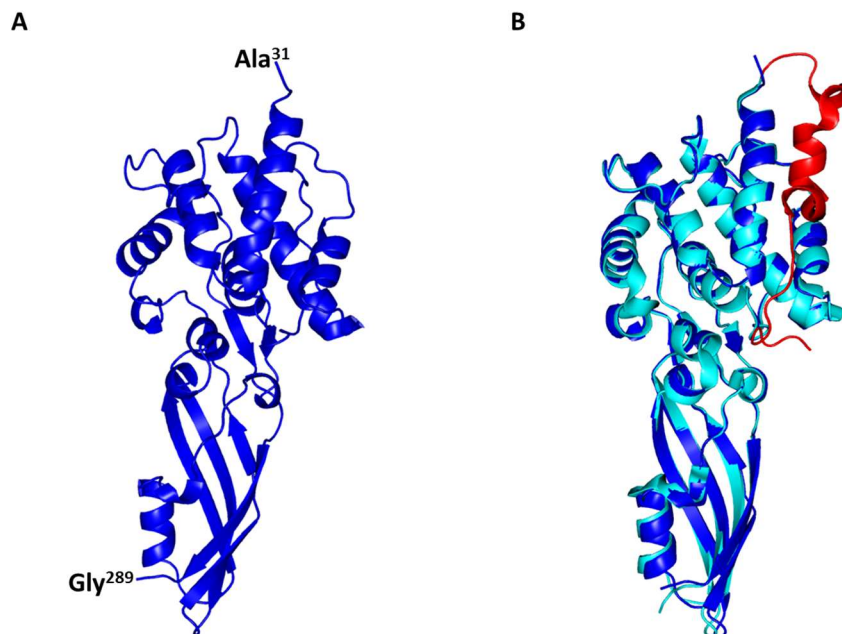


Figure 78 : Structure tridimensionnelle du mutant catalytique PaeM D241A. A : Structure tridimensionnelle de la PaeM D241A. Les résidus N- et C-terminaux sont indiqués. B : Superposition de la PaeM D241A (en bleu marine) avec la PaeM (en turquoise). Les résidus 1 à 30 absents de la structure de la PaeM D241A sont représentés en rouge au sein de la structure de la PaeM sauvage. Les deux structures sont représentées en cartoon.

La comparaison des structures de la PaeM native et du mutant catalytique D241A par superposition des C α des résidus 31 à 289 donne un RMSD de 0,45 Å. Ceci a permis de confirmer que ces deux protéines avaient des structures quasi-identiques et que la très faible activité de ce mutant ponctuel (Barreteau *et al.*, 2012b) n'était pas due à un changement de conformation de la protéine mais bien à la perte de la chaîne latérale d'un acide aminé essentiel à son activité.

Pourtant, l'étude plus fine de la structure de la PaeM D241A a permis de mettre en évidence deux différences notables par rapport à la structure de la protéine sauvage :

- D'une part, les trente premiers résidus ne sont pas visibles dans la structure de la PaeM D241A (**Figure 78, B**). Ce phénomène a également été observé pour les structures du mutant cristallisé dans les deux autres conditions de cristallisation.
- D'autre part, l'ion Mg²⁺, présent au sein du site actif de la PaeM sauvage et coordonné par la chaîne latérale du résidu D241 est également absent.

Deux facteurs différents peuvent être à l'origine de la disparition de l'ion Mg²⁺ au sein du site actif de la PaeM D241A :

- Soit l'absence d'ions Mg²⁺ dans les conditions de cristallisation du mutant D241A. Ceci avait déjà été observé lors de l'étude de la PaeM sauvage, où la structure de deux formes, « formate » et « Mg²⁺ », avaient été résolues. L'ion Mg²⁺ était observé seulement dans la forme « Mg²⁺ » qui avait été cristallisée en présence de 200 mM de MgCl₂.
- Ou bien la mutation générée est à l'origine de la désorganisation du réseau de coordination de l'ion Mg²⁺ qui ne peut alors plus être maintenu au sein du site actif.

Les cristaux de la forme « Mg²⁺ » de la PaeM sauvage ont été obtenus dans une solution de cristallisation qui contenait une concentration finale en Mg²⁺ de 200 mM. En revanche, les solutions de cristallisation ayant permis l'obtention des cristaux de PaeM D241A ne contenaient pas de Mg²⁺, ce qui pouvait être à l'origine de la disparition de cet ion au sein du site actif. Cependant, Grinter et ses collaborateurs ont montré que le cation divalent (Ca²⁺) coordonné par la chaîne latérale du résidu D232 de la PsyM, équivalent au résidu D241 de la PaeM, disparaissait également au sein de la structure de la forme mutante PsyM D232A, bien que les cristaux aient été obtenus dans des conditions identiques pour ces deux formes protéiques, en présence de Ca²⁺ à une concentration finale de 30 mM (Grinter *et al.*, 2012b). Aux vues de ces observations, on peut conclure que la disparition de l'ion Mg²⁺ serait le résultat de la mutation générée.

L'ion Mg²⁺ est coordonné de manière hexaédrique au sein de la PaeM sauvage. Il établit des liaisons hydrogène avec la chaîne latérale du résidu D241, avec le groupement carboxyle de la chaîne principale du résidu V211, avec le groupement carboxyle de la chaîne principale du résidu E213, ainsi qu'avec trois molécules d'eau. La mutation de l'aspartate 241 en alanine désorganise complètement le réseau de coordination, ne permettant plus le maintien de l'ion Mg²⁺ au sein du site actif (**Figure 79**).

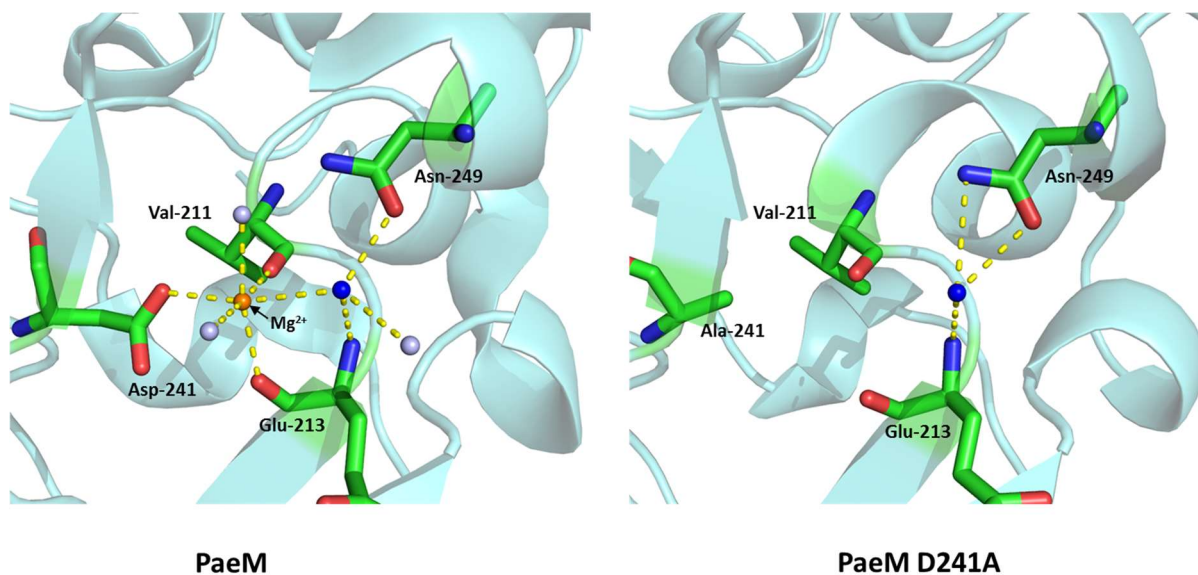


Figure 79 : Comparaison des sites actifs des protéines Paem et Paem D241A. La figure de gauche illustre la coordination hexaédrique de l'ion Mg^{2+} (sphère orange) par les résidus D241, E213, et V211 ainsi que par trois molécules d'eau (sphères gris clair et bleu foncé). La figure de droite illustre la disparition de l'ion Mg^{2+} au sein du site actif de la Paem D241A suite à la mutation. On note la présence d'une molécule d'eau conservée et structurée (sphère bleu foncée) au sein des deux sites actifs. Les liaisons hydrogène permettant la coordination de l'ion Mg^{2+} ainsi que la structuration de la molécule d'eau conservée sont représentées par des pointillés jaunes. Un code couleur a été attribué pour les atomes : C : vert ; O : rouge ; N : bleu.

Il est intéressant de noter que l'une des trois molécules d'eau impliquées dans la coordination de l'ion Mg^{2+} est toujours présente au sein de la structure de la Paem D241A. La conservation de cette dernière, malgré la disparition du réseau de coordination, suggère qu'elle possède un rôle particulier en ce qui concerne le clivage du lipide II.

Encore non élucidé, le mécanisme catalytique de la ColM et de ses homologues pourrait s'opérer en une ou deux étapes. Dans le mécanisme en une étape, une molécule d'eau préalablement activée par un résidu du site actif cliverait le lipide II. La molécule d'eau structurée identifiée au sein de la structure de la Paem D241A pourrait alors jouer ce rôle. Suite à l'identification des résidus essentiels à l'activité de la ColM au laboratoire (Barreteau *et al.*, 2010), et aux vues de leur nombre et de leur nature, le mécanisme en deux étapes semble plus favorable. La liaison phosphodiester serait alors attaquée par un résidu catalytique (histidine ou aspartate) aboutissant ainsi à la formation d'un intermédiaire covalent (E-PP-MurNAc(-pentapeptide)-GlcNAc) de type phosphohistidine ou aspartyl-phosphate, et à la libération concomitante de l'undécaprénol. Une seconde attaque nucléophile serait alors réalisée par une molécule d'eau sur cet intermédiaire afin de libérer le second produit. Ce modèle nécessite également la présence d'un acide aminé jouant le rôle à la fois d'un acide pour fournir le proton nécessaire à la libération de l'undécaprénol, et de base pour activer la molécule d'eau responsable de la seconde attaque nucléophile. Le résidu H235 de la ColM (H250 dans la Paem) pourrait jouer ce rôle.

Un mécanisme similaire en deux étapes a été proposé par Grinter et ses collaborateurs lors de la résolution de la structure de la PsyM, par analogie avec le mécanisme catalytique des phosphatases appartenant à la famille des haloacides déshydrogénases (Grinter *et al.*, 2012b). Les cations divalents, coordonnés respectivement par les chaînes latérales des résidus D232 chez PsyM et D241 chez Paem, seraient alors impliqués dans la coordination et le positionnement correct du groupement

pyrophosphate du lipide II au sein des sites actifs respectifs des enzymes, de manière à ce que ce dernier puisse subir une attaque nucléophile. Dans le modèle proposé par Grinter et ses collaborateurs, cette attaque serait effectuée par le résidu D235 (D244 pour la PaeM), également identifié comme essentiel à l'activité. Elle aboutirait alors à la formation d'un intermédiaire covalent de type aspartyl-phosphate et à la libération concomitante d'undécaprénol. Cet intermédiaire serait alors hydrolysé par une molécule d'eau permettant la libération dans le milieu du 1-PP-MurNAc(-pentapeptide)-GlcNAc. Le résidu H241 (H250 pour la PaeM) jouerait alors le rôle d'acide dans un premier temps pour fournir le proton à l'undécaprénol lors de sa libération, puis le rôle d'une base en arrachant un proton à la molécule d'eau responsable de la seconde attaque. Les auteurs ont également proposé que les rôles des résidus D235 et H241 puissent être inversés.

La molécule d'eau structurée que nous avons identifiée au sein de la structure de la PaeM D241A constituerait donc la molécule responsable de la seconde attaque nucléophile évoquée dans les deux modèles cités ci-dessus. Par ailleurs, le positionnement de la chaîne latérale du résidu D244 au sein du site actif semble correct pour pouvoir réaliser l'attaque nucléophile de la liaison phosphodiester. La chaîne latérale de ce résidu est en effet orientée en direction de l'ion Mg^{2+} . En revanche, l'orientation de la chaîne latérale du résidu H250 ne semble pas en mesure de jouer son rôle d'acide et de base, étant spatialement trop éloignée de la molécule d'eau conservée (**Figure 80**). Par ailleurs, il a été montré que la mutation de ce résidu en alanine n'affectait que modérément l'activité *in vitro* et *in vivo* de la PaeM, démontrant ainsi qu'il n'était pas essentiel à l'activité de cet homologue (Barreteau *et al.*, 2012b). Cependant, un réarrangement conformationnel du site actif à la liaison du substrat n'est pas à exclure. Un tel réarrangement pourrait par exemple permettre le rapprochement de l'histidine H250 des autres résidus et de l'ion Mg^{2+} . A partir de ces observations et des données de la littérature, un mécanisme putatif de coupure en deux étapes du lipide II par la PaeM a été proposé, qui est présenté dans la **figure 81**.

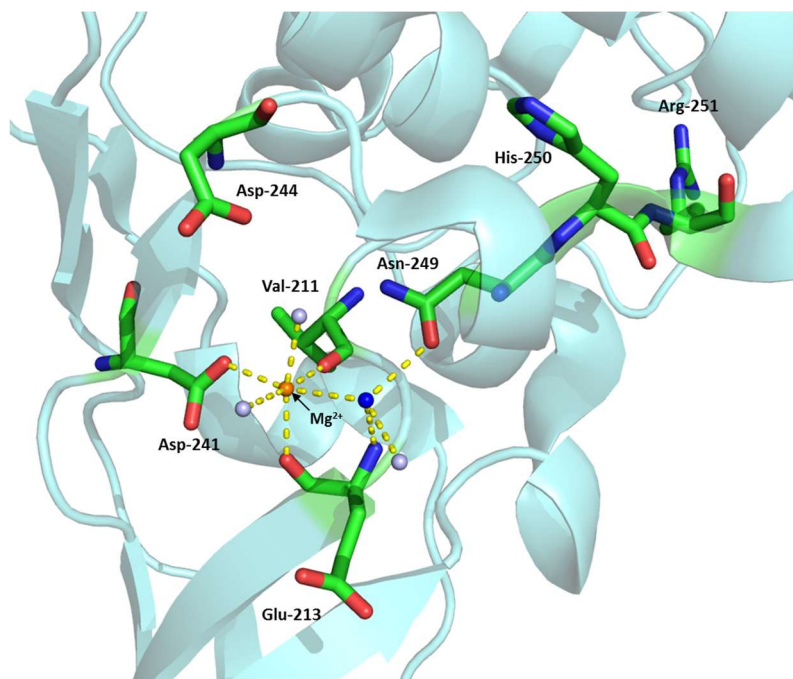


Figure 80 : Site actif de la PaeM. L'ion Mg^{2+} (sphère orange) est coordonné en partie par la chaîne latérale du résidu D241, essentiel à l'activité de la protéine. Les résidus V211 et E213, également impliqués dans la coordination de ce cation divalent, sont également représentés tout comme les résidus conservés D244, H250 et R251 ainsi que le résidu N249 impliqué dans la fixation de la molécule d'eau structurée.

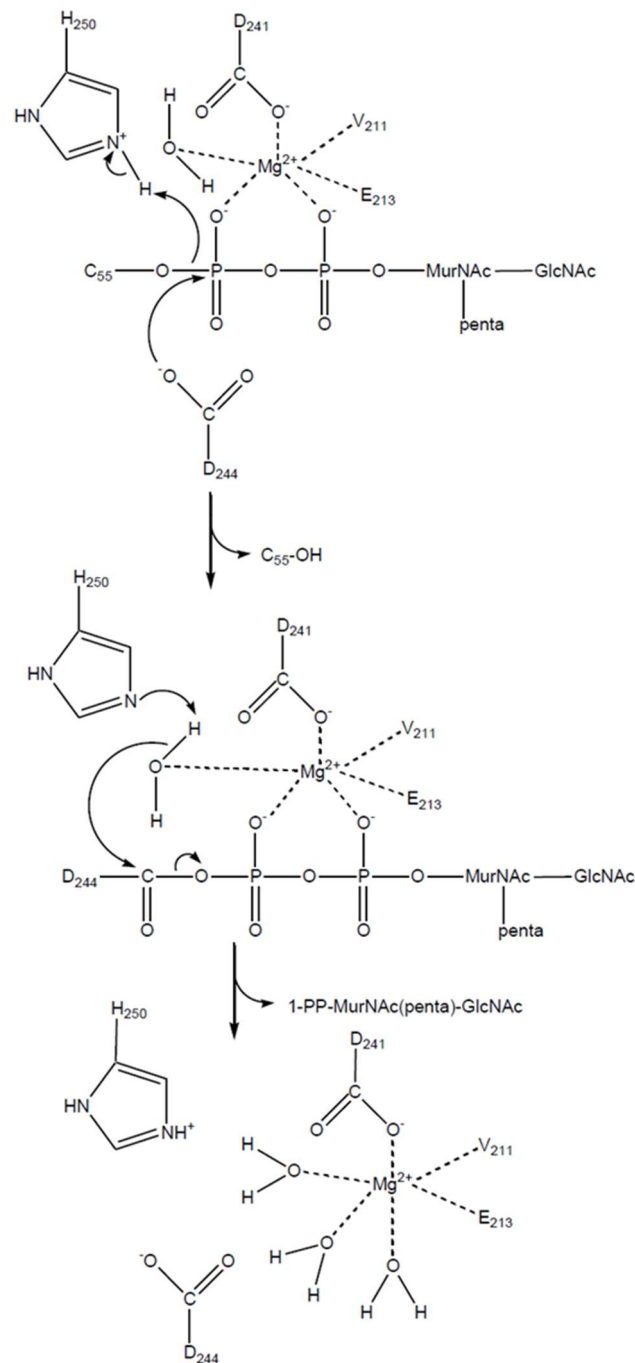


Figure 81 : Mécanisme putatif de coupure du lipide II en deux étapes par la PaeM.

Enfin, le résidu N249, impliqué dans la coordination de la molécule d'eau conservée, n'est pas essentiel à l'activité puisque sa mutation en alanine n'affecte en rien l'activité de la protéine (Barreteau *et al.*, 2012b). Cette molécule d'eau conservée fait cependant partie d'un réseau de coordination développé (**Figure 80**) et la suppression d'une seule liaison impliquée dans sa coordination ne semblerait donc pas avoir d'impact sur son positionnement. L'obtention de la structure tridimensionnelle de la protéine PaeM N249A pourrait permettre de répondre à cette interrogation.

L'obtention de la structure du mutant D241A de la PaeM a donc permis d'assigner à la molécule d'eau structurée un rôle potentiel dans l'hydrolyse du lipide II. Afin de lever les incertitudes restantes, l'obtention d'une structure en présence d'un ligand apparait donc plus que jamais essentielle.

En parallèle de la résolution de cette structure, des optimisations autour des trois conditions ayant permis l'obtention des cristaux qui ont diffractés ont été menées dans le but d'améliorer la qualité des cristaux mais surtout pour tester la reproductibilité d'obtention de ces derniers. Ces optimisations ont été réalisées selon la technique de diffusion de vapeur en goutte assise dans des boîtes de 96 puits, en faisant varier le pH et la concentration en PEG. Les concentrations protéiques utilisées étaient identiques à celles utilisées lors du criblage automatisé. L'optimisation de la condition D10 du kit « MbClass » a permis la genèse de cristaux dans de nombreuses conditions. Cependant, seuls des cristaux en forme de baguette ont été obtenus. Pour rappel, la condition initiale avait permis l'apparition simultanée de cristaux à la fois en forme de baguette mais également de cristaux cubiques. Or, ce sont ces derniers qui avaient été pêchés et qui avaient permis l'obtention du jeu de données à 2,04 Å. Par ailleurs, l'optimisation des conditions H04 du kit « MbClass » et F06 du kit « PEGs » n'a pas permis d'obtenir de cristaux, ou alors des cristaux non exploitables.

Des essais de co-cristallisation de la PaeM D241A en présence de C₁₅-PP ont également été entrepris dans des conditions identiques à celles utilisées lors de l'optimisation de la condition D10 du kit « MbClass ». Ces essais ont été réalisés sur la protéine PaeM D241A à une concentration de 15,5 mg.mL⁻¹, soit 0,46 mM, en présence de 4,8 mM de C₁₅-PP et sur la PaeM D241A à 7,8 mg.mL⁻¹, soit 0,24 mM, en présence de 3,2 mM de C₁₅-PP. Un témoin de cristallisation a également été réalisé avec la protéine seule à 7,8 mg.mL⁻¹. Aucun cristal n'a été obtenu lors de ces essais, y compris pour la protéine seule qui avait pourtant cristallisé dans ces mêmes conditions auparavant.

L'ensemble des essais de cristallogenèse qui ont été menés jusque-là ont permis de mettre en évidence un problème récurrent quant à la reproductibilité d'obtention des cristaux, que ce soit pour la PaeM sous sa forme sauvage ou mutante, en présence ou en absence de C₁₅-PP. Or, il apparait dans la structure de la PaeM D241A que les 30 premiers résidus sont absents (**Figure 78**). En effet, aucune densité électronique n'a été observée dans cette région lors de la résolution de la structure. L'absence de densité électronique au sein d'une structure tridimensionnelle de protéine est très souvent le signe d'une grande flexibilité pour la région concernée. Le facteur de température correspondant à cette même région N-terminale au sein de la ColM est d'ailleurs particulièrement élevé par rapport à celui du reste de la molécule (Zeth *et al.*, 2008). Cette flexibilité accrue au niveau de la région N-terminale de la PaeM pourrait être à l'origine du caractère aléatoire concernant sa cristallisation.

Ceci nous a ainsi conduit à envisager la construction d'une forme tronquée en N-terminal de la PaeM.

5. Etude structurale d'une forme tronquée en N-terminal de la PaeM :

Les résultats décrits ci-dessous et portant sur la construction d'une forme tronquée de la protéine PaeM ont été obtenus par Thomas PARIS, un étudiant en BTS que j'ai encadré sur une durée totale de quatre mois lors de ses stages de première et deuxième année.

5.1. Genèse d'une forme tronquée par protéolyse ménagée :

Afin d'éliminer des zones flexibles empêchant la cristallisation d'une protéine, il est possible de réaliser des expériences de cristallogenèse en présence de protéases directement au sein de la goutte de cristallisation. Dans ces conditions, la protéase est présente en quantité très minoritaire par rapport à la protéine d'intérêt. Il faut cependant utiliser une protéase qui ne dégrade pas intégralement la protéine d'intérêt. Des essais de protéolyse ménagée doivent donc être menés en amont.

Ainsi, trois protéases différentes (trypsine, chymotrypsine et protéinase K) classiquement utilisées lors de ce type d'expériences ont été testées afin d'obtenir une forme tronquée en N-terminal de la protéine PaeM. Pour chaque protéase, différents ratios molaires de PaeM:protéase, différents temps et différentes températures d'incubation ont été expérimentés. Des profils de digestion distincts ont été obtenus pour chaque protéase utilisée (**Figure 82**).

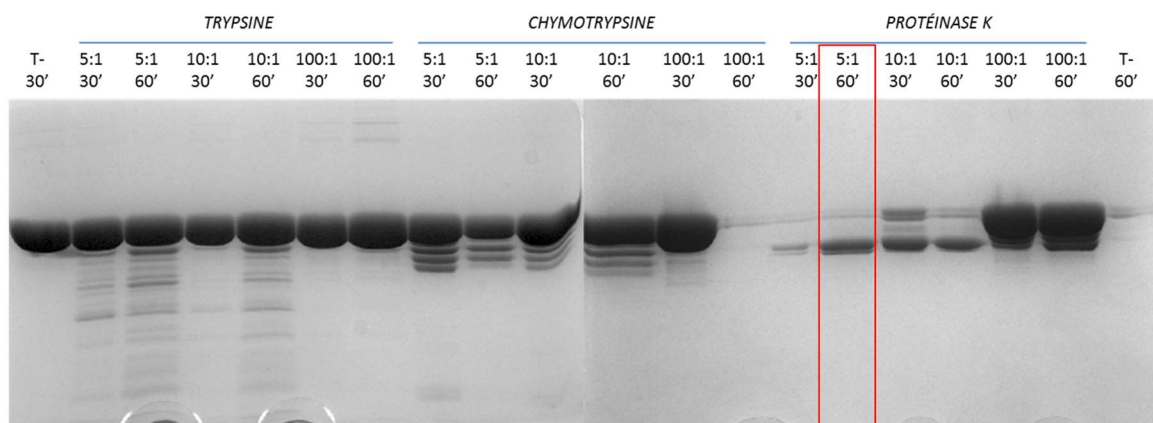


Figure 82 : Profils de digestion de la PaeM par les protéases trypsine, chymotrypsine et protéinase K. Les profils de digestion présentés ont tous été obtenus à 37°C. Les ratios PaeM:protéase ainsi que les temps de digestion sont indiqués au dessus de chaque piste pour chacune des protéases. T- : Incubation de la PaeM pendant 30 min à 37°C. La meilleure condition de protéolyse ménagée est encadrée en rouge.

Pour l'ensemble des conditions testées, les profils de digestion issus des essais menés avec la trypsine et la chymotrypsine n'étaient pas satisfaisants. En effet, un trop grand nombre de fragments protéiques était généré suite à la digestion de la PaeM par ces deux protéases. En revanche, les conditions de protéolyse ménagée par la protéinase K ont permis de montrer que, pour un ratio molaire PaeM : protéinase K de 5:1 et une digestion d'une heure à 37°C, une forme protéique majoritaire, avec un poids moléculaire d'environ 30 kDa, était obtenue.

Par la suite, pour déterminer si le clivage protéolytique avait bien dégradé la protéine étiquetée en C-terminal, dans sa région N-terminale, une étape de purification sur résine Ni-NTA-

agarose a été effectuée à l'issue de la digestion. Les différentes fractions issues de cette purification ont été analysées par SDS-PAGE (**Figure 83**).

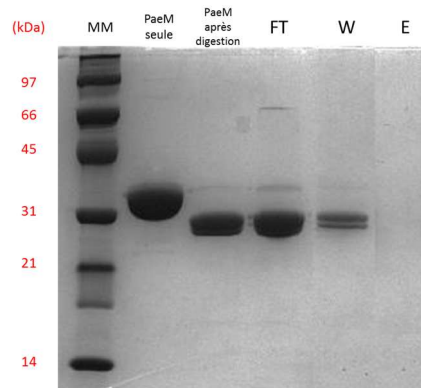


Figure 83 : Profil de purification de la PaeM à l'issue de la protéolyse ménagée par la protéinase K. La protéine PaeM a été purifiée par chromatographie d'affinité à l'issue de l'étape de protéolyse ménagée par la protéinase K pendant 60 min à 37°C avec un ratio PaeM:protéinase K de 5:1. FT : Fraction non retenue lors de la chromatographie d'affinité. W : Fraction de lavage à 20 mM d'imidazole. E : Fraction d'élution à 200 mM d'imidazole. MM : Marqueurs de poids moléculaires.

Il apparaît que la protéine digérée n'est pas retenue sur la colonne, suggérant ainsi que la protéinase K a clivé la protéine en C-terminal entraînant ainsi la perte de son étiquette histidine. Cependant, il est impossible de dire à partir de ce résultat si la PaeM a également été digérée en N-terminal puisqu'aucun séquençage n'a été effectué.

Ces expériences de protéolyse ménagée n'ont donc *a priori* pas permis d'obtenir la forme protéique souhaitée. Par conséquent, nous avons décidé de construire une forme de la PaeM tronquée en N-terminal de ses trente premiers résidus (PaeM Δ 1-30) par une approche de biologie moléculaire.

5.2. Construction de la protéine PaeM Δ 1-30 :

La séquence codant pour la protéine PaeM Δ 1-30 a été clonée soit au sein d'un plasmide pET2130 permettant l'ajout d'une étiquette His₆ en N-terminal (extension Met-His₆-Gly-Ser) soit au sein d'un plasmide pET2160 permettant l'ajout d'une étiquette His₆ en C-terminal (extension Arg-Ser-His₆). Les plasmides pET2130 *paeM* Δ 1-30 et pET2160 *paeM* Δ 1-30 ont été construits selon le protocole décrit dans la partie Matériels et Méthodes. Les poids moléculaires théoriques des protéines PaeM Δ 1-30 possédant l'étiquette His₆ en N- ou en C-terminal ont été calculés à l'aide du serveur *protparam* (<http://web.expasy.org/protparam/>) et déterminés respectivement à 29 976 Da et 30 075 Da.

5.3. Production et purification de la PaeM Δ 1-30 :

5.3.1. Mise au point des conditions de production :

Dans un premier temps, les meilleures conditions de production de la PaeM Δ 1-30 ont été déterminées de façon à obtenir une quantité suffisante de protéine soluble et pure. Différents tests d'expression de la protéine PaeM Δ 1-30 comportant l'étiquette histidine en N- ou C-terminal ont donc été réalisés, en culture de 50 mL.

L'objectif initial étant de produire une forme protéique de la PaeM dont la séquence débute au 31^{ème} acide aminé, les premiers essais de production ont été menés sur la protéine possédant l'étiquette His₆ en C-terminal. La souche d'*E. coli* C43(DE3) a été transformée par le plasmide pET2160

paeM $\Delta 1-30$ et la surproduction de la protéine a été induite par différentes concentrations en inducteur (1 mM, 0,5 mM ou 0,1 mM IPTG) et à différentes températures (37°C, 22°C ou 15°C). Les surproductions à 22°C et 15°C ont été menées sur la nuit, celle à 37°C effectuée sur trois heures. A l'issue des surproductions, des purifications par chromatographie d'affinité sur résine Ni²⁺-NTA-agarose ont été effectuées selon le protocole décrit précédemment. Les profils de purification en fonction des différentes conditions de production sont présentés dans la **figure 84**.

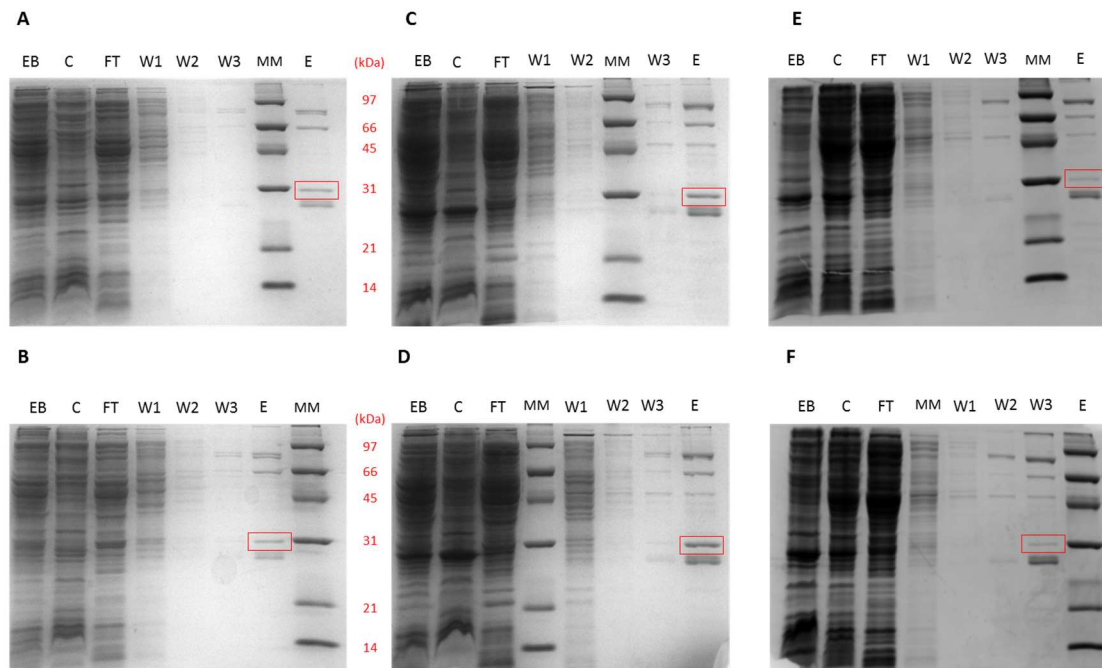


Figure 84 : Profils de purification de la protéine PaeM $\Delta 1-30$ (étiquette histidine en C-terminal) produite selon différentes conditions. A-F : Les températures de surproduction et la concentration en inducteur utilisées sont respectivement de 37°C, 1 mM (A) ; 37 °C, 0,5 mM (B) ; 22°C, 1 mM (C) ; 22°C, 0,5 mM (D) ; 15°C, 1 mM (E) ; 15°C, 0,1 mM (F). EB : Extrait brut ; C : Culot ; FT : Fraction non retenue ; W1-W2 : Fractions de lavage à 20 mM d'imidazole ; W3 : Fraction de lavage à 40 mM d'imidazole ; E : Fraction d'éluion à 200 mM d'imidazole ; MM : Marqueurs de poids moléculaires (en kDa, valeurs en rouge). La protéine d'intérêt est encadrée en rouge.

L'ensemble des conditions testées n'a pas permis de produire la protéine en quantité suffisante sous forme soluble pour pouvoir envisager des essais de cristallogénèse. Par conséquent, de nouveaux essais de production de la protéine, possédant cette fois l'étiquette histidine en N-terminal, ont été entrepris pour tenter d'accroître cette production. La souche C43(DE3) a été transformée par le plasmide pET2130 *paeM* $\Delta 1-30$ et la surproduction de la protéine a été effectuée à différentes températures (37°C, 30°C et 22°C) par induction avec 1 mM d'IPTG. Comme précédemment, les surproductions à 30°C et 22°C ont été menées sur la nuit et celle à 37°C pendant trois heures. Puis, à l'issue des surproductions, des purifications par chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA-agarose ont été réalisées. Les profils de purification en fonction des différentes conditions de production testées sont présentés dans la **figure 85**.

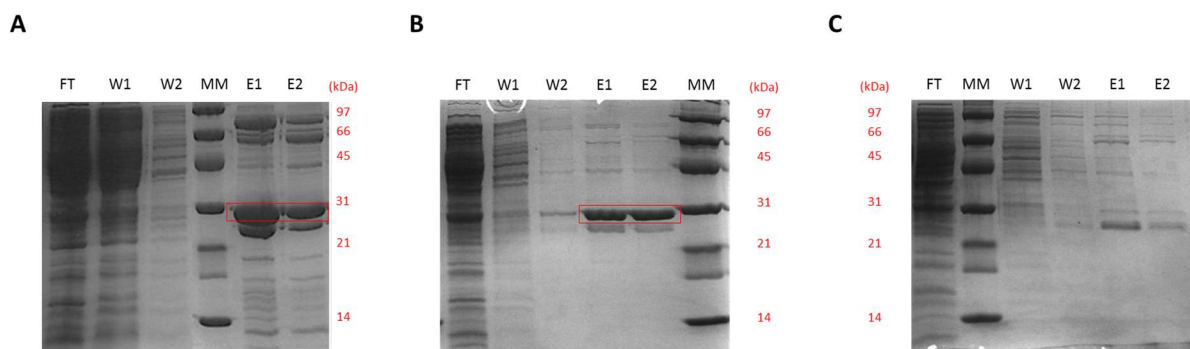


Figure 85 : Profils de purification de la protéine PaeM Δ 1-30 possédant l'étiquette His₆ en N-terminal produite selon différentes conditions. A-C : Les températures de surproduction et la concentration en inducteur utilisées sont respectivement de 37°C, 1 mM (A) ; 30°C, 1 mM (B) ; 22°C, 1 mM (C). FT : Fraction non retenue ; W1 : Fraction de lavage à 20 mM d'imidazole ; W2 : Fraction de lavage à 40 mM ; E1-E2 : Fractions d'élution à 200 mM d'imidazole ; MM : Marqueurs de poids moléculaires (en kDa). La protéine d'intérêt est encadrée en rouge.

L'analyse des différents profils de purification montre que la présence de l'étiquette histidine en N-terminal améliore de façon significative la production de la protéine sous forme soluble. Les meilleures conditions de production de la PaeM Δ 1-30 ont été obtenues lors d'une expression sur la nuit à 30°C, après l'ajout de l'inducteur à une concentration finale de 1 mM. Dans ces conditions B, la quantité de protéine recueillie est plutôt conséquente (plus qu'en C) et sa pureté très satisfaisante (plus qu'en A).

Il est important de noter que le positionnement de l'étiquette histidine en N-terminal a conduit à l'ajout d'une extension Met-His₆-Gly-Ser en amont du 31^{ème} résidu de la PaeM et la séquence de la protéine produite ne débute donc pas par ce résidu. Pour la suite du manuscrit, la mention « PaeM Δ 1-30 » fera référence cette protéine produite à partir du pET2130 *paeM* Δ 1-30 et qui possède l'étiquette histidine en N-terminal.

5.4. Surproduction et purification de la PaeM Δ 1-30 :

Suite à sa surproduction, la protéine PaeM Δ 1-30 a été purifiée, comme les autres variants, en deux étapes, par chromatographie d'affinité sur résine Ni²⁺-NTA-agarose puis par chromatographie d'exclusion stérique. Les profils électrophorétiques en conditions dénaturantes et réductrices de la PaeM Δ 1-30 à l'issue de chaque étape de purification, ainsi que le chromatogramme issu de la gel-filtration, sont présentés dans la **figure 86**.

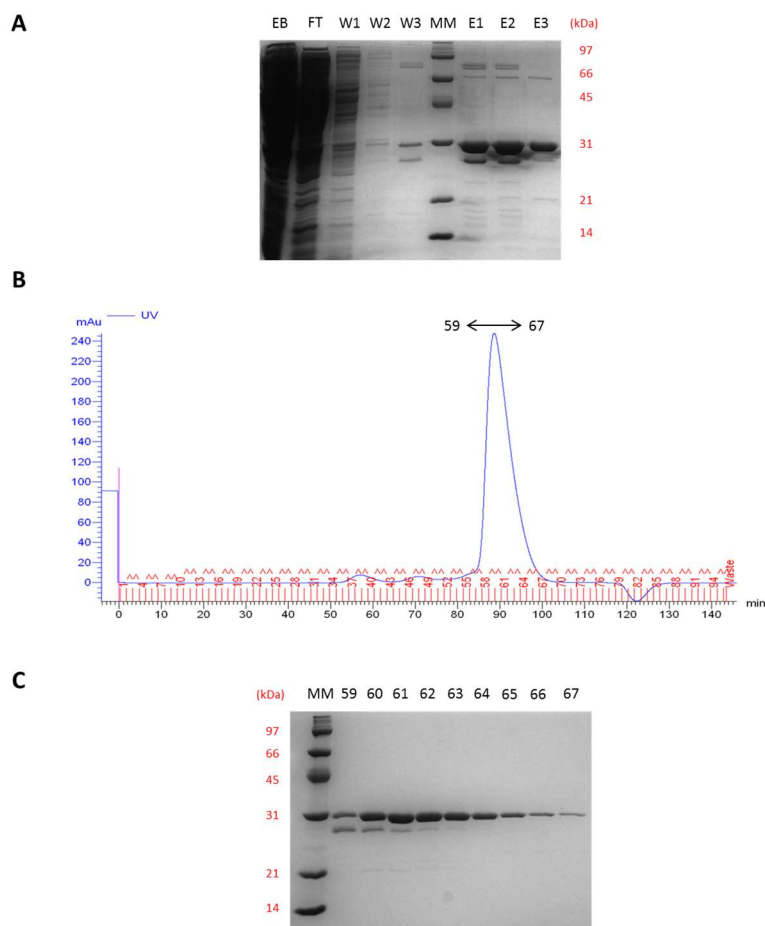


Figure 86 : Profil de purification de la protéine Paem Δ 1-30. A : Profil électrophorétique de la Paem Δ 1-30 à l'issue de la chromatographie d'affinité. EB : Extrait Brut ; FT : Fraction non retenue ; W1-W2 : Fractions de lavage à 20 mM d'imidazole ; W3 : Fraction de lavage à 40 mM d'imidazole ; E1-E3 : Fractions d'élution à 200 mM d'imidazole. B : Chromatogramme d'exclusion stérique. C : Profil électrophorétique des différentes fractions d'élution issues de la chromatographie d'exclusion stérique. Les différentes fractions déposées correspondent à celles identifiées sur le chromatogramme. MM : Marqueurs de poids moléculaires(en kDa).

L'analyse par SDS-PAGE des fractions d'élution issues de la chromatographie par exclusion stérique a révélé la présence d'un contaminant minoritaire, co-élué avec la protéine d'intérêt. A l'issue de la purification, la Paem Δ 1-30 était pure à environ 95 % et l'on obtenait en moyenne 0,5 mg de protéine pure par litre de culture.

Avant d'effectuer les essais de cristallogénèse, la Paem Δ 1-30 a été concentrée sur une membrane de seuil de coupure de 10 kDa. La concentration de cette forme protéique a été à chaque fois une étape critique. En effet, la protéine s'est agrégée au contact de la membrane de concentration, conduisant à une importante perte, estimée à 80 % par rapport à la quantité de protéine récupérée à l'issue de la chromatographie d'exclusion stérique. Cette adsorption de la protéine sur la membrane des concentrateurs a provoqué de nombreuses difficultés quant à la réalisation des expériences de cristallogénèse. Pour contourner ce problème, différents types de membranes ont été testées, mais aucune n'a permis de diminuer l'adsorption de la protéine. Par ailleurs, la Paem Δ 1-30 a une forte tendance à précipiter lorsque sa concentration excède 3 mg.mL⁻¹. Sa purification dans du tampon supplémenté avec 5 % de glycérol a permis de limiter ce phénomène, mais les essais de cristallogénèse ont toujours dû être réalisés immédiatement après l'étape de concentration.

5.5. Détermination de l'activité enzymatique de la PaeM Δ1-30 :

En parallèle à sa cristallogénèse, l'activité catalytique de la PaeM Δ1-30 purifiée a également été vérifiée par la réalisation d'un test d'activité *in vitro*, selon le protocole standard décrit dans la partie Matériels et Méthodes. A l'instar de la forme entière, cette forme protéique possède bien une activité spécifique (**Figure 87**), déterminée à $332 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, soit 25 fois plus élevée que celle de la PaeM sauvage ($13 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$). Un résultat similaire avait été obtenu pour la CoIM : amputée de ses 32 premiers résidus, cette dernière possédait une activité spécifique 53 fois plus élevée que celle de la protéine entière ($32 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ vs $0,6 \text{ nmol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) (Barreteau *et al.*, 2010).

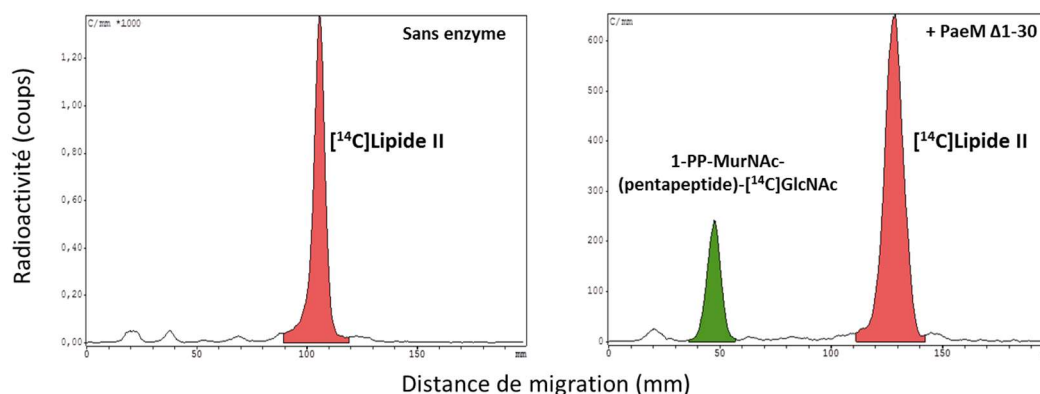


Figure 87 : Dégradation du lipide II *in vitro* par la PaeM Δ1-30. Le lipide II radiomarqué a été incubé en absence (à gauche) ou en présence (à droite) de la PaeM Δ1-30. Le substrat et le produit sont séparés par chromatographie sur couche mince puis détectés à l'aide d'un scanner de radioactivité.

5.6. Cristallogénèse de la PaeM Δ1-30 :

Pour les premiers essais de cristallogénèse, la protéine PaeM Δ1-30 a été utilisée à deux concentrations : $1,97 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ et $2,8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Un criblage automatisé selon la technique de diffusion de vapeur en goutte assise a été réalisée sur les 3 kits commerciaux suivants : « Classics », « PEGs » et « PEGs II ». La protéine à une concentration de $1,97 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ a été utilisée pour le criblage sur le kit « Classics » tandis que celle concentrée à $2,8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ a été utilisée pour les deux kits restants. Ces tests ont permis d'obtenir des cristaux ou des microcristaux dans un certain nombre de conditions de cristallisation listées dans le **tableau 14**.

Tableau 14 : Liste des conditions de cristallisation de la PaeM Δ1-30

Condition de cristallisation	Composition de la solution de cristallisation
Kit « Classics », condition E01	0,2 M BICINE pH 9,0 2 % (v/v) Dioxane 10 % PEG 20000
Kit « PEGs », condition B10	0,1 M Tris-HCl pH 8,5 25 % PEG 550 MME
Kit « PEGs », condition B12	0,1 M Tris-HCl pH 8,5 25 % PEG 2000 MME

Kit « PEGs », condition D07	0,1 M Tris-HCl pH 8,5 25 % PEG 3000
Kit « PEGs », condition D08	0,1 M Tris-HCl pH 8,5 25 % PEG 4000
Kit « PEGs », condition D09	0,1 M Tris-HCl pH 8,5 25 % PEG 6000
Kit « PEGs », condition D10	0,1 M Tris-HCl pH 8,5 25 % PEG 8000
Kit « PEGs », condition D11	0,1 M Tris-HCl pH 8,5 20 % PEG 10000
Kit « PEGs », condition D12	0,1 M Tris-HCl pH 8,5 15 % PEG 20000
Kit « PEGs », condition H04	0,2 M Na ₂ PO ₄ 20 % PEG 3350
Kit « PEGs », condition H09	0,2 M tri-lithium citrate 20 % PEG 3350
Kit « PEGs II », condition B12	0,2 M LiSO ₄ 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 30% PEG 3000
Kit « PEGs II », condition C06	0,1 M Tris-HCl pH 8,5 12 % PEG 4000
Kit « PEGs II », condition C07	0,2 M LiSO ₄ 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 16 % PEG 4000
Kit « PEGs II », condition C08	0,2 M NaCH ₃ COO 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 16 % PEG 4000
Kit « PEGs II », condition C11	0,2 M LiSO ₄ 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 20 % PEG 4000
Kit « PEGs II », condition D09	0,2 M LiSO ₄ 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 30 % PEG 4000
Kit « PEGs II », condition D10	0,2 M NaCH ₃ COO 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 16 % PEG 4000

Kit « PEGs II », condition E01	0,8 M LiCl 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 8 % PEG 4000
Kit « PEGs II », condition F04	0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 22 % PEG 4000 0,8 M NaCH_3COO
Kit « PEGs II », condition F11	0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,2 M NaCH_3COO pH 5,6 30 % PEG 4000
Kit « PEGs II », condition G01	0,1 M LiSO_4 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 25 % PEG 5000 MME
Kit « PEGs II », condition G03	0,1 M KCl 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 3 % PEG 6000

L'analyse des conditions ayant permis l'apparition de cristaux révèle que certains composants sont retrouvés de façon récurrente. Ainsi, le tampon Tris-HCl pH 8,5 à 0,1 M y est souvent présent, tout comme le PEG 4000 à différentes concentrations. Des monocristaux ont été aussi obtenus pour la condition E01 du kit « PEGs II » (**Figure 88**) contenant en plus du LiCl à une concentration finale de 0,8 M. De nouveaux criblages ont été réalisés autour de ces conditions de cristallo-génèse.



Figure 88 : Image de cristaux de PaeM $\Delta 1-30$. Cristaux obtenus dans la condition E01 du kit « PEGs II ».

Les optimisations des conditions de cristallisation ont été réalisées en faisant varier la concentration des deux agents précipitants (PEG 4000 et LiCl), ainsi que le pH du tampon Tris, par la réalisation de gradient à une (1D) ou deux dimensions (2D). Les différentes conditions et les concentrations de protéines utilisées lors de ces optimisations sont présentées dans le **tableau 15**.

Tableau 15 : Optimisation des conditions de cristallisation de la PaeM Δ 1-30.

Type de gradient	Description du gradient	[PaeM Δ 1-30]
2D	4 % → 14 % PEG 4000 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 → 9 0,8 M LiCl	2,8 mg.mL ⁻¹
2D	4 % → 14 % PEG 4000 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 0 M → 1 M LiCl	2,8 mg.mL ⁻¹
1D	2 % → 10 % PEG 4000 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 0,8 M LiCl	2,8 mg.mL ⁻¹
1D	6 % → 15 % PEG 4000 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 0,8 M LiCl	2,8 mg.mL ⁻¹
1D	7% → 17 % PEG 4000 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 0,8 M LiCl	1,6 mg.mL ⁻¹

Les gradients 2D ont été réalisés dans des boîtes de 96 puits selon la technique de diffusion de vapeur en goutte assise. Les gradients 1D ont été réalisés lors d'optimisations manuelles selon la technique de diffusion de vapeur en goutte suspendue. Par ailleurs, lors des optimisations manuelles, différents ratios protéine/solution de cristallisation (2/1 ; 1/1 ; 1/1,5 ; 1/2 ; v/v) ont été testés. Le ratio 2/1 a permis de favoriser l'apparition des cristaux, alors que le ratio 1/2 a ralenti l'apparition de ces derniers et a permis d'obtenir des monocristaux de taille plus importante.

Les meilleurs cristaux ont été obtenus à 7→17 % PEG 4000, 0,8 M LiCl et 0,1 M Tris-HCl pH 8,5, et certains ont été congelés. Quelques uns ont été trempés dans une solution de congélation contenant du pyrophosphate de sodium à 100 mM. Cette étape avait pour but de favoriser la diffusion, au sein du cristal, du groupement pyrophosphate jusqu'au site actif de la protéine, afin de résoudre la structure du complexe potentiel PaeM/pyrophosphate.

La plupart des cristaux pêchés n'ont diffracté qu'entre 5 et 10 Å de résolution, ou n'ont pas diffracté du tout. Un seul cristal, n'ayant pas subi l'étape de trempage, a diffracté à 3,4 Å et a permis l'obtention d'un jeu de données complet. Dans un premier temps, les tentatives de résolution de la structure de la PaeM Δ 1-30 à partir de ce jeu de données, par remplacement moléculaire en utilisant la structure de la PaeM sauvage (code PDB : 4G76), n'ont pas abouti. Puis, étant donné que la PaeM est composée de plusieurs domaines (domaine de translocation : résidus 1 à 33 ; domaine de réception : résidus 33 à 136 ; domaine catalytique : résidus 137 à 289, composé d'un tonneau β et d'un petit sous-domaine situé à l'interface entre le domaine de réception et le tonneau β) (**Figure 89**), nous avons émis l'hypothèse qu'un changement conformationnel avait pu avoir lieu.

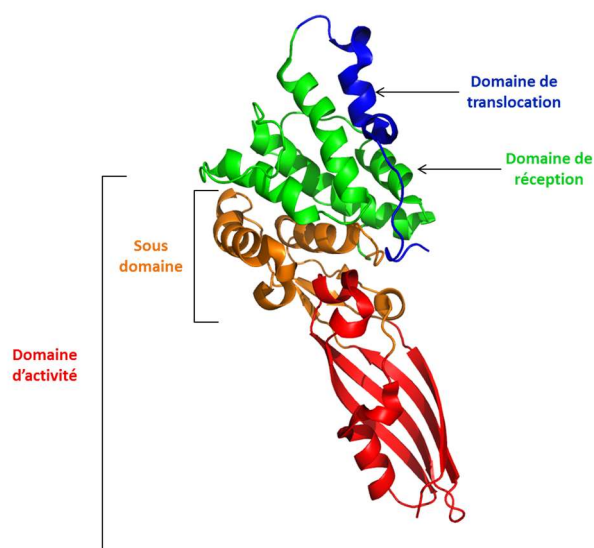


Figure 89 : Délimitation des différents domaines de la PaeM. La structure est représentée en cartoon. Les domaines de translocation et de réception sont colorés respectivement en bleu et vert. Le domaine d'activité est coloré en rouge et son petit sous-domaine en orange (d'après Barreteau *et al.*, 2012b).

Nous avons donc essayé de résoudre la structure des domaines séparément. Cette méthode a permis la résolution immédiate du domaine catalytique de la PaeM Δ 1-30, qui semble avoir exactement la même conformation que celui de la PaeM sauvage : un long domaine en tonneau β avec son petit sous-domaine (résidus 137 à 291). La structure du domaine central, principalement globulaire et contenant le domaine d'union au récepteur, n'a en revanche pas pu être résolue par cette approche, même si l'analyse du packing cristallographique du domaine catalytique montre l'existence de la place pour le positionnement du domaine. Ceci suggère que le domaine central pourrait adopter une orientation différente de celle observée au sein de la structure de la PaeM sauvage. Il semblerait donc que ce changement conformationnel ait pu être provoqué par la troncation des trente résidus N-terminaux. Par conséquent, la structure complète de la PaeM Δ 1-30 n'a pu être résolue par remplacement moléculaire.

En parallèle, des expériences de micro-ensemencement ont également été réalisées dans l'optique d'améliorer la qualité des cristaux et/ou d'obtenir de nouvelles conditions de cristallisation, le but final étant d'améliorer la résolution (3,4 Å). Ces essais ont été menés avec la protéine PaeM Δ 1-30 à une concentration de 3,2 mg.mL⁻¹ et sur les kits commerciaux « PEGs » et « PEGs II ». Malheureusement, la protéine a précipité dans la plupart des conditions testées.

Nous avons aussi recherché, parmi l'ensemble des conditions de cristallisation identifiées lors du criblage initial, celles ayant permis l'obtention de cristaux et qui présentaient une composition différente de celles ayant déjà été optimisées. Des conditions de cristallisation différentes pour une même protéine peuvent être à l'origine d'un changement du packing cristallographique, ce qui peut *in fine* permettre l'obtention de cristaux diffractant à plus haute résolution. Les conditions B10 et H04 du kit « PEGs », dont les compositions sont détaillées dans le **tableau 14**, ont ainsi été identifiées. Des cristaux obtenus dans la condition H04 ont été pêchés directement à partir du kit mais n'ont pas permis l'obtention d'un jeu de données. Des optimisations ont été menées autour de ces deux conditions. Ces essais sont toujours en cours au moment de la rédaction de ce manuscrit.

L'ensemble des essais de cristallogénèse menés sur la PaeM $\Delta 1-30$ a permis de montrer que la délétion des 30 premiers résidus de la PaeM avait grandement amélioré la reproductibilité d'obtention des cristaux, puisque, pour la quasi-totalité des optimisations effectuées, la protéine avait cristallisé. A partir de ces derniers cristaux, un jeu de données complet a pu être obtenu à une résolution de 3,4 Å. La résolution partielle de la structure a permis de mettre en évidence une réorganisation spatiale des domaines au sein de la PaeM $\Delta 1-30$ par rapport à la protéine entière. De plus, l'activité enzymatique de cette forme tronquée s'est révélée 25 fois plus élevée que celle de la protéine native. Cette augmentation de l'activité pourrait être liée à la modification de la structure de la protéine. Le domaine de translocation, qui a été supprimé, est en interaction avec le domaine central de la protéine et pourrait empêcher son mouvement par rapport au domaine catalytique. La résolution complète de la structure de la PaeM $\Delta 1-30$ est désormais essentielle afin de déterminer les changements conformationnels potentiels s'opérant au niveau du site actif qui pourraient expliquer au niveau structural l'augmentation de l'activité enzymatique observée.

Des études biochimiques menées précédemment au laboratoire sur les protéines ColM et PaeM avaient déjà permis de montrer que les domaines catalytiques isolés de ces protéines possédaient une activité enzymatique intrinsèque beaucoup plus élevée que les protéines entières (Barreteau *et al.*, 2010, 2012b). Ceci suggère que les domaines N-terminaux maintiendraient le domaine catalytique dans un état intermédiaire qui n'est pas pleinement actif. Ces deux protéines possèdent une organisation compacte au sein de laquelle les différents domaines ne sont séparés que par quelques résidus, alors que la plupart des autres colicines possèdent des domaines structuraux bien séparés. Les domaines catalytiques isolés des protéines ColM et PaeM présentent très certainement une accessibilité plus importante du site actif pour le substrat que celle observée pour les structures des protéines natives. Cependant, à l'heure actuelle, aucune donnée ne relate la possibilité d'un clivage de la ColM ou de ses homologues permettant la libération de ces domaines catalytiques isolés. Il est en revanche possible d'imaginer que le domaine de translocation de ces protéines reste lié à la protéine TonB une fois l'étape de translocation terminée, libérant ainsi le domaine central des contraintes physiques exercées par le domaine N-terminal. Il serait alors « libre » de bouger et de changer d'orientation par rapport au domaine C-terminal. La PaeM $\Delta 1-30$ que nous avons construite mimerait donc la conformation de la PaeM liée à la protéine TonB *via* son domaine N-terminal.

6. Mise en évidence d'une certaine cytotoxicité de la PaeM vis-à-vis d'*E. coli* :

Alors que la ColM et ses homologues étaient connus jusqu'ici pour ne posséder qu'un spectre d'action restreint (Barreteau *et al.*, 2009b; Chérier *et al.*, 2016), nous avons mis en évidence de façon fortuite une cytotoxicité réelle de la PaeM vis-à-vis d'*E. coli*.

6.1. Confirmation de la cytotoxicité réelle de la PaeM :

En effet, lors de la réalisation d'un test permettant d'évaluer l'activité cytotoxique en milieu solide d'une préparation de ColM fraîchement purifiée, la PaeM avait été déposée en parallèle en qualité de témoin négatif. Après une nuit d'incubation à 37°C, la cytotoxicité de la ColM purifiée vis-à-vis de la souche d'*E. coli* BW25113 testée a été confirmée, mais nous avons également observé, de façon totalement inattendue, une plage de lyse au niveau du point de dépôt de la PaeM (**Figure 90**).

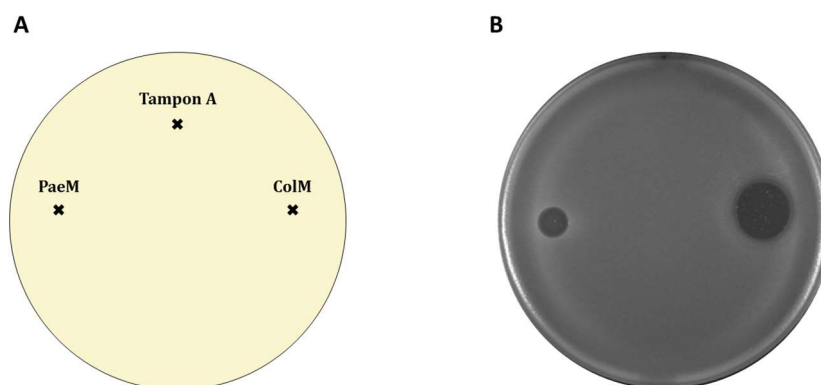


Figure 90 : Evaluation de la cytotoxicité de la PaeM vis-à-vis d'une souche d'*E. coli* BW25113. 4 μL d'une solution de PaeM purifiée à 22 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, soit 88 μg (à gauche), et 4 μL d'une solution de ColM purifiée à 7,4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ soit 30 μg (à droite), ont été déposés sur un tapis cellulaire d'*E. coli* BW25113. Le tampon A (4 μL) a été déposé en qualité de témoin négatif. A : Schéma de dépôt ; B : Photographie de la boîte à l'issue d'une nuit d'incubation à 37°C.

Un tel résultat n'avait jamais été observé auparavant au laboratoire : il avait simplement été démontré que la PaeM ne présentait aucune activité cytotoxique lorsque 4 μg étaient déposés sur un tapis cellulaire d'*E. coli* (Barreteau *et al.*, 2009b). Nous avons donc dans un premier temps pensé que l'inhibition de croissance observée au niveau du dépôt de la PaeM était la conséquence d'une contamination par la ColM lors de la réalisation de l'expérience. Ce test a été reproduit un certain nombre de fois et une inhibition de croissance a été observée à chaque fois avec la PaeM dans les conditions testées. Il est important de noter que la solution protéique de PaeM utilisée lors de ce test était fortement concentrée (22 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), car initialement destinée à la réalisation d'expériences de cristallogénèse.

Afin d'éliminer tout soupçon d'une contamination de la solution de PaeM par la ColM, nous avons testé d'autres préparations protéiques, plus ou moins concentrées, par dépôt de 4 μL de chaque solution non diluée sur un tapis cellulaire. Le même phénomène a été observé pour chaque préparation de PaeM testée (**Figure 91**).

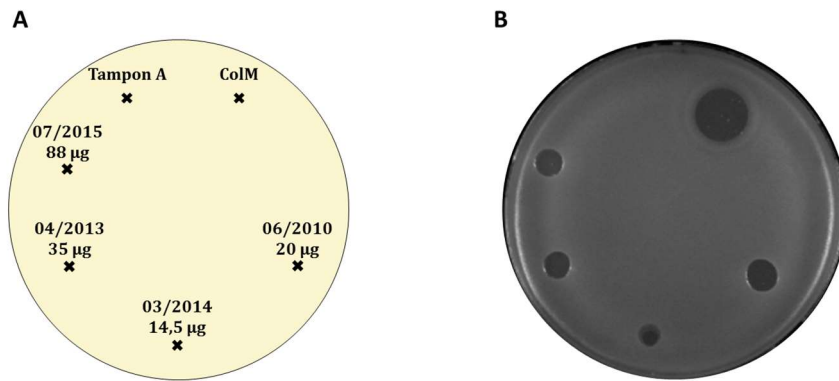


Figure 91 : Evaluation de l'activité cytotoxique de différentes préparations de PaeM purifiées sur une souche d'*E. coli* (BW25113). 4 µL de chacune des solutions de PaeM purifiées non diluées ont été déposés sur un tapis cellulaire d'*E. coli* BW25113. Les concentrations respectives des solutions de PaeM 07/2015, 04/2013, 03/2014, 06/2010 étaient de 22 mg.mL⁻¹, 8,9 mg.mL⁻¹, 3,6 mg.mL⁻¹ et 5 mg.mL⁻¹. A : schéma de dépôt ; B : photographie de la boîte après une nuit d'incubation à 37°C.

Ces derniers résultats ayant indiscutablement prouvé l'activité cytotoxique de la PaeM très concentrée, et disculpé une éventuelle contamination par la ColM, la quantité minimale de PaeM nécessaire pour observer l'effet lytique sur *E. coli* a été déterminée (Figure 92).

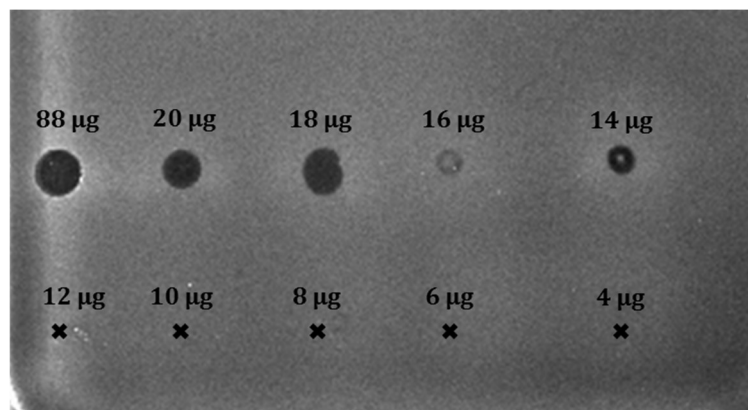


Figure 92 : Détermination de la quantité minimale de protéine PaeM nécessaire pour induire la lyse d'*E. coli*. Différentes quantités de protéines purifiées ont été déposées sur un tapis cellulaire d'*E. coli* BW25113. Les diamètres des plages de lyse ont respectivement été mesurés à 7,5 mm, 6,5 mm, 6 mm, 5 mm, et 4 mm de la concentration la plus élevée à la plus faible pour laquelle une lyse a été observée.

Il est apparu que 14 µg de protéine purifiée étaient requis pour provoquer une inhibition de croissance. En deçà de cette quantité, plus aucune inhibition de croissance n'était observée. Cette quantité est 35 000 fois supérieure à la quantité minimale de ColM nécessaire pour induire la lyse d'*E. coli*, puisqu'il a précédemment été montré au laboratoire que seulement 0,4 ng de ColM permettait d'observer une plage de lyse sur un tapis cellulaire d'*E. coli* (Barreteau *et al.*, 2010).

Afin de confirmer que l'effet observé était bien la conséquence de l'activité enzymatique de la PaeM, le mutant ponctuel inactif D241A, a également été testé en quantité importante (62 µg) et dans les mêmes conditions que précédemment, sur un tapis cellulaire d'*E. coli* BW25113 (Figure 93).

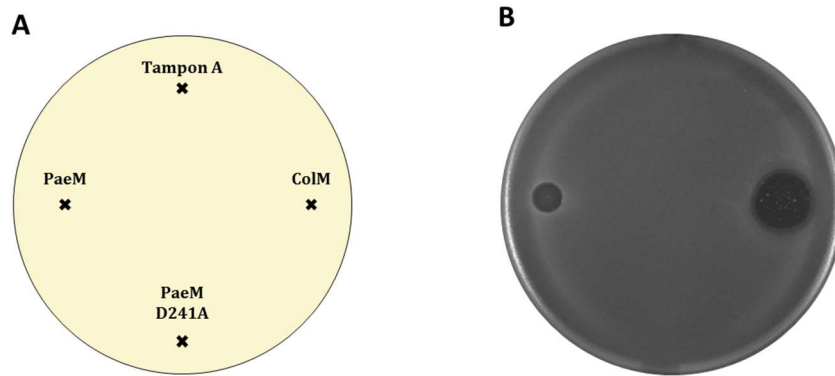


Figure 93 : Evaluation de l'activité cytotoxique de la Paem D241A sur une souche d'*E. coli* BW25113. Des volumes de 4 μ L de solutions de Paem (88 μ g), Paem D241A (62 μ g) et ColM (30 μ g) ont été déposés sur un tapis cellulaire de BW25113. A : Schéma de dépôt des protéines ; B : Photographie de la boîte après une nuit d'incubation à 37°C.

Aucune inhibition de croissance n'a été observée suite à ce dépôt, confirmant ainsi que le phénomène observé était bien la conséquence de l'activité enzymatique de la Paem.

6.2. Dépendance de la cytotoxicité de la Paem vis-à-vis de partenaires protéiques :

6.2.1. Vis-à-vis des systèmes de réception, de translocation et de maturation :

Par la suite, nous avons cherché à savoir si, pour exercer son activité létale sur *E. coli*, la Paem interagissait avec les mêmes partenaires que la ColM. La capacité de la Paem à inhiber la croissance des souches d'*E. coli* BW25113 $\Delta fhuA$, BW25113 $\Delta tonB$ et BW25113 $\Delta fkpA$ a donc été testée. Comme le montre la **figure 94**, aucune de ces trois souches n'a montré de sensibilité à la Paem, dans les conditions testées.

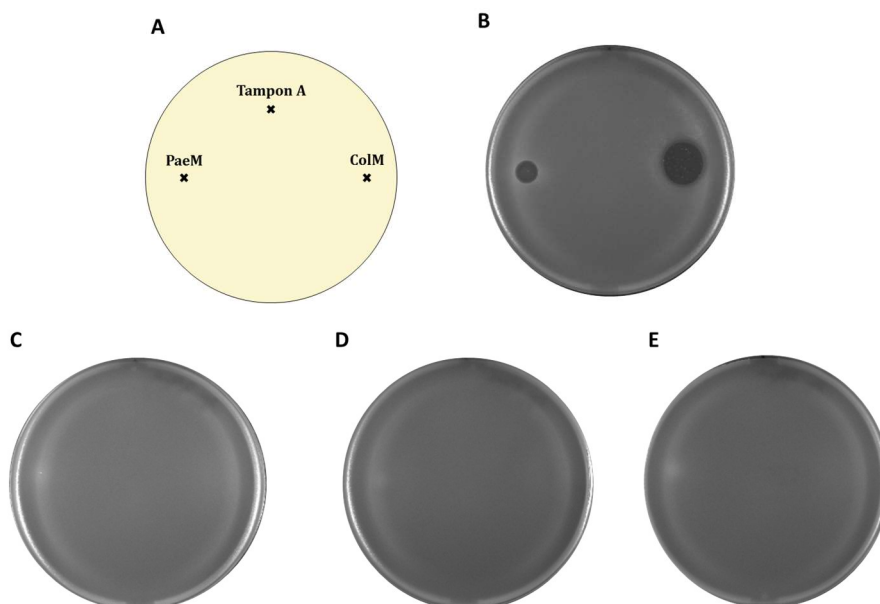


Figure 94 : Dépendance de la cytotoxicité de la Paem sur *E. coli* vis-à-vis des protéines FhuA, TonB et FkpA. Des volumes de 4 μ L de solutions de Paem (88 μ g) et de ColM (30 μ g) ont été déposés sur un tapis cellulaire d'*E. coli* BW25113 (B), BW25113 $\Delta fhuA$ (C), BW25113 $\Delta tonB$ (D) et BW25113 $\Delta fkpA$ (E). A : Schéma de dépôt des protéines Paem et ColM ainsi que du tampon A (témoin négatif) pour chacune des conditions testées.

Le spectre d'action très restreint de la ColM est la conséquence de la très grande spécificité des interactions protéine-protéine mises en jeu lors des étapes de liaison au récepteur de membrane externe puis de translocation au sein du périplasma. La PaeM semblerait donc emprunter une voie d'accès au périplasma identique à celle empruntée par la ColM, puisqu'elle apparaît également dépendante des protéines FhuA et TonB. De plus, la présence de FkpA semble également requise, ce qui suggère une maturation potentielle de la PaeM par cette chaperonne. Comme mentionné précédemment (cf **Introduction V.2.**), la PaeM présente une très forte homologie structurale avec la ColM, non seulement au niveau de leurs domaines catalytiques respectifs, mais également au niveau de leurs domaines centraux impliqués dans la liaison au récepteur de membrane externe. Bien que ces derniers présentent une identité de séquence de seulement 11 %, ils sont tous deux composés de quatre hélices α et ont une organisation plutôt globulaire. Par ailleurs, la superposition des structures de ces deux domaines centraux sur 61 C α présente un RMSD de 2,3 Å. Leur seule différence concerne principalement les orientations relatives des hélices α_1 et α_2 . Cette forte homologie structurale pourrait donc être à l'origine d'une interaction entre la PaeM et le récepteur FhuA, même si cette dernière est certainement beaucoup plus faible que celle qui s'établit entre la ColM et FhuA. L'hélice α_1 ayant d'ailleurs été identifiée comme essentielle à l'interaction de la ColM avec son récepteur (Helbig *et al.*, 2012), son orientation différente dans la structure de la PaeM pourrait être responsable d'une moindre affinité. Cependant, le fait d'avoir déposé une quantité très importante de PaeM a sans doute « forcé » son interaction avec FhuA, permettant ainsi son entrée au sein de la cellule et l'inhibition de croissance observée.

De même, l'activité cytotoxique de la PaeM vis-à-vis d'*E. coli* serait dépendante de la protéine TonB. Si la PaeM suit le même mécanisme d'import que la ColM, elle établit probablement une interaction avec la protéine TonB, qui lui fournirait alors l'énergie nécessaire à sa translocation à travers la membrane externe. Cette interaction nécessite cependant la présence d'une *TonB box* dans la séquence de la PaeM. Pourtant, l'utilisation du serveur *Prosite* (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>) n'a pas permis d'identifier de motif consensus de ce genre chez la PaeM. Dans ce cas, les caractéristiques structurales sont peut-être plus importantes que la séquence. La structure du complexe formé entre le récepteur FhuA et le domaine C-terminal de TonB a permis de mettre en évidence que la *TonB box* de FhuA se structurait en un brin β qui intègre le feuillet β présent au sein de la protéine TonB (**Figure 45**) (Pawelek *et al.*, 2006). Il est possible d'imaginer que le domaine N-terminal de la PaeM se structure également en un brin β au contact de TonB, bien qu'aucune séquence similaire à la *TonB box* n'ait été identifiée dans ce domaine. Par ailleurs, lors de la liaison de la ColM sur FhuA, une première interaction s'établit entre TonB et FhuA pour permettre la sortie partielle ou complète du « *plug* » hors du tonneau β et permettre ainsi l'ouverture du pore. Dans un mutant *tonB*, cette ouverture n'a plus lieu et la ColM ne peut donc plus pénétrer dans la cellule cible. Par conséquent, dans le cas où la PaeM n'interagirait pas directement avec la protéine TonB lors de la translocation à travers la membrane externe, la délétion du gène *tonB* empêcherait simplement l'ouverture du pore du récepteur FhuA, inhibant par la même occasion l'import de la PaeM, et conduisant ainsi à une absence d'inhibition de croissance.

Enfin, il a été constaté que la PaeM ne présentait aucune cytotoxicité vis-à-vis d'une souche d'*E. coli* n'exprimant pas la chaperonne FkpA. Son activité serait donc dépendante de cette dernière, tout comme l'est celle de la ColM. A l'heure actuelle, aucune donnée de la littérature ne fait état d'un processus de maturation nécessaire à l'activité de la PaeM sur une souche sensible de *Pseudomonas*. Il n'est cependant pas exclu qu'un tel processus de maturation soit requis. En plus de son activité

chaperonne, la protéine FkpA présente une activité de type peptidylprolyl *cis-trans* isomérase. Au sein de la ColM, il est supposé que la liaison ¹⁷⁵Phe-Pro¹⁷⁶ soit la cible potentielle de cette activité isomérase (Hullmann *et al.*, 2008). Ce résidu proline n'est cependant pas conservé au sein de la PaeM (**Figure 51**), et il est donc possible que seule l'activité chaperonne de FkpA soit nécessaire à l'activité cytotoxique de la PaeM sur *E. coli*.

6.2.2. Vis-à-vis de la protéine d'immunité :

Une souche sensible à la ColM peut y devenir résistante si elle exprime la protéine d'immunité associée, la Cmi. Afin d'évaluer la capacité de cette dernière à protéger contre les effets toxiques de la PaeM, une souche d'*E. coli* DH5α a été transformée par le plasmide pMLD232 permettant l'expression de la Cmi au sein de son périplasma à un niveau basal et sans induction. La PaeM a ensuite été testée selon les mêmes conditions que précédemment sur un tapis cellulaire de cette souche d'*E. coli* exprimant ou non la Cmi. Comme le montre la **figure 95**, il est apparu que la Cmi était capable de protéger une souche sensible contre les effets de la PaeM.

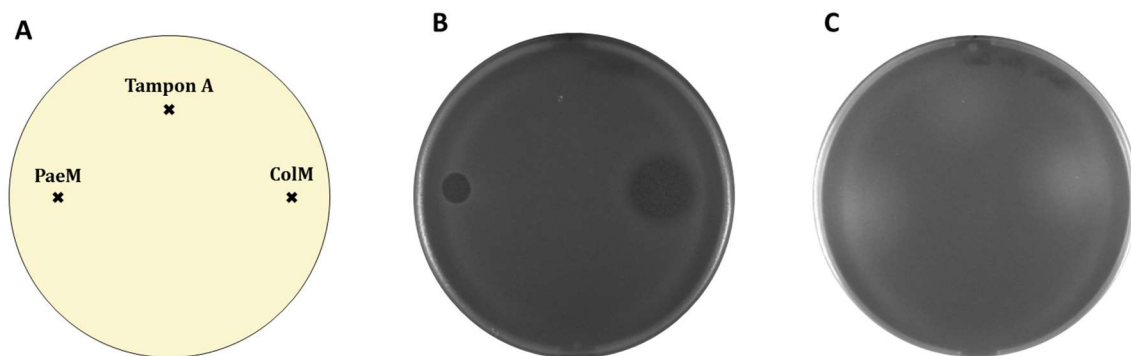


Figure 95 : Inhibition de l'activité cytotoxique de la PaeM par la protéine Cmi. Des volumes de 4 μ L de solutions de PaeM (88 μ g) et de ColM (30 μ g) ont été déposés sur un tapis bactérien de la souche d'*E. coli* DH5α transformée (C) ou non (B) par le plasmide pMLD232 permettant l'expression de la Cmi. Le panel A correspond au schéma de dépôt des protéines PaeM et ColM dans les deux conditions testées.

Le mécanisme d'action mis en jeu par la Cmi pour immuniser une souche d'*E. coli* contre la ColM est encore inconnu. Il a cependant été supposé qu'une interaction directe entre la Cmi et la ColM était à l'origine de l'inhibition de l'activité de cette dernière (Usón *et al.*, 2012). Les protéines PaeM et ColM présentant une forte homologie structurale, il est possible que la Cmi puisse interagir avec la PaeM suite à la reconnaissance d'un motif structural commun à ces deux protéines. L'inhibition de l'activité de la PaeM par la Cmi est un résultat d'autant plus surprenant que la protéine d'immunité associée à la PaeM, PmiA, présente une topologie complètement différente à celle de la Cmi. En effet, la PmiA est constituée *a priori* de 4 segments transmembranaires (Ghequire *et al.*, 2017a), alors que la Cmi possède un domaine périplasmique rattaché à la membrane par le biais d'une ancre transmembranaire (**Figure 55**) (Gérard *et al.*, 2011; Usón *et al.*, 2012).

A ce jour, aucune interaction forte n'a pu être mise en évidence entre la ColM et la Cmi (Usón *et al.*, 2012). Le fait que cette dernière protège également *E. coli* contre les effets de la PaeM pose donc question quant à son mode d'action. Il est possible d'imaginer qu'elle n'entre pas en interaction directe avec la colicine mais qu'elle soit localisée dans la membrane interne à proximité du lipide II, rendant ce dernier inaccessible aux protéines ColM et PaeM tout en permettant aux PBPs d'exercer leur activité de polymérisation du peptidoglycane.

6.3. Recherche d'une cytotoxicité identique de la part des autres homologues de la ColM :

Pour vérifier si les autres homologues issus de *Pseudomonas* spp. ou *P. carotovorum*, produits et purifiés au laboratoire (Barreteau *et al.*, 2009b) étaient également capables d'induire la lyse d'*E. coli*, 50 µg de PflM purifiée, 60 µg de PsyM purifiée et 55 µg de PcaM1 purifiée ont été déposés sur un tapis cellulaire d'*E. coli* BW25113. Après une nuit d'incubation à 37°C, aucune plage de lyse n'a été observée dans les conditions testées au niveau des zones de dépôt de ces différentes enzymes (**Figure 96**).

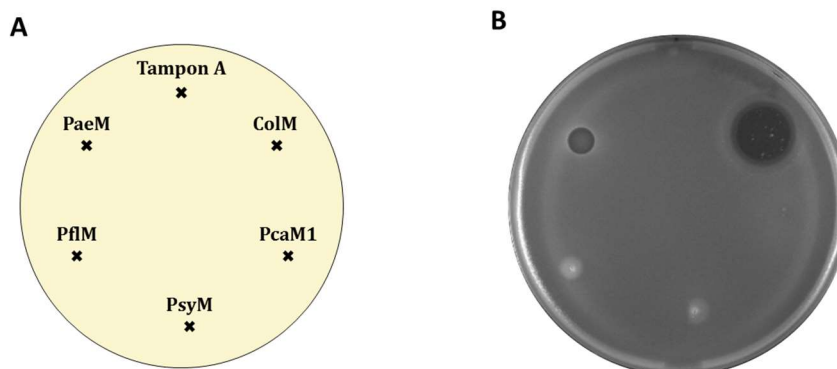


Figure 96 : Evaluation de l'activité cytotoxique des protéines PflM, PsyM et PcaM1 sur une souche d'*E. coli* BW25113. Des volumes de 4 µL de solutions purifiées de PaeM (88 µg), PflM (50 µg), PsyM (60 µg), PcaM1 (55 µg) ou ColM (30 µg) ont été déposés sur un tapis cellulaire d'*E. coli* BW25113. A : Schéma de dépôt des protéines ; B : Photographie de la boîte après une nuit d'incubation à 37°C.

Ces derniers résultats ont permis de montrer que cette cytotoxicité exercée par la PaeM vis-à-vis d'*E. coli* était spécifique et intrinsèque à cette dernière puisque les autres homologues testés n'ont présenté aucune cytotoxicité, et ce même à forte dose. Les structures tridimensionnelles des protéines PsyM et PcaM2 (cette dernière présentant 58 % d'identité de séquence avec la PcaM1) ont été résolues et présentent des différences structurales plus marquées avec la ColM que celles retrouvées pour la PaeM (Grinter *et al.*, 2012b, 2014). L'innocuité observée vis-à-vis d'*E. coli* de la part de ces protéines pourrait donc être la conséquence de ces différences structurales.

Cependant, ces seuls résultats ne permettent pas d'affirmer que l'innocuité des protéines PsyM et PflM, autres homologues issus de *Pseudomonas*, vis-à-vis d'*E. coli* ne soit uniquement la conséquence d'un défaut d'importation de ces protéines au sein du périplasma. En effet, ces deux protéines présentent une activité spécifique de dégradation du lipide II *in vitro* bien plus faible que celle de la PaeM (respectivement 1,07 et 0,017 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ contre 13 nmol.min⁻¹.mg⁻¹). Il est donc possible qu'une petite fraction de ces protéines ait pénétré au sein du périplasma des cellules d'*E. coli*, sans être en mesure d'induire une inhibition de croissance à cause de leur trop faible activité.

C'est la première fois qu'une activité croisée, selon le mode d'action naturel en trois étapes, a été démontrée pour cette famille d'enzymes.

III. Etude de la cytotoxicité de la PcaM1 vis-à-vis d'*E. coli* :

J'ai débuté l'étude de la protéine PcaM1 produite par *Pectobacterium carotovorum* au cours de mon stage de Master 2, et ce principalement d'un point de vue structural (cristallographie). Par la réalisation de différents criblages automatisés utilisant des kits commerciaux, des premières pistes de cristallisation avaient été identifiées suite à l'apparition de cristaux dans certaines conditions. Au même moment, le groupe de Daniel Walker publiait la structure de la PcaM2, qui présentait une identité de séquence de 58 % avec la PcaM1 et possédait donc probablement une structure quasi identique (Grinter *et al.*, 2014). Par conséquent, aucune suite n'a été donnée à ces essais de cristallogénèse.

En revanche, j'ai poursuivi l'étude de cette protéine au cours de mon travail de thèse, notamment en investiguant sa cytotoxicité vis-à-vis d'*E. coli*.

1. Contexte de l'étude :

Il avait précédemment été montré au laboratoire que la ColM et son homologue PaeM étaient capables d'hydrolyser *in vitro* des lipides II de structures variées, comme ceux rencontrés au sein de différentes espèces pathogènes de bactéries à Gram positif (Barreteau *et al.*, 2012b, Patin *et al.*, 2012), mettant ainsi en avant le potentiel de cette famille d'enzymes comme alternative aux antibiotiques conventionnels.

Il avait également été montré au laboratoire que le spectre d'action initial de ces protéines pouvait être élargi si les étapes de réception et de translocation étaient contournées. Ainsi, la PaeM s'avérait capable de provoquer la lyse de cellules d'*E. coli* lorsque celles-ci étaient préalablement traitées par un choc osmotique perméabilisant la membrane externe, permettant ainsi d'internaliser la protéine d'intérêt dans le périplasme en s'affranchissant des étapes de réception et de translocation.

Un autre moyen pour contourner ces deux étapes cruciales était de fusionner la protéine d'intérêt à une séquence signal d'adressage. Cette méthode avait notamment été utilisée pour étudier la cytotoxicité de la ColM et de différents variants vis-à-vis d'*E. coli*. Pour cela, les différentes formes protéiques de la ColM avaient été fusionnées à la séquence peptidique d'adressage OmpA, permettant d'envoyer la protéine dans le périplasme *via* le système de sécrétion Sec (Barnéoud-Arnoulet *et al.*, 2010). Le système Sec est responsable de l'envoi des protéines sous une forme non structurée du cytoplasme vers le périplasme (Green et Meccas, 2016). Bien que le mode de transport naturel de la ColM soit encore inconnu, il est supposé nécessiter un dépliement partiel ou total de la protéine afin qu'elle puisse traverser le pore du récepteur FhuA (Zeth *et al.*, 2008). Le système Sec présente donc l'avantage de mimer le dépliement probable de la protéine lors du transport à travers la membrane externe et d'envoyer dans le périplasme la protéine sous une forme inactive.

C'est cette dernière méthode que nous avons choisie ici pour étudier le pouvoir cytotoxique de la protéine PcaM1. Ainsi, trois variants (PcaM1, PcaM1 D222A et PcaM1 Δ 1-107) ont été envoyés directement dans le périplasme de cellules d'*E. coli* par le biais d'une expression périplasmique, et leur cytotoxicité a été étudiée par l'observation d'un certain nombre de paramètres phénotypiques et physiologiques. Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication en 2016 dans le journal *Antibiotics*.

2. Article :

Article

Pectocin M1 (PcaM1) Inhibits *Escherichia coli* Cell Growth and Peptidoglycan Biosynthesis through Periplasmic Expression

Dimitri Chérier, Sean Giacomucci [†], Delphine Patin, Ahmed Bouhss [‡], Thierry Touzé, Didier Blanot, Dominique Mengin-Lecreulx and Hélène Barreteau ^{*}

Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette 91198, France; dimitri.cherier@i2bc.paris-saclay.fr (D.C.); sean.giacomucci@umontreal.ca (S.G.); delphine.patin@i2bc.paris-saclay.fr (D.P.); ahmed.bouhss@univ-evry.fr (A.B.); thierry.touze@i2bc.paris-saclay.fr (T.T.); didier.blanot@gmail.com (D.B.); dominique.mengin-lecreulx@i2bc.paris-saclay.fr (D.M.-L.)

^{*} Correspondence: helene.barreteau@i2bc.paris-saclay.fr; Tel.: +33-1-69-15-81-65

[†] Present address: Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université de Montréal, Montréal, QC H3T 1J4, Canada.

[‡] Present address: Laboratoire Structure-Activité des Biomolécules Normales et Pathologiques, INSERM UMRS 1204 and Université Evry-Val d'Essonne, Evry 91025, France.

Academic Editor: Christopher Butler

Received: 18 July 2016; Accepted: 23 September 2016; Published: 8 October 2016

Abstract: Colicins are bacterial toxins produced by some *Escherichia coli* strains. They exhibit either enzymatic or pore-forming activity towards a very limited number of bacterial species, due to the high specificity of their reception and translocation systems. Yet, we succeeded in making the colicin M homologue from *Pectobacterium carotovorum*, pectocin M1 (PcaM1), capable of inhibiting *E. coli* cell growth by bypassing these reception and translocation steps. This goal was achieved through periplasmic expression of this pectocin. Indeed, when appropriately addressed to the periplasm of *E. coli*, this pectocin could exert its deleterious effects, i.e., the enzymatic degradation of the peptidoglycan lipid II precursor, which resulted in the arrest of the biosynthesis of this essential cell wall polymer, dramatic morphological changes and, ultimately, cell lysis. This result leads to the conclusion that colicin M and its various orthologues constitute powerful antibacterial molecules able to kill any kind of bacterium, once they can reach their lipid II target. They thus have to be seriously considered as promising alternatives to antibiotics.

Keywords: pectocin M1; peptidoglycan; bacteriocin; colicin; periplasmic expression

1. Introduction

Colicins are bacterial toxins produced by some *Escherichia coli* strains in order to kill susceptible strains of *E. coli* and related species. Among the ca. twenty colicins identified to date [1], colicin M (ColM) is unique as it is the only one interfering with bacterial peptidoglycan biosynthesis. ColM acts by cleavage of the last precursor of this essential metabolic pathway, thereby causing cell death. Indeed, it was shown ten years ago, both in vivo and in vitro, that ColM was an enzyme catalyzing specifically the hydrolysis of the peptidoglycan lipid intermediate C₅₅-PP-MurNAc(pentapeptide)-GlcNAc (lipid II), by cleaving between the prenyl chain (C₅₅-) and the pyrophosphoryl group of this precursor [2]. The two reaction products, undecaprenol and 1-PP-MurNAc(pentapeptide)-GlcNAc, that do not normally exist in *E. coli* growing cells, were accumulated in the ColM-treated cells. These products cannot be reused into peptidoglycan metabolism or be recycled, thereby leading to cell lysis.

ColM develops its bacteriolytic activity in three sequential steps deeply linked to its structural organization in three domains and parasitizes proteins from the targeted cell to enter the periplasm. Accordingly, the ColM central domain first binds to an outer membrane receptor for siderophores, FhuA [3]. Subsequently, it is translocated towards the periplasm by using the proton-motive force, through the interaction of its N-terminal domain with the TonB machinery system comprising the TonB, ExbB and ExbD proteins [4]. Finally, once shuttled into the periplasm of the targeted cell, ColM is matured by the ubiquitous chaperone protein FkpA, so that its C-terminal domain can display its cytotoxic effect on lipid II [5,6].

As this is the case for many bacteriocins, ColM-producing cells are protected against the lethal effect of their own colicin by the concomitant synthesis of an immunity protein, named ImM (or Cmi). Although the latter protein has been structurally characterized [7,8], the mechanism of protection of the bacterial cell from lysis is still unknown. However, non-producing cells can also protect themselves against the action of ColM by mutation or deletion of genes encoding proteins involved in ColM reception/translocation/maturation processes [9,10].

During the last few years, several ColM orthologues have been identified, by sequence alignments of their C-terminal domains, in some other bacterial genera, such as *Pseudomonas*, *Burkholderia* and *Pectobacterium* species, and several of them have been both biochemically and structurally characterized [11–15]. All of the purified ColM orthologues displayed the same enzymatic activity of cleavage of lipid II and a bacteriolytic (or at least bacteriostatic) activity [11,12]. Yet, despite their similarities in terms of enzymatic activity, these orthologues did not share the same 3D structure, especially in their N-terminal domains. On the one hand, ColM shared a very compact structure with PaeM and syringacin M (also named PsyM), i.e., its orthologues from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas syringae*, respectively, where the usual three structural domains did not form distinct entities [12,13]. On the other hand, the structure of pectocin M2 from *Pectobacterium carotovorum* and probably also that of pectocin M1, since it has been strongly suggested that both pectocins M1 and M2 used the same outer membrane receptor on *Pectobacterium* spp. [14], presented an atypical translocation domain, where the helical receptor-domain and unstructured N-terminus were replaced by a single globular plant-like [2Fe-2S] ferredoxin domain, directly connected to the cytotoxic one through a small α -helix linker [15]. Moreover, while numerous receptors for colicins and closely-related pyocins were Tol- or TonB-dependent, these ferredoxin-containing pectocins presumably used a bacterial ferredoxin uptake mechanism to cross the outer membrane, without any evidence for Tol or TonB complex requirements [15].

The cytotoxicity of all of these ColM-like bacteriocins has been previously demonstrated to be pointed towards a limited number of bacterial species. The specificity of their receptor-binding and translocation domains presumably prevents them from targeting a broad range of bacteria. It thus seems that, if reaching the target constitutes a crucial step for the colicin cytotoxicity, it is also the limiting one. Yet, ways allowing the bypass of this specific and limiting step do exist. Indeed, the use of an osmotic shock was shown to be efficient to make extracellular proteins enter the periplasm of Gram-negative bacteria without loss of cell integrity [16,17]. Another efficient means to send proteins into the periplasm of a target cell was the use of fusion proteins between the bacteriocin of interest and a signal sequence. This strategy was particularly used to study the pore formation by colicin A [18,19]. According to the latter methodology, we describe in the present paper how we managed to evaluate the antibacterial activity of pectocin M1 (that will be named PcaM1 throughout this work, following the nomenclature we previously used [11]) and some of its variants on *E. coli* cells by triggering their periplasmic expression. We show that when addressed to the periplasm of *E. coli*, the PcaM1 protein, as well as its isolated activity domain could catalyze the degradation of the peptidoglycan lipid II precursor, which leads to the arrest of the biosynthesis of this essential cell wall component and, consequently, to cell lysis. It is also shown that, contrary to ColM, this pectocin does not depend on the presence of the host FkpA chaperone protein to exert its deleterious toxic effects.

2. Results

2.1. Design, Production and Purification of Wild-Type and Mutant PcaM1

The gene encoding PcaM1 was amplified from the *P. carotovorum* ssp. *carotovorum* strain PC1 and cloned into a pET expression vector allowing the production of a C-terminal His₆-tagged protein. The catalytic point mutant (D222A) in which Asp222 is replaced by Ala, which was previously reported to be devoid of cytotoxic activity [14], was also produced as a C-terminal His₆-tagged protein.

According to SDS-PAGE analysis of the crude extracts, the best recovery yields of both wild-type and mutant proteins were obtained following overnight IPTG-induced expression at 22 °C. Thereafter, the proteins were purified by affinity chromatography with an overall yield of about 10 mg per liter of culture, and their purity, as judged by SDS-PAGE, was about 95%. Subsequent gel filtration analysis showed that both wild-type and mutant forms of PcaM1 mainly eluted as monomers. No protein aggregates were observed, confirming that the proteins were homogeneous (Supplementary Materials Figure S1). As previously described, both wild-type and mutant purified recombinant proteins had a red-brown color and displayed absorption spectrum maxima at 329, 423 and 467 nm [14]. It should be noted that when protein samples were not boiled before SDS-PAGE analysis, two slightly differently-migrating protein bands of the expected molecular mass for PcaM1 were observed (Supplementary Materials Figure S1). The fast migrating species could represent a more compact and, thus, a more SDS-resistant form of the protein. It is tempting to link this observation to the two protein populations (compact and extended forms) that have been previously revealed by SAXS experiments on pectocin M2 by Grinter and collaborators [15]. MALDI-TOF mass spectrometry analyses of the wild-type PcaM1 revealed only one major peak at m/z 30,266 Da for the $[M + H]^+$ ion, which is in agreement with the theoretical mass of 30,401 Da calculated for the His₆-tagged protein and with the loss of the N-terminal methionine residue (Supplementary Materials Figure S2).

2.2. Enzymatic Properties of PcaM1

Pure wild-type PcaM1 was tested for its capacity to hydrolyze the peptidoglycan intermediate lipid II *in vitro*, as previously shown for ColM and its homologues from *Pseudomonas* species [2,11]. The peptidoglycan composition of the genus *Pectobacterium* is not known to date, but as this genus belongs to the *Enterobacteriaceae*, a classical diaminopimelic acid (A₂pm)-containing peptidoglycan structure is likely present in this bacterium [20]. Therefore, the corresponding lipid II was synthesized by using *E. coli* MraY and MurG enzymes to be used as a substrate in our assays [2]. PcaM1 was able to convert the radiolabeled [¹⁴C]lipid II substrate to a reaction product migrating with a lower R_f (0.3 vs. 0.7 for lipid II) on TLC plates (Figure 1A,B), confirming the enzymatic nature of this protein and its similarity with ColM and the *Pseudomonas* orthologues [2,11].

Under the standard assay conditions used, the specific activity of PcaM1 was 0.53 nmol/min/mg of protein, which is quite similar to that previously determined for ColM (0.4 nmol/min/mg) [2]. The K_m value of wild-type PcaM1 for *meso*-A₂pm-containing lipid II was determined to be 55 μM, which is also in the usual range of other ColM-orthologues [11].

The ability of the D222A PcaM1 mutant to hydrolyze lipid II was also tested in the same conditions. As expected, this catalytic point mutant did not exhibit any *in vitro* activity of degradation of the lipid II (Figure 1C), even when high amounts of proteins were used (up to 15 μg per assay).

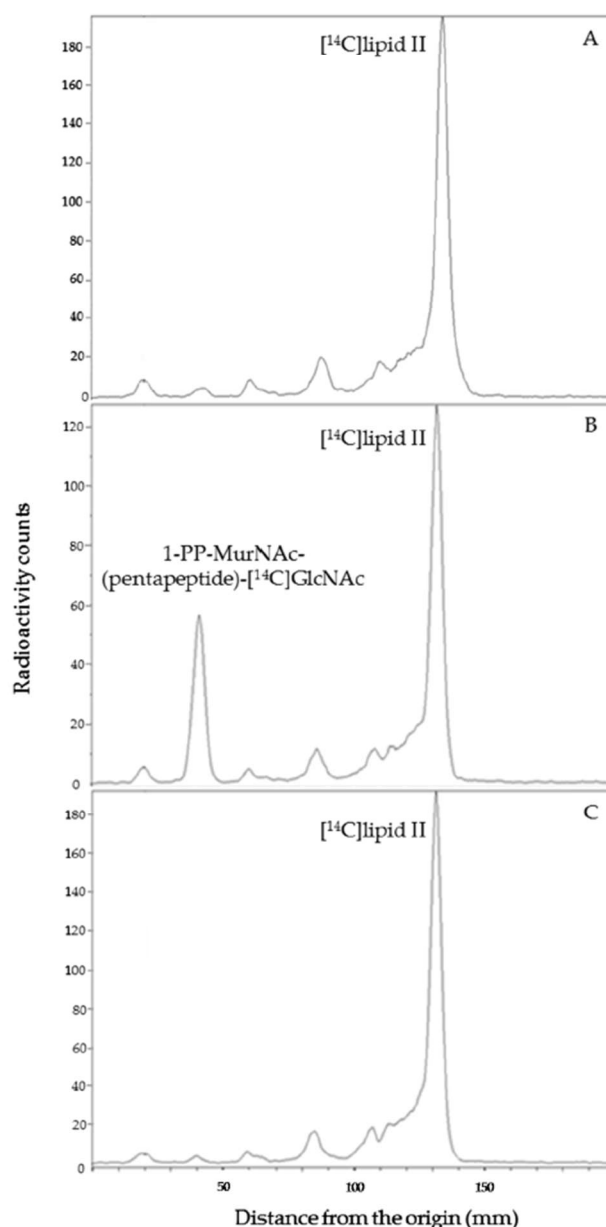


Figure 1. In vitro degradation of lipid II by PcaM1. Conditions that result in ca. 20% hydrolysis of radiolabeled lipid II were used. Purified [^{14}C]lipid II radiolabeled in the GlcNAc moiety (140 Bq) was incubated without (A) or with 1.2 μg of wild-type (B) or D222A mutant (C) PcaM1. The substrate and reaction product were separated by TLC (solvent system: 1-propanol/ammonium hydroxide/water; 6:3:1; v/v/v), and the corresponding spots were detected with a radioactivity scanner, as detailed in the text ($R_f = 0.7$ and 0.3 for lipid II and 1-PP-MurNAc(pentapeptide)-GlcNAc, respectively).

2.3. Cytotoxicity of PcaM1 and Its Variants

Purified PcaM1 was tested on agar plates for its cytotoxic activity against various wild-type *E. coli* strains (DH5 α , BW25113, FB8), and it was found to be totally inactive, as expected. Then, in order to bypass the receptor and translocation machineries, the potential cytotoxicity of PcaM1 was highlighted on the *E. coli* FB8 strain by using the pASK-IBA4 vector, which allowed a controlled expression and subsequent export towards the periplasm of this bacteriocin thanks to its fusion to the OmpA protein signal sequence. Indeed, the addition of anhydrotetracycline triggered the expression of PcaM1 and induced a rapid lysis of *E. coli* FB8 cells (Figure 2). To the best of our knowledge, this is the first time

that a bypass of the species specificity following periplasmic expression was described for a member of the ColM family, whose members have been reported to possess a narrow antibacterial spectrum.

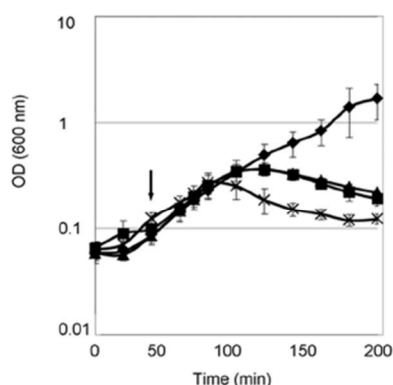


Figure 2. Effects of the periplasmic expression of PcaM1 variants on the growth of *E. coli*. FB8 cells were grown at 37 °C in 2YT medium and the expression of the PcaM1 variants was induced by the addition of anhydrotetracycline (arrow). Growth curves observed for the FB8 strain carrying the pASK-IBA4 empty vector or pASK plasmids expressing the wild-type PcaM1, the D222A mutant or the isolated activity domain (Δ 1-107 PcaM1) are shown by diamonds, squares, triangles and crosses, respectively. Four independent experiments were performed for each strain.

We then designed two variants of PcaM1: the same catalytic point mutant (D222A), which had been expressed in the pET vector, and a truncated form deleted of the 107 first N-terminal amino-acid residues (which corresponds to the isolated activity domain). Both variants were tested for their potential toxicity in the *E. coli* FB8 strain background. An identical lytic phenotype was observed following induction of the periplasmic expression of these two proteins (Figure 2).

Such a phenomenon was somewhat expected for the strain expressing the truncated form of PcaM1, considering that isolated ColM and PaeM catalytic domains generated by protein dissection experiments were previously demonstrated to be enzymatically active [13,21]. In contrast, data obtained with the strain expressing the PcaM1 D222A mutant were more surprising, as it was previously shown that the mutation (D226N) of the corresponding catalytic residue of ColM completely abolished the enzymatic activity and toxicity of the latter colicin when exported into the periplasm [22].

As the P_{tet} promoter from the pASK-IBA4 vector is known to be a reasonably strong promoter, we checked whether the lytic phenotype observed for strains expressing wild-type and mutant PcaM1 proteins was not due to a non-specific protein overexpression effect, but rather to the intrinsic toxicity of the PcaM1 activity. Decreasing the concentration of the inducer anhydrotetracycline (30–200 ng/mL range) and, consequently, of PcaM1 expression led to the same growth defect and lytic behavior for both strains (Supplementary Materials Figure S3). Then, to confirm that the decrease of the optical density of the cultures indeed reflected a loss of viability and cell lysis, the experiments of growth monitoring were repeated at the anhydrotetracycline concentration of 200 ng/mL, and colony forming unit counting was performed in parallel to determine the survival ratio in each case (Supplementary Materials Figure S4). These experiments revealed that cell lethality occurred in both cases, as we observed a three-log decrease in CFU for the strain expressing wild-type PcaM1 ca. 30 min after the anhydrotetracycline was added, but only a two-log decrease in CFU after the same time for the strain expressing the D222A PcaM1 mutant, thus showing a less pronounced loss of viability effect for the mutant.

Our data thus demonstrated that the PcaM1 and its derivatives were able to bypass the biological “partners” needed for internalization of a regular exogenous bacteriocin, that is the receptor and translocation machineries. Then, to address a possible role of the maturation chaperone protein FkpA in the activity of PcaM1, the same type of experiment was performed in the *E. coli* BW25113 Δ fkpA mutant strain (Supplementary Materials Figure S5). Unlike ColM, whose toxicity of the full-length

protein and isolated catalytic domain was found to be FkpA-dependent and independent, respectively, a lytic phenotype was similarly observed here with all of the PcaM1 variants in a $\Delta fkpA$ genetic background. PcaM1 and its two variants thus did not need a maturation process by FkpA to be active in vivo, once delivered in the *E. coli* periplasm. This result was quite interesting, as only the truncated form of ColM was reported to date to be FkpA-independent [22].

2.4. Consequences of the Periplasmic Expression of PcaM1 and Its Derivatives on Peptidoglycan Metabolism in *E. coli*

To better understand the effects of the periplasmic expression of these enzymes in *E. coli*, microscopic examination of FB8 cells expressing wild-type and mutant forms of PcaM1 was performed. As compared to control cells that were relatively small and presented a smooth surface (Figure 3A), wild-type, as well as mutant PcaM1-expressing cells appeared elongated and displayed multiple swelling zones on their surface (Figure 3B–D,C–E, respectively). Some of these cells also exhibited amazing membrane protuberances (Figure 3D,E) that ultimately burst. These observations demonstrated that both wild-type and mutant forms of PcaM1 similarly affected *E. coli* cell growth and morphology, a phenotype that was consistent with a perturbation of their peptidoglycan metabolism.

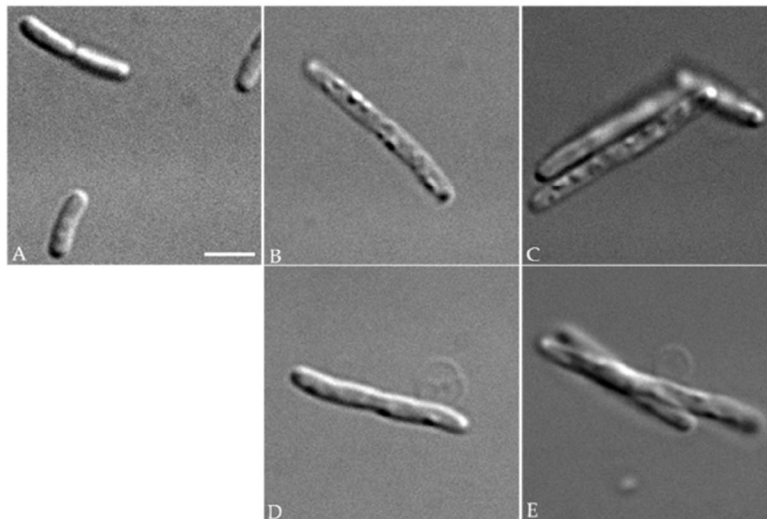


Figure 3. Morphology of *E. coli* strains. Optical micrographs of exponentially-growing control FB8 cells (A) and of cells expressing either the wild-type (B,D) or the D222A mutant (C,E) PcaM1. As compared to control cells, those expressing either form of PcaM1 in the periplasm appeared elongated, presented swellings on their surface (B,C), and some of them were blebbing (D,E). The scale bar shown is 3 μm .

To test this hypothesis further, the pool levels of the carrier lipid undecaprenyl phosphate ($\text{C}_{55}\text{-P}$) and of its two derivatives undecaprenyl pyrophosphate ($\text{C}_{55}\text{-PP}$) and undecaprenol ($\text{C}_{55}\text{-OH}$) were determined in membranes of *E. coli* cells expressing the three PcaM1 variants, using previously-described procedures [23]. Indeed, ColM is known to provoke the cleavage of lipid II into $\text{C}_{55}\text{-OH}$, thereby blocking the recycling of the carrier lipid $\text{C}_{55}\text{-P}$ and peptidoglycan synthesis [2]. Following the expression of PcaM1 and its resulting growth defect, a pool of the isoprenoid $\text{C}_{55}\text{-OH}$ was thus expected to appear. The results of the isoprenoid HPLC analysis and quantification are presented in Figure 4 and Table 1.

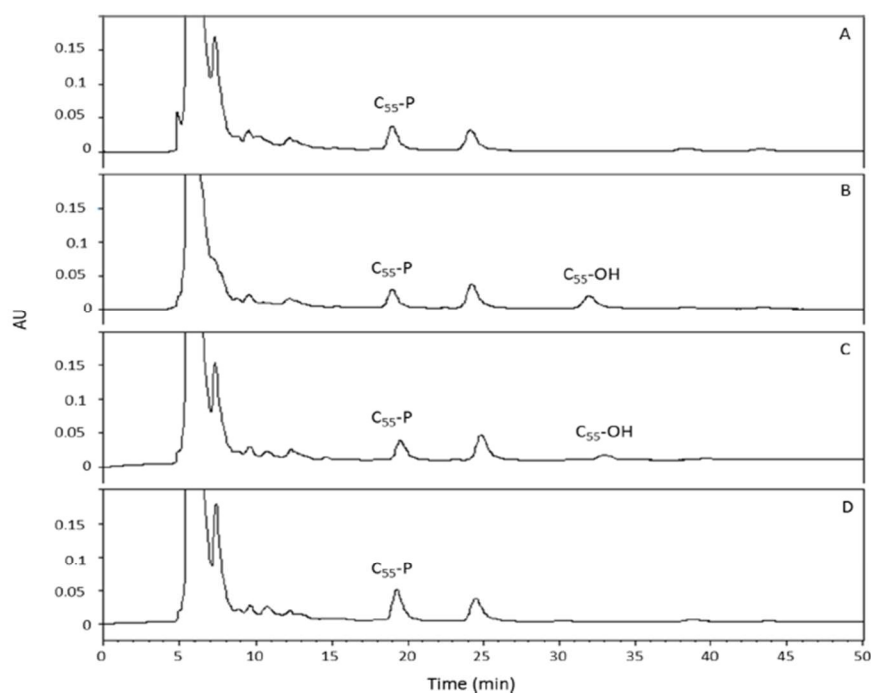


Figure 4. HPLC analysis of membrane extracts (Bligh and Dyer procedure) prepared from *E. coli* FB8 cells carrying either the empty pASK vector (A) or pASK plasmids expressing the wild-type PcaM1 (B), its isolated cytotoxic domain (C) or the D222A mutant (D), respectively. Cells were grown exponentially in 2YT medium, and PcaM1 variants' expression was induced at $OD_{600} = 0.2$ by the addition of anhydrotetracycline. Cells were harvested just before the onset of lysis and treated by sonication. Membrane extracts were prepared and isoprenoids extracted and analyzed by HPLC as described in the text.

Table 1. Pool levels of C_{55} -isoprenoids in *E. coli* FB8 cells following periplasmic expression of PcaM1 and its variants.

Periplasm-Expressed Protein	Pool Level (nmol/g (Dry Weight) of Bacteria) ^a			
	C_{55} -PP	C_{55} -P	C_{55} -OH	Total
Control	57 ± 28	77 ± 7	ND	134 ± 31
PcaM1	0 ± 1	68 ± 10	52 ± 18	120 ± 25
$\Delta 1-107$ PcaM1	4 ± 7	80 ± 11	27 ± 12	110 ± 15
D222A PcaM1	13 ± 20	127 ± 12	ND	140 ± 20

FB8 cells carrying the pASK-IBA4 empty vector (control) or pASK plasmids expressing the wild-type PcaM1, the D222A mutant or the isolated cytotoxic domain ($\Delta 1-107$) were grown exponentially in 2YT medium, and anhydrotetracycline was added when the OD_{600} reached 0.2. Cultures were continued until an arrest of growth was observed and cells were harvested before the onset of cell lysis. The pools of isoprenoids were extracted and quantified as described in the text. ^a Mean \pm SD of 5 independent experiments. ND, not detectable.

These experiments allowed us to detect the appearance and accumulation of C_{55} -OH in membranes of *E. coli* cells expressing wild-type and truncated forms of PcaM1 (Figure 4), which was expected considering the lytic effect of this bacteriocin in liquid culture conditions and was reminiscent of previous data observed with ColM [2,23]. This C_{55} -OH pool represented between one third and a half of the total isoprenoid pool in both *E. coli* strains. Another interesting trait was the total isoprenoid content that remained generally quite similar, irrespective of the strain considered (Table 1). In both the full-length and truncated PcaM1-expressing strains, this effect is likely due to the fact that the C_{55} -PP pool was depleted to maintain the C_{55} -P pool at a standard level of about 75 nmol/g of dry cell weight, as previously described for *E. coli* [23].

However, the *E. coli* strain expressing the D222A mutant form of PcaM1 did not show the same pattern of isoprenoids. Surprisingly indeed, although this mutant also provoked *E. coli* cell lysis in liquid culture conditions, membranes of the latter strain did not contain any detectable C₅₅-OH. Here too, the pool of C₅₅-PP was significantly depleted, but a ca. 60% increase of the C₅₅-P pool was observed in these conditions. As will be discussed later, these findings suggested that the D222A enzymatically-inactive mutant also inhibited the same step of the peptidoglycan synthesis pathway, without displaying any lipid II-degrading activity.

To unambiguously demonstrate that the observed cell lysis was the consequence of an arrest of peptidoglycan synthesis and to investigate why the strain expressing the catalytic mutant form of PcaM1 also lysed, cell labeling experiments were performed, in which radiolabeled *meso*-[¹⁴C]A₂pm was used as a specific marker of peptidoglycan biosynthesis. To ensure a specific and optimal labeling of peptidoglycan, an *E. coli* FB8 Δ *lysA* mutant strain was used and grown in minimal medium conditions, as previously described [2,24]. In this way, we were able to follow the specific incorporation of *meso*-[¹⁴C]A₂pm into the peptidoglycan macromolecule of *E. coli* cells expressing wild-type and mutant forms of PcaM1, compared to a control strain (Figure 5).

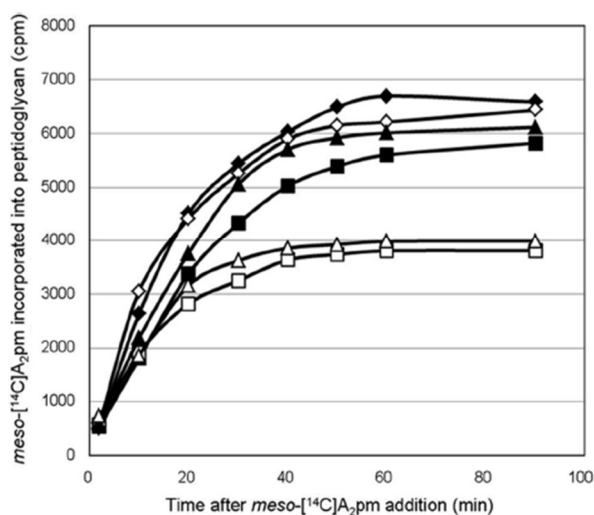


Figure 5. Effect of the periplasmic expression of wild-type and mutant forms of PcaM1 on *meso*-[¹⁴C]A₂pm incorporation into peptidoglycan. Cells were grown in M63-glucose minimum medium supplemented with lysine, threonine and methionine. When the OD₆₀₀ reached 0.2, anhydrotetracycline was added, or not, and *meso*-[¹⁴C]A₂pm was added 10 min thereafter. The incorporation of radioactivity into the peptidoglycan (trichloroacetic acid (TCA)-insoluble material) was then followed as described in the text. Symbols: diamonds, strain carrying the pASK-IBA4 empty vector; squares and triangles, strains expressing the wild-type and D222A mutant PcaM1, respectively. Open and closed symbols represent cultures treated or not with anhydrotetracycline, respectively.

As shown in Figure 5, *meso*-[¹⁴C]A₂pm was rapidly incorporated into the peptidoglycan polymer after its addition to the culture medium. When anhydrotetracycline was added, this incorporation was rapidly blocked in strains expressing either the wild-type or the D222A mutant form of PcaM1, but not in the control strain carrying the empty vector pASK-IBA4. This arrest of incorporation happened about 30 min after *meso*-[¹⁴C]A₂pm addition to the culture medium. As observed in Figure 2, *E. coli* cell lysis started about 40 min after addition of anhydrotetracycline. The observed lytic phenotype was thus clearly correlated to an arrest of peptidoglycan synthesis.

We then investigated the cellular distribution of the radioactive material in cells expressing PcaM1 variants. Radioactivity counts recovered in the soluble and insoluble cell fractions from both strains are presented in Table 2, compared to control cells.

Table 2. Effects of PcaM1 variants on the cellular distribution of *meso*-[¹⁴C]A₂pm incorporated into *E. coli* cells.

<i>E. coli</i> cells	Radioactivity (counts per min)		
	Soluble Fraction	Insoluble Fraction	Total
Control cells	40,240 (100%)	271,130 (100%)	311,370
+ wild-type PcaM1	168,100 (417%)	104,210 (38%)	272,310
+ D222A PcaM1	163,950 (407%)	112,420 (41%)	276,370

FB8 *lysA* cells (50 mL cultures) were grown in M63-glucose minimum medium supplemented with lysine, threonine and methionine. At an OD₆₀₀ of 0.2, anhydrotetracycline was added and *meso*-[¹⁴C]A₂pm (0.2 kBq/mL) 20 min thereafter. Cells were harvested after 30 min of labeling, just before the onset of cell lysis and were treated with boiling water. Suspensions were ultracentrifuged, and the radioactivity present in the supernatant (soluble) and pellet (insoluble) fractions was measured. The distribution of the radioactivity in these fractions (peptidoglycan and its different intermediate precursors) was then analyzed using appropriate analytical procedures, as described in the text.

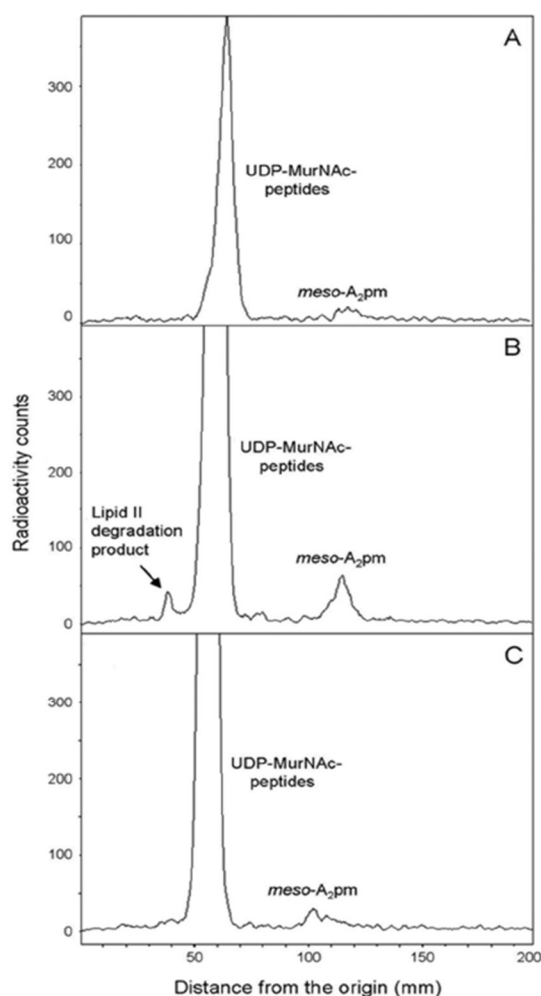


Figure 6. TLC analysis of the soluble fractions from *E. coli* FB8 *lysA* cells expressing (B,C) or not (A) the wild-type and D222A mutant forms of PcaM1, respectively. The peak corresponding to UDP-MurNAc-peptides was shown to contain essentially UDP-MurNAc-pentapeptide (>95%) and low amounts of UDP-MurNAc-tripeptide by HPLC analysis. A peak of radiolabeled lipid II degradation product 1-PP-MurNAc(pentapeptide)-GlcNAc was only observed in cells expressing the wild-type form of PcaM1.

These data first showed that the total radioactivity incorporated in the three *E. coli* strains was similar, ca. 300,000 counts per min in the typical experiment shown, indicating that the expression of the PcaM1 variants did not affect the *meso*-[¹⁴C]A₂pm uptake. Expression of PcaM1 was shown to result in a 60% decrease of incorporated radioactivity in the insoluble fraction, which contains peptidoglycan (mainly) and lipids I and II intermediates (Table 2), consistent with our previous data shown in Figure 3. As a result, the “missing” radioactivity that has not been incorporated in the polymer was found to be accumulated in the soluble fraction, which is known to contain *meso*-[¹⁴C]A₂pm and the peptidoglycan nucleotide precursors as the main labeled compounds. Chromatography (TLC) analysis of these fractions (Figure 6) confirmed the decrease of radioactivity counts incorporated in the polymer and the significant (four-fold) accumulation of the UDP-MurNAc-pentapeptide precursor as the main soluble radiolabeled compound, as expected for an inhibition of the membrane steps of this pathway. Moreover, an additional peak of radiolabeled compound was observed (*R_f* of 0.3), specifically when soluble extracts from the strain expressing the wild-type PcaM1 were analyzed (Figure 6). This peak, which was also observed in ColM-treated cells, had been earlier identified as the lipid II-degradation product 1-PP-MurNAc(pentapeptide)-GlcNAc [2]. The absence of this peak in extracts from cells expressing the D222A variant was perfectly consistent with the absence of a detectable pool of C₅₅-OH in these cells, as well as with the inactivity of this mutant protein.

3. Discussion

In this work, we focused our investigations on PcaM1, one of the two ColM-like orthologues produced by *P. carotovorum*. We first revisited the results previously published by Grinter and collaborators in 2012 by producing the wild-type and catalytic point mutant D222A PcaM1 proteins. We thus confirmed, on the one hand, the enzymatic activity of lipid II degradation by the wild-type PcaM1, whereas the mutant was inactive, and on the other hand, the absence of cytotoxic activity of PcaM1 preparation on *E. coli* cells, as no growth inhibition zone was detected when up to 57 µg of this protein were spotted on *E. coli* BW25113-inoculated agar plates.

Although PcaM1, as well as the other ColM orthologues [11] did not display any cytotoxic activity against *E. coli* cells, we recently showed that the application of an osmotic shock treatment to *E. coli* cells allowed the *P. aeruginosa* ColM orthologue (PaeM) to bypass the outer membrane reception and translocation steps, reach its lipid II target and thus exert its deleterious activity [13]. This allowed us to demonstrate that PaeM, as well as its isolated catalytic domain, was able to kill *E. coli* cells. It was the first example of a ColM-like protein capable of killing another bacterial species.

Another way to get access to the *E. coli* periplasmic space was to fuse ColM to the OmpA protein signal sequence. In these conditions, the hybrid ColM was directly exported from the cytoplasm to the periplasm of the producing cells and was then demonstrated to be toxic [22]. Therefore, to check whether another ColM orthologue would be able to kill *E. coli* cells by this approach, we fused the PcaM1 to OmpA signal sequence and expressed the hybrid protein in *E. coli*. In this way, we visualized that PcaM1 was toxic for *E. coli* cells, as the controlled induction of its expression led to cell lysis. To the best of our knowledge, this is the first example of cell lysis due to periplasmic expression of a ColM-like orthologue. A hybrid protein obtained by fusion of the PcaM1 variant truncated of its 107 first amino acids to the OmpA signal sequence led to the same lytic phenotype, as also did the D222A point mutant PcaM1. That the expression of the isolated catalytic domain of PcaM1 yielded cell lysis in these conditions was somewhat expected, as this had been observed also with the catalytic domain of ColM [22]. However, the lytic effect exhibited by the D222A variant was much more surprising. Indeed, as described above, no enzymatic activity of *in vitro* degradation of lipid II was reported for this mutant protein. The Asp222 residue from PcaM1 corresponds to Asp226 in ColM, which has been previously demonstrated to be essential for the catalytic activity and, consequently, for the cytotoxicity of ColM [21]. Moreover, it was previously shown that the D226N mutant of ColM did not display any toxic activity when exported to the periplasm [22]. The lytic phenotype of the *E. coli* strain expressing the D222A PcaM1 mutant was thus intriguing. Cell lysis was observed even at low doses

of anhydrotetracycline, suggesting that toxicity is due to an effect of mutant PcaM1 per se and not to a potential toxicity of protein overexpressed (Figures S3 and S4).

As the induction of periplasmic PcaM1 expression triggered *E. coli* cell lysis whatever the PcaM1 variant expressed, we investigated whether this phenotype was indeed the consequence of an arrest of peptidoglycan biosynthesis. Accordingly, ColM and its orthologue PaeM were previously shown to exhibit bacteriolytic and bacteriostatic effects on their specific *E. coli* and *Pseudomonas* targeted species, respectively, that were in both cases correlated to an inhibition of peptidoglycan biosynthesis [2,11]. In this respect, optical microscopy analyses showed that PcaM1-producing cells displayed greatly altered, elongated and bloated morphologies that are characteristic of an impaired cell wall biogenesis. The arrest of peptidoglycan synthesis in these cells was clearly demonstrated by (i) radiolabeling experiments, using *meso*-[¹⁴C]A₂pm as a specific marker, that revealed the accumulation of the cytoplasmic UDP-MurNAc-pentapeptide precursor and the concomitant arrest of the synthesis of the polymer, as well as the presence of the lipid II degradation product; (ii) analyses of isoprenoid pool levels in membranes, which revealed the appearance and accumulation of C₅₅-OH, which normally do not exist in *E. coli* cells. Quite interestingly, although the D222A PcaM1 mutant did not show detectable lipid II-degrading enzymatic activity, either in vitro (enzymatic assays) or in vivo (no C₅₅-OH or 1-PP-MurNAc(pentapeptide)-GlcNAc detected in the cell content), its expression in the periplasm led to the same and specific dramatic morphological changes and arrest of peptidoglycan synthesis that have been observed with the functional wild-type PcaM1. This intriguing result could be interpreted in several ways. For instance, the D222A mutant whose lipid II hydrolase activity is abolished likely conserved its ability to interact with this substrate. A sequestration of the lipid II by the mutant protein could thus be envisaged, which would result in an inhibition of peptidoglycan polymerization steps catalyzed by the penicillin-binding proteins (PBP). Validation of such a hypothesis would need to precisely determine the relative numbers of lipid II and PcaM1 molecules present in the periplasmic space of *E. coli* in these conditions, as well as to develop in vitro analyses of these protein-substrate interactions. Further work is thus needed to elucidate by which mechanism this inactive variant of PcaM1 could still interfere so efficiently with the peptidoglycan synthesis pathway.

In this study, we also tested the periplasmic expression of the three PcaM1 variants in an *E. coli* strain carrying a deletion of the FkpA chaperone-encoding gene. Contrary to what was previously observed with periplasmic variants of ColM, i.e., that the full-length ColM protein and its isolated catalytic domain were FkpA-dependent and -independent, respectively [22], all of the PcaM1 variants constructed here were able to induce *E. coli* cell lysis in the absence of FkpA, meaning that no maturation process, at least by this chaperone, was needed for them to be toxic in *E. coli*. It thus seems that the PcaM1 protein was produced right away in an active form in these particular conditions of heterologous expression.

This work thus clearly demonstrates that the limiting reception and translocation steps usually required for colicin cytotoxic activity can be bypassed. We already knew that ColM-like orthologues were able to hydrolyze in vitro peptidoglycan lipid II intermediates of various composition and structure originating from major pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*) [25], and we confirmed that they could potentially do it also in vivo, as soon as they can reach the periplasmic space of the targeted bacterial species. In *E. coli*, the ColM immunity protein, Cmi (or ImM), that prevents ColM toxicity effect is located in this compartment. A gene coding for a Cmi homologue has been identified in the genome of *P. carotovorum* PC1, which likely confers immunity towards PcaM1 in this species [14]. As these enzymatic colicins clearly constitute powerful molecules with great potential as non-conventional antimicrobial agents, we now consider engineering them in order to design chimera colicins able to exhibit a broader spectrum of antibacterial activity.

4. Materials and Methods

4.1. Bacterial Strains, Plasmids and Growth Conditions

The *E. coli* strains DH5 α (Bethesda Research Laboratories) and C43(DE3) (Avidis) were used as the hosts for the propagation of plasmids and the production of proteins, respectively. The *E. coli* strains FB8 and BW25113 were used for bacteriolytic activity assays, while the *E. coli* FB8 Δ *lysA::kan* was used for *meso*-[¹⁴C]A₂pm incorporation experiments [24]. The *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* strain PC1 was kindly provided by Dr. Iris Yedidia [26]. The construction of the plasmid vector pET2160, a pET21d derivative allowing the expression of proteins with a C-terminal 6 \times histidine tag (His₆), has been previously described [11]. The pREP4groESL plasmid allowing overexpression of the bacterial chaperones was obtained from Amrein, K., et al. [27]. The pASK-IBA4 vector was used for the export of proteins to the periplasm of *E. coli*, as described previously [22]. For cloning experiments, protein production and lysis experiments, cells were grown aerobically at 37 °C in 2YT medium [28], whereas they were grown in M63 minimum medium supplemented with 0.4% glucose and 100 μ g/mL each of lysine, threonine and methionine for *meso*-[¹⁴C]A₂pm incorporation experiments [2,24]. When needed, ampicillin and kanamycin were used at 100 and 50 μ g/mL, respectively. Growth was monitored at 600 nm with a Shimadzu UV-1601 spectrophotometer.

4.2. Molecular Biology Techniques

Polymerase chain reaction (PCR) amplification of genes was performed in a Thermocycler 60 apparatus (Bio-Med, Guilford, CT, USA) using the Expand-Fidelity polymerase (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). DNA fragments were purified with the Wizard PCR Preps DNA purification kit (Promega, Charbonnières-les-Bains, France), and standard procedures for DNA digestion, ligation, agarose gel electrophoresis and plasmid isolations were used [29]. *E. coli* cells were transformed with plasmid DNA by the method of Dagert and Ehrlich [30] or by electroporation.

4.3. Construction of Expression Plasmids

A plasmid allowing high-level overproduction of the ColM homologue gene from *P. carotovorum* (*pcaM*) was constructed as follows: PCR primers Pcam-O1 and Pcam-O2 (Table 3) were designed to incorporate NcoI and BglII sites at the 5' and 3' extremities of the gene, respectively. The gene was amplified from the PC1 strain chromosome, and the DNA fragment was treated with NcoI and BglII and ligated between the same sites of the vector pET2160. The resulting plasmid, pMLD365, allowed the expression of the protein with a His₆-tag (Arg-Ser-His₆ extension) at the C-terminal extremity. To produce the D222A catalytic point mutant of PcaM1, site-directed mutagenesis of the C-terminal His₆-tagged protein was performed directly on the pMLD365 expression plasmid by using the QuikChange II XL mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA), using the pair of complementary nucleotides Pcam-mut1 and Pcam-mut2. This yielded the pMLD464 plasmid.

Table 3. Oligonucleotides used in this study.

Oligonucleotides	Sequence ^a
Pcam-O1	5'-CGCGCC ATGG CTACTTATAAAATTAAGATTTGACAGG-3' (NcoI)
Pcam-O2	5'-CGCGAGATCTTAAACGCTGACCACGCCAGAAATATC-3' (BglII)
Pcam-O3	5'-CGCGAAGCTTATAAACGCTGACCACGCCAGAAATATC-3' (HindIII)
Pcam-mut1	5'-GGATTCGTGCTTATAATGCTCTTTATGATGCCAATCCC-3'
Pcam-mut2	5'-GGGATTGGCATCATAAAGAGCATTATAAGCACGAATCC-3'
Pcam- Δ 1-107	5'-CGCGCC ATGG GATTACTTGGTGGCAACGATTCTCCAG-3' (NcoI)

^a Restriction sites (in bold) introduced in oligonucleotides are indicated in parentheses, and the initiation codon of *pcaM* gene and derivatives is underlined.

Export of the PcaM protein to the periplasm of *E. coli* was obtained by fusing the sequence of this bacteriocin to that of the signal peptide of OmpA, using the pASK-IBA4 plasmid as the vector. The gene was amplified with Pcam-O1 and Pcam-O3 primers, and the fragment was cleaved by NcoI and HindIII and inserted between the same sites of pASK-IBA4, yielding the pMLD381 plasmid. Plasmid pMLD395, a pMLD381 derivative plasmid expressing the D222A PcaM1 mutant, was generated by site-directed mutagenesis using the Pcam-mut1 and Pcam-mut2 oligonucleotides. Plasmid pMLD403, a pASK-IBA4 derivative plasmid expressing an N-terminally-truncated PcaM1 variant lacking the first 107 residues, was generated as described for pMLD381, except that the oligonucleotides used for PCR gene amplification were the Pcam- Δ 1-107 and Pcam-O3 primers.

4.4. Production and Purification of Wild-Type and Mutant Forms of PcaM1

For the expression of wild-type and mutant PcaM1 proteins, C43(DE3) cells were transformed with the pMLD365 or pMLD464 plasmid, respectively, as well as with the chaperone-expressing plasmid pREP4groESL. Cells were grown at 37 °C in 2YT medium supplemented with ampicillin and kanamycin (1-liter cultures), and when the optical density at 600 nm (OD_{600}) of the culture reached 0.8, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added at a final concentration of 1 mM and growth continued at 22 °C overnight. Then, the cells were harvested, washed with 40 mL of an 0.9% NaCl solution and finally suspended in 12 mL of Buffer A (20 mM Tris-HCl, pH 7.2, 200 mM NaCl, 0.1% 2-mercaptoethanol, 0.5 mM $MgCl_2$ and 10% glycerol). In each case, the bacterial suspension was disrupted by sonication (Bioruptor Vibracell sonicator, model 72412, Fisher Scientific, Illkirch, France) and then centrifuged at 4 °C for 30 min at $200,000 \times g$ in a TL100 Beckman centrifuge. The wild-type or mutant PcaM1-containing supernatant was subjected to purification.

His₆-tagged wild-type and mutant forms of PcaM1 were purified first by affinity chromatography on nickel-nitrilotriacetate (Ni^{2+} -NTA)-agarose polymer (Qiagen[®], Courtaboeuf, France). All procedures were performed at 4 °C. The crude soluble supernatant obtained according to the procedure described above was mixed with 2 mL of polymer pre-equilibrated with Buffer A containing 10 mM imidazole and incubated for 30 min at 4 °C according to the Qiagen[®] recommendations. Then, the washing and elution steps were performed with a discontinuous gradient of imidazole (20–200 mM) in Buffer A. Eluted proteins were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The relevant fractions were pooled, concentrated to a volume of 5 mL by centrifugation on a 10-kDa cut-off membrane (Amicon Ultra, Millipore, Molsheim, France) and then submitted to an extra purification step by gel filtration (Äkta Prime system, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) on a Hi-Load 16/600 Superdex S200 column (GE) pre-equilibrated with one column volume of Buffer A without $MgCl_2$ and glycerol and previously calibrated with blue dextran, conalbumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, ribonuclease, aprotinine and tyrosine. Elution was performed with the same buffer at a flow rate of 1 mL/min. The purity of the fractions corresponding to the PcaM1 elution peak was checked by SDS-PAGE, and the final protein concentration was determined by using a NanoDrop[™] 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). The absorption spectra of purified wild-type and mutant forms of PcaM1 were determined using a Jasco V-630 spectrophotometer. Glycerol (10% v/v, final concentration) was eventually added for storage of the protein at –20 °C.

4.5. Hydrolase Activity Assays

The PcaM1 enzymatic activity was tested in a reaction mixture (10 μ L) containing 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM $MgCl_2$, 150 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol, 12 μ M [¹⁴C]radiolabeled lipid II (140 Bq) and 0.2% *n*-dodecyl- β -D-maltopyranoside (DDM), as previously described [11]. The reaction was started by the addition of the purified protein (in 5 μ L of Buffer A) and incubated for 30 min at 37 °C with shaking (Thermomixer, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Germany). For the determination of the Michaelis constants (K_m), assay conditions were as described above, except that the concentration of lipid II varied from 6–100 μ M. The reaction was stopped by heating at 95 °C for

1 min, and mixtures were analyzed by thin-layer chromatography (TLC) on pre-coated silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck, Molsheim, France) using 1-propanol/ammonium hydroxide/water (6:3:1; v/v/v) as the mobile phase. The radioactive spots corresponding to the substrate (lipid II) and product (1-PP-MurNAc [pentapeptide]-GlcNAc) were located ($R_f = 0.7$ and 0.3 , respectively) and quantified with a radioactivity scanner (Rita Star, Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt, Germany).

4.6. Bacteriolytic Activity Assays on *E. coli*

FB8, BW25113 and BW25113 $\Delta fkpA$ *E. coli* strains, carrying pASK-derived plasmids for periplasmic expression of full-length, truncated or mutant PcaM1, were grown aerobically at 37 °C in 2YT-ampicillin medium (50-mL cultures). When the OD₆₀₀ reached 0.2, anhydrotetracycline was added at various final concentrations (from 0–400 ng/mL), and cell growth was followed by monitoring the absorbance at constant time intervals.

4.7. CFU

E. coli FB8 strains carrying the pASK plasmids allowing expression of the wild-type and D222A mutant forms of PcaM1 were grown in 2YT medium, and cultures were induced or not with 200 ng/mL of anhydrotetracycline when the OD₆₀₀ reached 0.2. Samples were taken every 20 min and plated on 2YT agar after appropriate serial dilutions. Colonies were counted after overnight incubation at 37 °C. These experiments were performed in triplicate, for both strains and both induced and uninduced conditions.

4.8. Peptidoglycan Labeling Experiments with Radioactive *meso*-[¹⁴C]A₂pm

To determine whether cells expressing wild-type or mutant forms of PcaM1 in the periplasm were truly impaired in peptidoglycan biosynthesis, the rate of incorporation of *meso*-[¹⁴C]A₂pm into the peptidoglycan of *E. coli* FB8 $\Delta lysA::kan$ strain transformed with pASK-IBA4, pMLD381 or pMLD395 expression plasmid was followed. The latter strains were grown exponentially in minimum M63 medium (30-mL cultures) supplemented with 0.4% glucose and 100 µg/mL each of lysine, methionine and threonine [2,24]. In fact, only lysine is required to complement the *lysA::kan* mutation of these strains, but the addition of methionine and threonine was used here to decrease as much as possible the internal cellular pool of A₂pm, as described previously [24,31]. When the OD₆₀₀ reached 0.2, cultures were treated with anhydrotetracycline (100 ng/mL), and *meso*-[¹⁴C]A₂pm (0.2 kBq/mL) was added 10 min later. The incorporation of *meso*-[¹⁴C]A₂pm into the peptidoglycan polymer was then followed as described previously [2]. Briefly, 1-mL culture samples were collected regularly over time and added to 10 mL of ice-cold 5% trichloroacetic acid (TCA). Suspensions were kept on ice for 60 min, and the TCA-insoluble radiolabeled peptidoglycan material was then filtered over Whatman GF/C glass fiber filters. The filters were washed with 5% TCA and dried, and the radioactivity was counted with a liquid scintillation spectrophotometer after their immersion in a solvent system consisting of 2 mL of water and 13 mL of Unisafe 1 scintillator (Zinsser Analytic, Maidenhead, UK).

4.9. Cellular Distribution of *meso*-[¹⁴C]A₂pm

To identify the step in peptidoglycan synthesis that was affected following periplasmic expression of the PcaM1 variants, the cellular distribution of [¹⁴C]A₂pm incorporated in these strains was analyzed in more detail. Fifty-milliliter cultures of FB8 $\Delta lysA$ strain transformed with pASK-IBA4, pMLD381 or pMLD395 expression plasmids were performed as above in M63-glucose minimal medium supplemented with lysine, threonine and methionine. At an OD₆₀₀ of 0.2, anhydrotetracycline (100 ng/mL) was added and *meso*-[¹⁴C]A₂pm (0.2 kBq/mL) 20 min thereafter. After 30 min of labeling, cultures were rapidly chilled to 0–4 °C, collected by centrifugation and the cell pellets suspended in 3 mL of boiling water. After 15 min at 100 °C, suspensions were chilled and centrifuged at 200,000 × *g* for 20 min. The supernatant was lyophilized, and both the soluble (supernatant) and insoluble (pellet)

fractions were suspended in 250 μ L of water. The total radioactivity recovered in these two cell fractions was measured. The insoluble fraction is known to contain peptidoglycan and lipid intermediates I and II, as well as the soluble fraction *meso*-[14 C]A₂pm and the nucleotide precursors as labeled compounds [2]. Aliquots were analyzed by TLC on silica gel plates with 1-propanol/ammonium hydroxide/water (6:3:1; v/v/v) as the mobile phase. Under such conditions, peptidoglycan remains at the origin, and UDP-MurNAc-peptides, *meso*-[14 C]A₂pm and lipid intermediates migrated with R_f values of 0.35, 0.55 and 0.7, respectively. An additional spot (R_f of 0.3) corresponding to the lipid II degradation product 1-PP-MurNAc(pentapeptide)-GlcNAc was observed following the induction of PcaM1 expression.

4.10. Quantitation of C₅₅-P and Its Derivatives in Membranes of *E. coli* Strains Expressing Periplasmic PcaM1 and Derivatives

Cultures (100 mL) of *E. coli* strain FB8 expressing the different periplasmic PcaM1 variants were grown as described above, and cells were harvested just before the onset of lysis, i.e., about 40 min after the induction of protein expression by anhydrotetracycline. Isoprenoid extraction was performed from washed membrane cell pellets of the different tested strains according to two different procedures, as previously described [23]. Briefly, each culture was divided in two 50 mL samples, which were treated according to the Bligh and Dyer procedure [32] to directly quantify C₅₅-P and C₅₅-OH pool levels, or to Kato's procedure [33], to determine the C₅₅-PP pool level (through this procedure, C₅₅-PP is totally converted into C₅₅-P). The resulting isoprenoid-containing organic phases were subsequently submitted to HPLC analysis for quantitation, using an isocratic elution system (2-propanol:methanol 1:4 (v/v) containing 10 mM phosphoric acid) on a reverse-phase Nucleosil C18 column (5 μ m, 250 \times 4.6 mm). The flow rate was 0.6 mL/min, and the quantitation of isoprenoids, monitored at 210 nm, was performed with respect to commercial compounds previously injected as standards in the same conditions.

4.11. Optical Microscopy Analyses

Bacteria were visualized using a DMIRE2 optical microscope (Leica) equipped with a CCD camera (CoolSNAP HQ2, Roper Scientific, Martinsried, Germany).

4.12. MALDI-TOF Mass Spectrometry

MALDI-TOF mass spectra of the wild-type PcaM1 were recorded in the linear mode with delayed extraction on a PerSeptive Voyager-DE STR instrument (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) equipped with a 337-nm laser. Buffer and glycerol were removed from the samples by using a ZipTip C₄ pipette tip (Merck Millipore, Molsheim, France) according to the manufacturer's recommendations with slight modifications. Briefly, the bacteriocin was adsorbed on ZipTip, and after it was washed with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), the bacteriocin was eluted with 7.5 μ L of 0.1% TFA in 70% acetonitrile. Subsequently, 1 μ L of matrix solution (10 mg/mL sinapinic acid in 0.1% TFA-acetonitrile (70:30, v/v)) was deposited on the plate, followed by 0.3, 0.5 or 1 μ L of concentrated bacteriocin. After evaporation of the solvents, spectra were recorded in the positive mode at an acceleration voltage of +25 kV and an extraction delay time of 300 ns. Carbonic anhydrase was used as an external calibrant.

4.13. Chemicals

[14 C]lipid II labeled in the GlcNAc moiety was prepared as described previously [2]. The lipid II used in this study was C₅₅-PP-MurNAc(L-Ala- γ -D-Glu-*meso*-A₂pm-D-Ala-D-Ala)-GlcNAc, where *meso*-A₂pm represents *meso*-diaminopimelic acid. C₅₅-PP, C₅₅-P and C₅₅-OH were purchased from the Institute of Biochemistry and Biophysics of the Polish Academy of Sciences (Warsaw, Poland) and *meso*-[14 C]A₂pm from the Commissariat à l'Énergie Atomique (Saclay, France). *N*-Dodecyl- β -D-maltopyranoside (DDM) was from Anatrace (Maumee, OH, USA), isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) from Eurogentec (Angers, France) and Ni²⁺-nitrilotriacetate agarose

from Qiagen (Courtaboeuf, France). Antibiotics and reagents were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Synthesis of oligonucleotides and DNA sequencing were done by Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany).

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/2079-6382/5/4/36/s1: Figure S1: Gel filtration elution profile and SDS-PAGE of the purified wild-type PcaM1 protein; Figure S2: MALDI-TOF mass spectrometry analysis of the purified wild-type PcaM1; Figure S3: Dose-dependent effect of anhydrotetracycline on the growth of *E. coli* FB8 cells expressing the wild-type or D222A mutant PcaM1; Figure S4: Growth and viability of *E. coli* FB8 cells expressing the wild-type or D222A mutant PcaM1; Figure S5: Effects of the periplasmic expression of the different PcaM1 variants on the growth of *E. coli* BW25113 and BW25113 $\Delta fkpA$ strains.

Acknowledgments: We thank Iris Yedidia for the PC1 strain and Magali Prigent (Station d'Imagerie, I2BC) for optical microscopy analyses. This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique and the University Paris-Sud (UMR 9198). We thank the Direction Générale de l'Armement (DGA) for the financial support to D.C.

Author Contributions: D.C., T.T., D.M.-L. and H.B. conceived of and designed the experiments. D.C., S.G., D.B., D.M.-L. and H.B. performed the experiments. D.C., D.M.-L., T.T. and H.B. analyzed the data. D.P., D.B. and A.B. contributed reagents/materials/analysis tools. H.B. wrote the paper with T.T.'s and D.M.-L.'s help.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

PcaM1	pectocin M1
ColM	colicin M
Cmi	ColM immunity protein
meso-A ₂ pm	meso-diaminopimelic acid

References

1. Cascales, E.; Buchanan, S.K.; Duché, D.; Kleanthous, C.; Lloubès, R.; Postle, K.; Riley, M.; Slatin, S.; Cavard, D. Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2007**, *71*, 158–229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. El Ghachi, M.; Bouhss, A.; Barreteau, H.; Touzé, T.; Auger, G.; Blanot, D.; Mengin-Lecreulx, D. Colicin M exerts its bacteriolytic effect via enzymatic degradation of undecaprenyl phosphate-linked peptidoglycan precursors. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 22761–22772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Killmann, H.; Videnov, G.; Jung, G.; Schwarz, H.; Braun, V. Identification of receptor binding sites by competitive peptide mapping: Phages T1, T5, and Φ 80 and colicin M bind to the gating loop of FhuA. *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 694–698. [[PubMed](#)]
4. Braun, V.; Patzer, S.I.; Hantke, K. Ton-dependent colicins and microcins: Modular design and evolution. *Biochimie* **2002**, *84*, 365–380. [[CrossRef](#)]
5. Hullmann, J.; Patzer, S.I.; Römer, C.; Hantke, K.; Braun, V. Periplasmic chaperone FkpA is essential for imported colicin M toxicity. *Mol. Microbiol.* **2008**, *69*, 926–937. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Helbig, S.; Patzer, S.I.; Schiene-Fischer, C.; Zeth, K.; Braun, V. Activation of colicin M by the FkpA prolyl *cis-trans* isomerase/chaperone. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 6280–6290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Gérard, F.; Brooks, M.A.; Barreteau, H.; Touzé, T.; Graille, M.; Bouhss, A.; Blanot, D.; van Tilbeurgh, H.; Mengin-Lecreulx, D. X-ray structure and site-directed mutagenesis analysis of the *Escherichia coli* colicin M immunity protein. *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 205–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Usón, I.; Patzer, S.I.; Rodríguez, D.D.; Braun, V.; Zeth, K. The crystal structure of the dimeric colicin M immunity protein displays a 3D domain swap. *J. Struct. Biol.* **2012**, *178*, 45–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Schöffler, H.; Braun, V. Transport across the outer membrane of *Escherichia coli* K12 via the FhuA receptor is regulated by the TonB protein of the cytoplasmic membrane. *Mol. Gen. Genet.* **1989**, *217*, 378–383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Pils, H.; Glaser, C.; Gross, P.; Killmann, H.; Olschläger, T.; Braun, V. Domains of colicin M involved in uptake and activity. *Mol. Gen. Genet.* **1993**, *240*, 103–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

11. Barreteau, H.; Bouhss, A.; Fourgeaud, M.; Mainardi, J.-L.; Touzé, T.; Gérard, F.; Blanot, D.; Arthur, M.; Mengin-Lecreux, D. Human- and plant-pathogenic *Pseudomonas* species produce bacteriocins exhibiting colicin M-like hydrolase activity towards peptidoglycan precursors. *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 3657–3664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Grinter, R.; Roszak, A.W.; Cogdell, R.J.; Milner, J.J.; Walker, D. The crystal structure of the lipid II-degrading bacteriocin syringacin M suggests unexpected evolutionary relationships between colicin M-like bacteriocins. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 38876–38888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Barreteau, H.; Tiouajni, M.; Graille, M.; Josseaume, N.; Bouhss, A.; Patin, D.; Blanot, D.; Fourgeaud, M.; Mainardi, J.-L.; Arthur, M.; et al. Functional and structural characterization of PaeM, a colicin M-like bacteriocin produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 37395–37405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Grinter, R.; Milner, J.; Walker, D. Ferredoxin containing bacteriocins suggest a novel mechanism of iron uptake in *Pectobacterium* spp. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e33033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Grinter, R.; Josts, I.; Zeth, K.; Roszak, A.W.; McCaughey, L.C.; Cogdell, R.J.; Milner, J.J.; Kelly, S.M.; Byron, O.; Walker, D. Structure of the atypical bacteriocin pectocin M2 implies a novel mechanism of protein uptake. *Mol. Microbiol.* **2014**, *93*, 234–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Shimizu, K.; Sekiguchi, M. Introduction of an active enzyme into permeable cells of *Escherichia coli*: Acquisition of ultraviolet light resistance by uvr mutants on introduction of T4 endonuclease V. *Mol. Gen. Genet.* **1979**, *168*, 37–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Braun, V.; Frenz, J.; Hantke, K.; Schaller, K. Penetration of colicin M into cells of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **1980**, *142*, 162–168. [[PubMed](#)]
18. Espeset, D.; Corda, Y.; Cunningham, K.; Benedetti, H.; Llobès, R.; Lazdunski, C.; Géli, V. The colicin A pore-forming domain fused to mitochondrial intermembrane space sorting signals can be functionally inserted into the *Escherichia coli* plasma membrane by a mechanism that bypasses the Tol proteins. *Mol. Microbiol.* **1994**, *13*, 1121–1131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Duché, D. The pore-forming domain of colicin A fused to a signal peptide: A tool for studying pore-formation and inhibition. *Biochimie* **2002**, *84*, 455–464. [[CrossRef](#)]
20. Schleifer, K.H.; Kandler, O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **1972**, *36*, 407–477. [[PubMed](#)]
21. Barreteau, H.; Bouhss, A.; Gérard, F.; Duché, D.; Boussaid, B.; Blanot, D.; Llobès, R.; Mengin-Lecreux, D.; Touzé, T. Deciphering the catalytic domain of colicin M, a peptidoglycan lipid II-degrading enzyme. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 12378–12389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Barnéoud-Arnoulet, A.; Barreteau, H.; Touzé, T.; Mengin-Lecreux, D.; Llobès, R.; Duché, D. Toxicity of the colicin M catalytic domain exported to the periplasm is FkpA independent. *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 5212–5219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Barreteau, H.; Magnet, S.; El Ghachi, M.; Touzé, T.; Arthur, M.; Mengin-Lecreux, D.; Blanot, D. Quantitative high-performance liquid chromatography analysis of the pool levels of undecaprenyl phosphate and its derivatives in bacterial membranes. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 213–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Mengin-Lecreux, D.; Siegel, E.; van Heijenoort, J. Variations in UDP-N-acetylglucosamine and UDP-N-acetylmuramyl-pentapeptide pools in *Escherichia coli* after inhibition of protein synthesis. *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 3282–3287. [[PubMed](#)]
25. Patin, D.; Barreteau, H.; Auger, G.; Magnet, S.; Crouvoisier, M.; Bouhss, A.; Touzé, T.; Arthur, M.; Mengin-Lecreux, D.; Blanot, D. Colicin M hydrolyses branched lipids II from Gram-positive bacteria. *Biochimie* **2012**, *94*, 985–990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Yishay, M.; Burdman, S.; Valverde, A.; Luzzatto, T.; Ophir, R.; Yedidia, I. Differential pathogenicity and genetic diversity among *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* isolates from monocot and dicot hosts support early genomic divergence within this taxon. *Environ. Microbiol.* **2008**, *10*, 2746–2759. [[PubMed](#)]
27. Amrein, K.E.; Takacs, B.; Stieger, M.; Molnos, J.; Flint, N.A.; Burn, P. Purification and characterization of recombinant human p50^{CSK} protein-tyrosine kinase from an *Escherichia coli* expression system overproducing the bacterial chaperones GroES and GroEL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 1048–1052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Miller, J.H. *Experiments in Molecular Genetics*; Cold Spring Harbor laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, NY, USA, 1972.

29. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed.; Cold Spring Harbor laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, NY, USA, 1989.
30. Dagert, M.; Ehrlich, S.D. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **1979**, *6*, 23–28. [[CrossRef](#)]
31. Wientjes, F.B.; Pas, E.; Taschner, P.E.; Woldringh, C.L. Kinetics of uptake and incorporation of meso-diaminopimelic acid in different *Escherichia coli* strains. *J. Bacteriol.* **1985**, *164*, 331–337. [[PubMed](#)]
32. Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911–917. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kato, J.; Fujisaki, S.; Nakajima, K.; Nishimura, Y.; Sato, M.; Nakano, A. The *Escherichia coli* homologue of yeast RER2, a key enzyme of dolichol synthesis, is essential for carrier lipid formation in bacterial cell wall synthesis. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 2733–2738. [[PubMed](#)]



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Pectocin M1 (PcaM1) Inhibits *Escherichia coli* Cell Growth and Peptidoglycan Biosynthesis through Periplasmic Expression

Dimitri Ch erier, Sean Giacomucci, Delphine Patin, Ahmed Bouhss, Thierry Touz , Didier Blanot, Dominique Mengin-Lecreulx and H el ne Barreteau

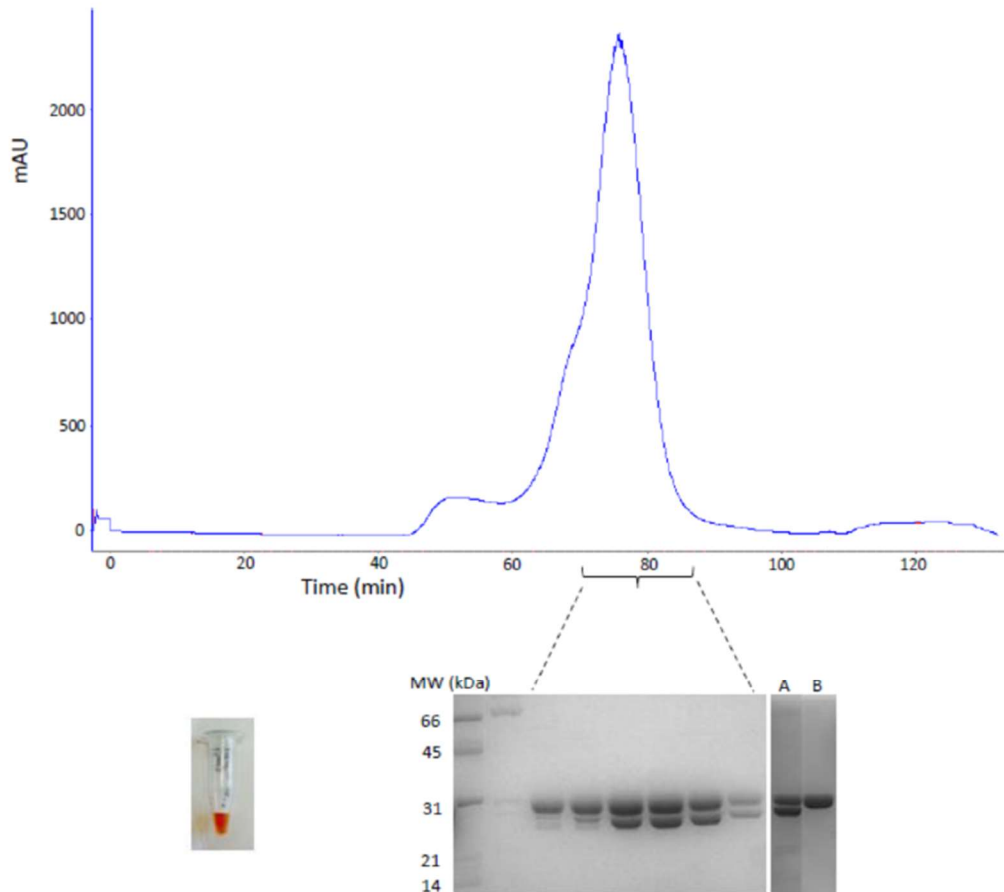


Figure S1. Gel filtration elution profile and SDS-PAGE of the purified wild-type PcaM1 protein. The absorbance at 280 nm was monitored, 2 mL fractions eluted between 72 and 84 min, and corresponding to the homogenous PcaM1, were collected and loaded onto SDS-PAGE. Additional lanes A and B represent native and boiled PcaM1 samples, respectively. As shown on the left (Eppendorf tube, Wesseling-Berzdorf, Germany), the purified concentrated PcaM1 has a red-brown color.

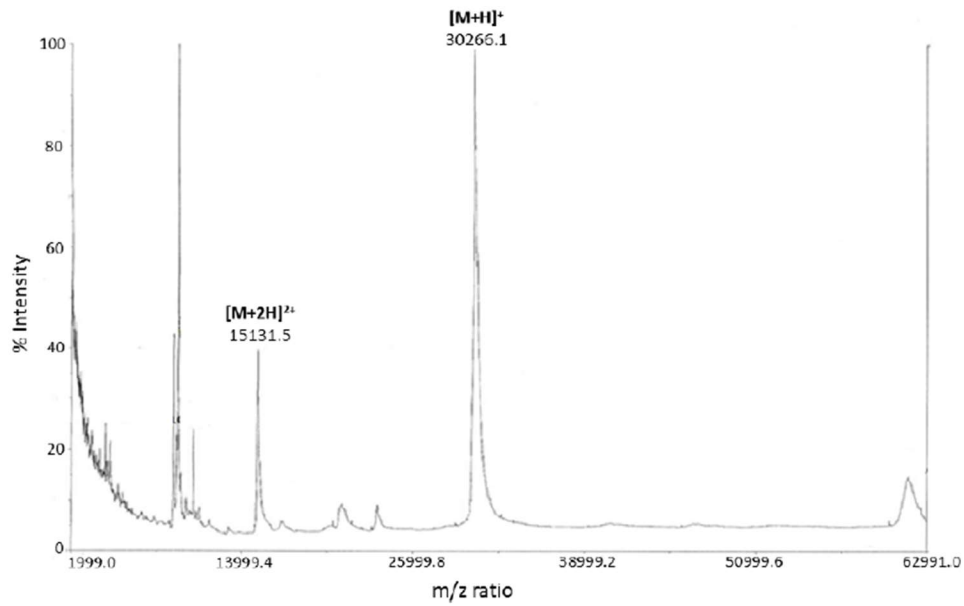


Figure S2. MALDI-TOF mass spectrometry analysis of the purified wild-type PcaM1. Peaks of m/z 30266.1 and 15131.5 were observed, that were assigned to be the $[M+H]^+$ and $[M+2H]^{2+}$ ions, respectively.

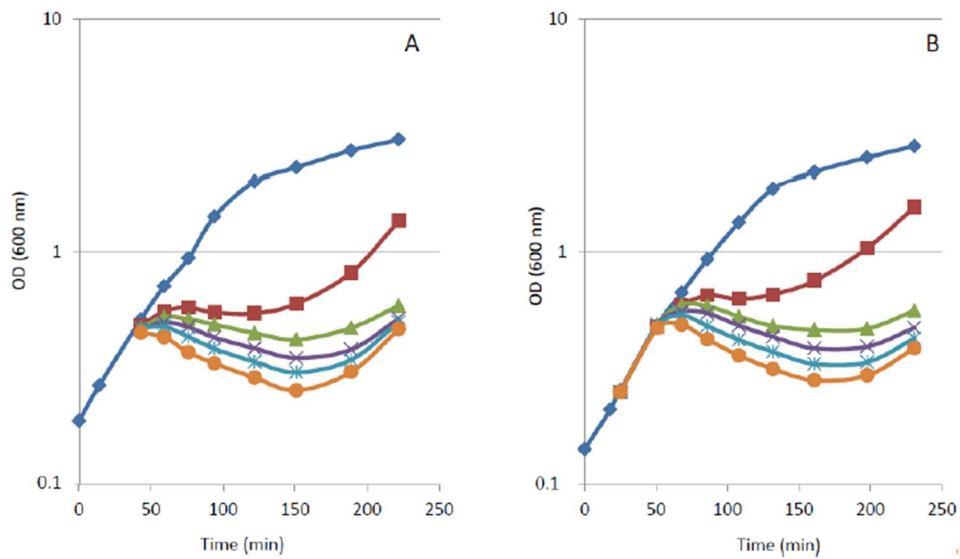


Figure S3. Dose-dependent effect of anhydrotetracycline on the growth of *E. coli* FB8 cells expressing the wild-type (A) or D222A mutant (B) PcaM1. Cells were grown at 37 °C in 2YT medium and protein expression was induced by addition of anhydrotetracycline at $OD_{600} = 0.25$ (t). Diamonds, squares, triangles, crosses, stars and circles correspond to anhydrotetracycline concentrations of 0, 30, 45, 60, 100 and 200 ng/mL, respectively.

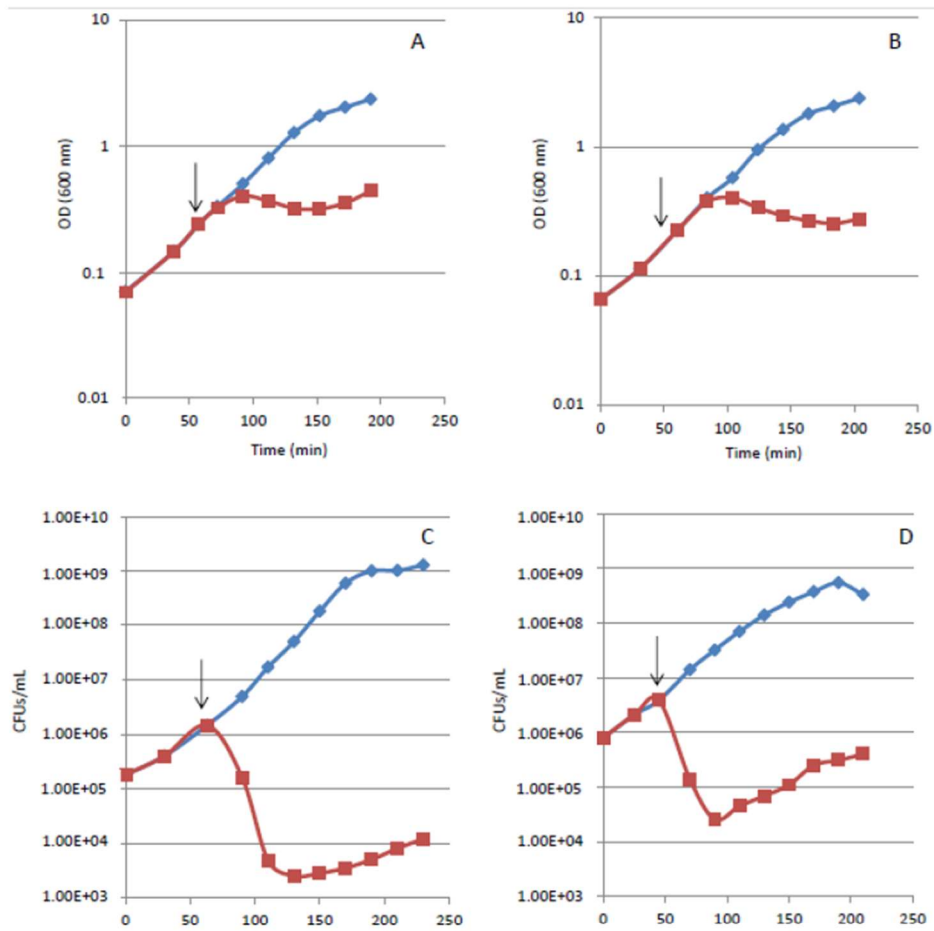


Figure S4. Growth (A,B) and viability (C,D) of *E. coli* FB8 cells expressing the wild-type (A,C) or D222A mutant (B,D) PcaM1. Strains were grown in 2YT medium at 37 °C. At OD₆₀₀ = 0.25, anhydrotetracycline (arrows) was added (red curves) or not (blue curves) at a final concentration of 200 ng/mL. The representative results of three independent experiments are presented.

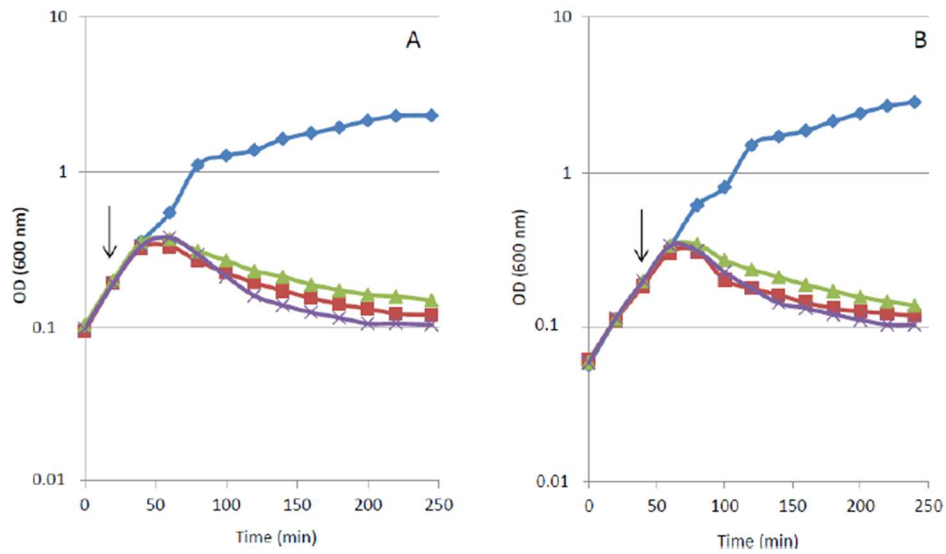


Figure S5. Effects of the periplasmic expression of the different PcaM1 variants on the growth of *E. coli* BW25113 (A) and BW25113 Δ *fkpA* (B) strains. Cells were grown in 2YT medium at 37 °C and expression of the PcaM1 variants was induced by addition of anhydrotetracycline at 200 ng/mL (arrows). Growth curves observed for strains carrying either the pASK-IBA4 empty vector, or pASK plasmids expressing the wild-type PcaM1, the D222A mutant or the isolated cytotoxic domain (Δ 1-107) are shown by diamonds, squares, triangles and crosses, respectively. The representative curves of three independent experiments are presented.



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons by Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

3. Résumé des principaux résultats obtenus :

Ce travail s'est focalisé sur l'étude de la cytotoxicité de la PcaM1 et de deux variants, PcaM1 D222A et PcaM1 Δ 1-107, vis-à-vis d'*E. coli*. Il a permis de mettre en évidence que ces trois formes protéiques étaient capables de provoquer la lyse bactérienne d'*E. coli* dès lors qu'elles avaient atteint le périplasme de la cellule cible.

Une première partie de l'étude a permis de caractériser biochimiquement la PcaM1, notamment par la détermination de son activité enzymatique ($0,53 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) et de la valeur de son K_m pour le lipide II ($55 \mu\text{M}$). Il a également été montré que la forme protéique PcaM1 D222A ne présentait aucune activité enzymatique de dégradation du lipide II *in vitro*, ce mutant ponctuel ayant déjà été montré comme inactif *in vivo* vis-à-vis d'une souche sensible de *P. carotovorum* (Grinter *et al.*, 2012a).

La seconde partie de l'étude s'est concentrée sur l'observation des effets de l'expression périplasmique des trois variants de la protéine PcaM1 chez *E. coli*. Nous avons observé que l'induction de l'expression des formes PcaM1 et PcaM1 Δ 1-107 provoquait la lyse des bactéries ; cet effet lytique a été mis en évidence par le suivi de la croissance bactérienne, en culture liquide, à 600 nm. Il a été montré que l'expression périplasmique de ces variants était à l'origine de changements morphologiques drastiques, tels que l'allongement des cellules ou l'apparition de protubérances membranaires à leur surface. Ces caractères phénotypiques sont, de manière générale, la conséquence de défauts dans la biogénèse de la paroi bactérienne. La lyse observée a été corrélée à un arrêt de synthèse du peptidoglycane au sein des bactéries traitées, par le biais d'un suivi de l'incorporation spécifique du *meso*-[^{14}C]A₂pm dans la voie de biosynthèse de ce polymère. En effet, l'induction de l'expression des protéines PcaM1 et PcaM1 Δ 1-107 a conduit à une déplétion du pool de C₅₅-PP ainsi qu'à une accumulation de C₅₅-OH, produit de dégradation du lipide II, dans les membranes des cellules traitées. Par ailleurs, une accumulation des précurseurs nucléotidiques ainsi que la présence de 1-PP-MurNAc(-pentapeptide)-GlcNAc, second produit de dégradation du lipide II, au sein de la fraction soluble, ont également été mises en évidence. L'ensemble de ces résultats a donc permis de démontrer que la lyse bactérienne des cellules productrices était bien la conséquence de l'action enzymatique des protéines PcaM1 et PcaM1 Δ 1-107.

De façon surprenante et inattendue, nous avons également observé un phénotype lytique suite à l'induction de l'expression périplasmique du mutant D222A de la PcaM1 chez *E. coli*, alors même que nous avons démontré son inactivité *in vitro* et qu'il avait été mis en évidence qu'il ne présentait aucune activité cytotoxique vis-à-vis d'une souche sensible de *P. carotovorum* (Grinter *et al.*, 2012a). Nous avons donc mené les mêmes analyses physiologiques que précédemment. Les mêmes changements morphologiques ont ainsi été observés suite à l'expression de ce mutant et la lyse bactérienne a également été corrélée à un arrêt de synthèse du peptidoglycane. En revanche, aucun produit de dégradation du lipide II n'a pu être détecté au sein des cellules traitées, que ce soit dans les membranes ou dans la fraction soluble. Une déplétion du pool de C₅₅-PP (- 88% par rapport à la souche contrôle) a cependant été observée, ce qui suggère que cette forme protéique, bien que catalytiquement inactive, pourrait avoir conservé une certaine capacité à lier (séquestrer) le lipide II, empêchant ainsi sa prise en charge par les PBP et donc la libération de C₅₅-PP. Ce résultat est d'autant plus surprenant qu'il avait été montré que l'expression périplasmique du mutant D226N de la ColM (correspondant au mutant D222 de la PcaM1), également inactif *in vitro*, n'était pas létale pour *E. coli*

(Barnéoud-Arnoulet *et al.*, 2010). Cette différence au niveau de l'effet physiologique observé pourrait être due à la nature de la mutation : en effet, le changement aspartate vs asparagine au sein de la ColM pourrait ne pas lui permettre d'accommoder le lipide II dans son site actif.

Au cours de cette étude, nous avons également pu mettre en évidence que les trois variants de la PcaM1 étaient capables d'induire la lyse bactérienne en absence de la protéine chaperonne FkpA. Un tel résultat était attendu pour la PcaM1 Δ 1-107, puisqu'il avait déjà été démontré que l'activité du domaine catalytique isolé de la ColM était indépendante de la protéine FkpA, qu'il soit adressé dans le périplasme par le biais d'un choc osmotique ou d'une expression périplasmique. En revanche, l'activité de la ColM entière était toujours dépendante de FkpA, peu importe sa voie d'accès au périplasme (Barreteau *et al.*, 2010; Barnéoud-Arnoulet *et al.*, 2010). Ces résultats posent donc question quant à un éventuel processus de maturation des homologues de la ColM : la ColM est-elle la seule à nécessiter une étape de maturation au sein de cette famille d'enzymes ? Les autres homologues sont-ils dépendants d'une autre chaperonne que FkpA pour pouvoir être actifs sur leur cible naturelle ? Les résultats obtenus ici suggèrent que les trois variants étudiés de PcaM1 se sont structurés dans une conformation active au sein du périplasme après leur passage *via* le système Sec, même en absence de FkpA.

4. Expériences complémentaires :

4.1. Etude de la cytotoxicité de la PcaM1 D222N vis-à-vis d'*E. coli* :

Les travaux décrits dans la publication ont mis en évidence qu'une forme catalytiquement inactive de la PcaM1 (PcaM1 D222A) était capable d'induire la lyse d'*E. coli*. Ce résultat surprenant était en contradiction avec ce qui avait été précédemment observé dans la littérature, car l'expression périplasmique de la ColM D226N, dont la mutation a lieu sur le résidu équivalent au résidu D222 de PcaM1, n'était pas létale pour *E. coli* (Barnéoud-Arnoulet *et al.*, 2010). Nous avons donc vérifié si la nature de la mutation (asparagine vs alanine) pouvait être à l'origine de la différence de phénotype observée.

4.1.1. Construction du vecteur d'expression périplasmique de la PcaM1 D222N :

Le mutant ponctuel D222N de la PcaM1 a été construit dans un vecteur de type pASK par mutagenèse dirigée à partir du plasmide pMLD381 en utilisant les oligonucléotides Pcam-mut3 et Pcam-mut4, selon le protocole décrit dans la partie Matériels et Méthodes, puis une souche d'*E. coli* BW25113 a été transformée par le plasmide pASK *pcaM1 D222N* obtenu.

4.1.2. Etude de l'expression périplasmique de la PcaM1 D222N :

L'effet de l'expression périplasmique du mutant PcaM1 D222N au sein de la souche BW25113 d'*E. coli* a été mis en évidence par le suivi de la croissance bactérienne à 600nm. Des souches BW25113 exprimant la PcaM1 WT ou contenant le plasmide pASK sans insert (pASK vide) ont respectivement servi de témoins positif et négatif (**Figure 97**).

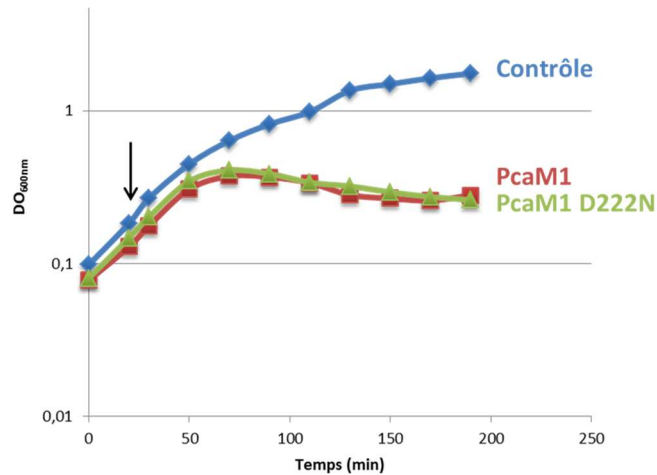


Figure 97 : Effet de l'expression périplasmique de la PcaM1 D222N sur la croissance d'*E. coli*. Les cellules d'*E. coli* (BW25113) ont été cultivées à 37°C dans du milieu 2YT-ampicilline et l'expression périplasmique des différents variants de la PcaM1 a été induite par ajout d'AHT dans le milieu à 60 ng.mL⁻¹ (Flèche). Pour chaque courbe, le nom de la protéine exprimée est indiquée.

L'induction de l'expression périplasmique de la PcaM1 D222N a conduit à l'apparition rapide d'un phénotype lytique comme cela avait pu être observé auparavant pour les protéines PcaM1, PcaM1 Δ1-107 et PcaM1 D222A. La nature de la mutation n'a donc pas affecté la capacité de la protéine PcaM1 à induire la lyse d'*E. coli*. Des analyses complémentaires seront désormais nécessaires afin de déterminer si la mutation D222N est responsable d'une perte d'activité à la fois *in vitro*, par la réalisation d'un test de dégradation du lipide II suite à sa surproduction et sa purification, et *in vivo*, par la quantification des pools de pré-nols au sein de la souche productrice. Le résidu D222 muté au sein de la PcaM1 correspond aux résidus D232 de la PsyM et D241 de la PaeM, tous deux identifiés comme acteurs majeurs de la coordination du cation divalent (Ca²⁺ ou Mg²⁺) essentiel à l'activité de cette famille d'enzymes. Il a été montré que la mutation de ces résidus en alanine était responsable de la perte du cation au sein du site actif (Grinter *et al.*, 2012b ; **Résultats § I.4.2**). Dans le cas de la PcaM1 D222N, la mutation générée n'affecte pas la longueur de la chaîne latérale et permet de maintenir la présence d'un groupement carbonyle, qui pourrait alors être impliqué dans la coordination du cation. Une activité enzymatique résiduelle pourrait alors être à l'origine du phénotype lytique observé.

Dans la publication des résultats obtenus pour la PcaM1, il a été montré que l'expression périplasmique du mutant catalytique ponctuel D222A était à l'origine de la lyse de la bactérie productrice. Il a été montré précédemment au laboratoire que la ColM D226A était capable d'induire la lyse d'*E. coli* lorsqu'elle était envoyée directement dans le périplasma de la cellule cible par l'intermédiaire d'un choc osmotique. Bien qu'ayant été obtenus selon des protocoles différents, ces deux résultats sont en adéquation, puisque les protéines ColM D226A et PcaM1 D222A sont toutes les deux létales pour *E. coli*. Il serait maintenant intéressant de vérifier si la ColM D226A provoque toujours un phénomène lytique lorsqu'elle est envoyée dans le périplasma d'une bactérie cible par le biais d'une expression périplasmique. Inversement, la cytotoxicité de la PcaM1 D222A pourrait être testée selon le protocole mettant en œuvre un choc osmotique.

Au cours de ce travail, il a également été montré que l'expression périplasmique du mutant catalytique ponctuel PcaM1 D222N était à l'origine d'un phénomène lytique. Or, ce résultat va à l'encontre de ceux obtenus par Barnéoud-Arnoulet et ses collaborateurs, qui ont montré que la ColM

D226N n'était pas capable d'induire la lyse d'*E. coli* par le biais d'une expression périplasmique (Barnéoud-Arnoulet *et al.*, 2010). Cette différence de cytotoxicité entre les protéines PcaM1 D222N et ColM D226N pourrait être la conséquence d'une orientation différente de la chaîne latérale du résidu muté au sein des sites actifs respectifs des deux enzymes. Ainsi, la conformation de la chaîne latérale du résidu N226 de la ColM mutante empêcherait toute interaction avec le lipide II. A l'inverse, l'orientation de cette même chaîne latérale (N222) au sein de la PcaM1 n'affecterait pas cette interaction, ou seulement de façon modérée. Ce mutant ponctuel serait alors toujours capable de séquestrer le lipide II et donc d'inhiber la biosynthèse du peptidoglycane, conduisant *in fine* à la lyse bactérienne. Dans le cas des mutants catalytiques ponctuels ColM D226A et PcaM1 D222A, la chaîne latérale de l'alanine, beaucoup plus courte, ne provoquerait pas de gêne stérique au sein des sites actifs, permettant ainsi à ces deux protéines d'induire la lyse des cellules suite à leur interaction avec le lipide II.

Comme mentionné précédemment, les résidus D226 de la ColM et D222 de la PcaM1 correspondent aux résidus D241 de la PaeM et D232 de la PsyM, tous deux impliqués dans la coordination du cation divalent essentiel à l'activité dans ces deux protéines (Barreteau *et al.*, 2012b; Grinter *et al.*, 2012b). Le rôle supposé de ce cation est le positionnement correct du groupement pyrophosphate du lipide II dans le site actif, de façon à permettre une attaque nucléophile à l'origine de son clivage. Par conséquent, les mutations générées au sein des protéines ColM et PcaM1 conduisent probablement à la perte de ce cation, sauf éventuellement pour la mutation en asparagine, et seraient donc à l'origine d'une diminution relative (mais pas totale) de l'affinité de ces protéines pour le lipide II. En effet, bien que le résidu muté semble essentiel à l'ancrage du substrat, d'autres résidus sont probablement impliqués dans sa fixation, ce dernier étant relativement volumineux. Les mutants générés semblent donc encore en capacité d'interagir avec le substrat, même si cette interaction est de moindre affinité. La voie d'entrée classique de ces protéines (réception, translocation, activité) n'autorise *a priori* l'introduction que d'un nombre limité de molécules dans le périplasme de la bactérie cible. D'ailleurs, il a été montré au laboratoire que la ColM D226A était incapable d'induire la lyse d'*E. coli* lors d'un test d'antibiose classique, même à forte dose (jusqu'à 10 µg de ColM D226A déposé vs 0,4 ng de ColM sauvage pour observer une lyse) (Barreteau *et al.*, 2010). Lors de cette même étude, il a cependant été montré que ce mutant catalytique ponctuel était capable d'induire la lyse d'*E. coli* s'il était envoyé directement dans le périplasme par le biais d'un choc osmotique. Les techniques utilisées afin de contourner les étapes de réception et de translocation (choc osmotique ou expression périplasmique) permettent probablement d'envoyer au sein du périplasme de la cellule cible un nombre plus important de molécules. Ainsi, la diminution de l'affinité provoquée par les différentes mutations (Asp vs Asn ou Ala) serait compensée par la présence d'une quantité plus importante de protéines au sein du périplasme de la cellule cible. Ces mutants ponctuels seraient alors en mesure de séquestrer une grande partie des molécules de lipide II et d'induire la mort cellulaire par inhibition de la biosynthèse du peptidoglycane. Par conséquent, l'effet physiologique observé est probablement accentué par la mise en place de ces deux protocoles.

Afin de confirmer l'hypothèse émise selon laquelle les protéines PcaM1 D222A, PcaM1 D222N et ColM D226A seraient capables d'induire la lyse d'*E. coli* en interagissant avec le lipide II, sans le cliver, il faudrait réussir à mettre en évidence *in vitro* une interaction entre ces trois protéines et leur substrat.

4.2. Etude de la cytotoxicité des homologues de la ColM issus de *Pseudomonas* spp. vis-à-vis d'*E. coli* par le biais de l'expression périplasmique :

L'expression périplasmique de la PcaM1 ayant conduit à la lyse cellulaire d'*E. coli*, la méthodologie a été étendue aux homologues de la ColM disponibles au laboratoire, pour vérifier si elles étaient également capables d'induire une telle cytotoxicité sur *E. coli*. Pour rappel, dans nos conditions, la PaeM très concentrée était capable de développer une activité cytotoxique sur *E. coli* par la voie d'entrée classique, alors que les protéines PflM et PsyM n'ont pas montré cette capacité.

4.2.1. Construction des vecteurs d'expression périplasmique :

Les gènes codant pour les formes entières et/ou les domaines catalytiques isolés des protéines PaeM, PflM et PsyM ont donc été clonés dans le vecteur pASK.

Lors de la construction de ces plasmides, nous nous sommes heurtés à certaines difficultés puisque seules les versions codant la PflM entière et les domaines catalytiques de PflM et PsyM ont été obtenues sans mutation. La version entière de la PaeM n'a jamais été obtenue sous forme sauvage et nous avons choisi arbitrairement d'en étudier le mutant ponctuel F232S. Enfin, nous n'avons pas étudié de forme entière pour la PsyM, ni de forme tronquée pour la PaeM. Le fait que nous n'ayons pu obtenir certaines séquences sans mutation est très probablement dû à une fuite de l'expression des protéines qui, même basale, était létale pour la bactérie productrice. La PaeM F232S et le domaine catalytique isolé de la PsyM correspondent probablement à des formes protéiques moins actives que leurs versions entières sauvages non mutées dont l'expression à un bas niveau n'est pas létale pour la bactérie.

4.2.2. Etude de l'expression périplasmique des différents homologues issus de *Pseudomonas* spp. :

Une souche d'*E. coli* FB8 a été transformée par les différents plasmides ainsi construits et l'effet de l'expression périplasmique des protéines PaeM F232S, PflM, PflM Δ 1-115 et PsyM Δ 1-122 sur cette souche a été étudié (**Figure 98**). Pour cela, la production de ces différents homologues a été induite par ajout d'AHT dans le milieu. Une souche transformée par le pASK vide a été utilisée comme témoin négatif.

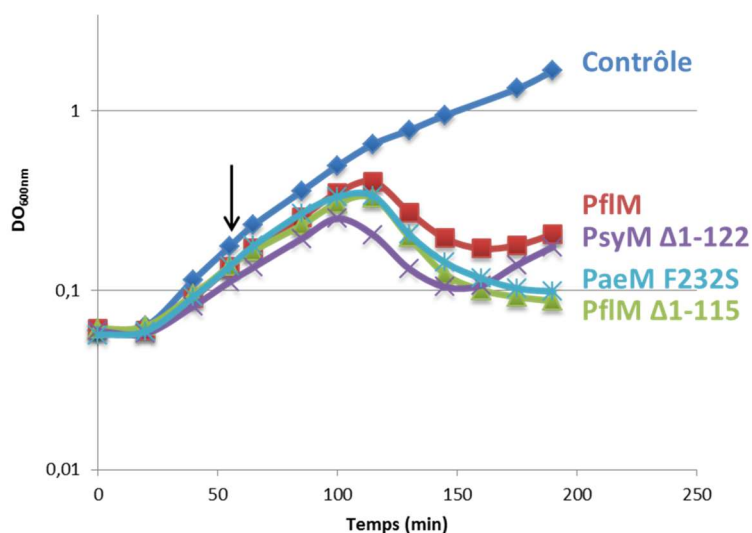


Figure 98 : Effet de l'expression périplasmique des homologues issus de *Pseudomonas* spp. sur la croissance d'*E. coli*. Les cellules d'*E. coli* FB8 ont été cultivées à 37°C dans du milieu 2YT-ampicilline et l'expression périplasmique des différents homologues de la ColM issus de *Pseudomonas* spp. a été induite par ajout d'AHT dans le milieu à 200 ng.mL⁻¹ (Flèche) lorsque la DO_{600nm} a atteint une valeur de 0,2. Pour chaque courbe, le nom de la protéine exprimée est indiqué.

Suite à l'induction, l'expression périplasmique de l'ensemble des formes protéiques testées a très rapidement conduit à une lyse bactérienne. Ces résultats ont permis de suggérer que l'effet observé était dû à l'activité enzymatique de chacune des protéines testées, puisqu'elles possédaient toutes un site actif fonctionnel. Afin de confirmer cette hypothèse, le contenu en pré-nols au sein des membranes des cellules traitées a été analysé.

4.2.3. Analyse du contenu en pré-nols des membranes des cellules traitées par les différents homologues issus de *Pseudomonas* spp. :

Le contenu en pré-nols a été analysé qualitativement selon le protocole décrit dans la partie Matériels et Méthodes (§ 10.3). Tous les homologues issus de *Pseudomonas*, y compris la protéine PaeM F232S, ont été responsables de l'apparition d'undécaprénol dans les membranes des cellules traitées (Figure 99). En effet, dans les quatre cas, un pic absent du chromatogramme témoin (pASK vide) est apparu au temps de rétention attendu pour l'undécaprénol dans les conditions testées. La présence de ce produit de dégradation du lipide II au sein des membranes des cellules traitées a ainsi permis de corréliser la lyse observée en culture liquide à la dégradation du lipide II et donc à un arrêt de synthèse du peptidoglycane.

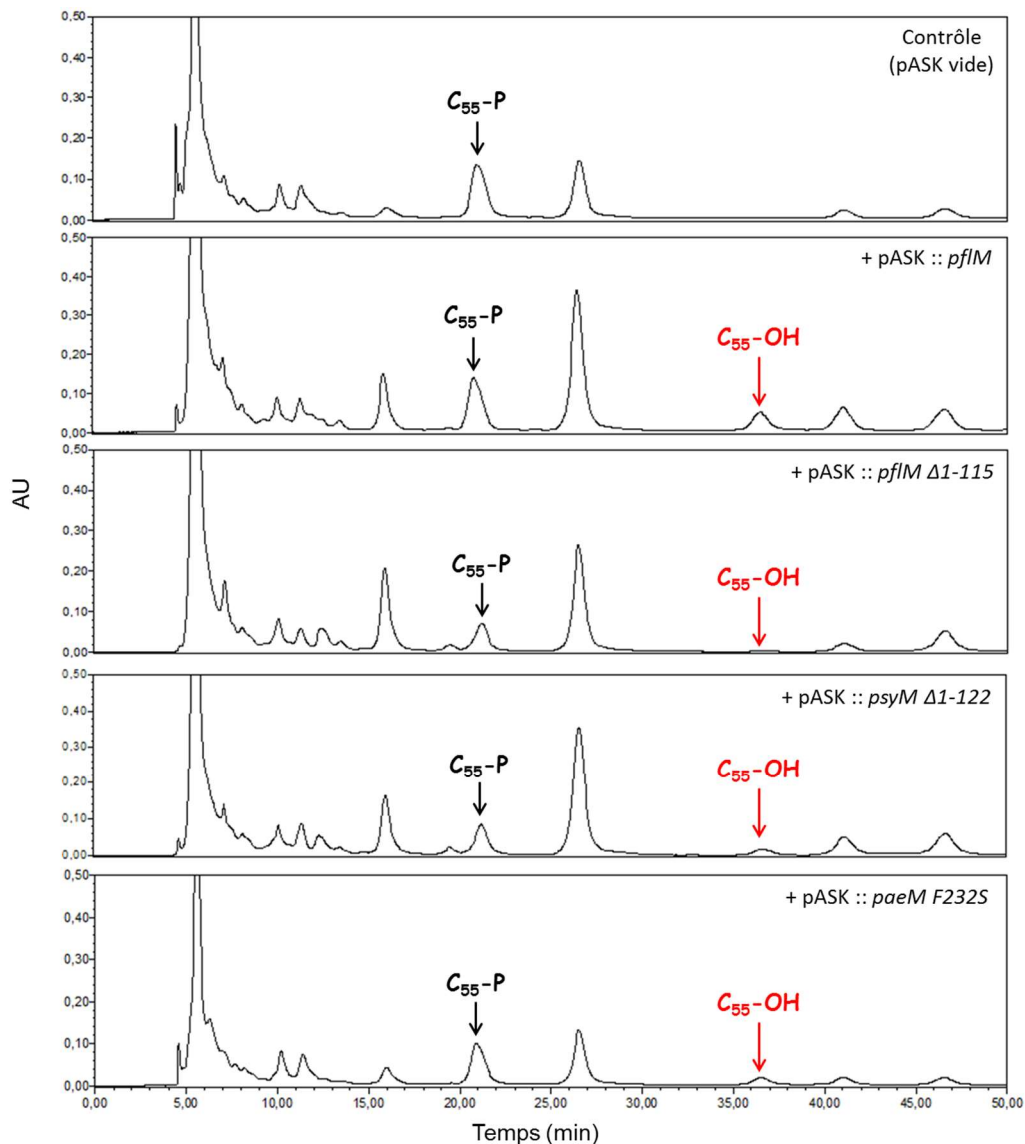


Figure 99 : Analyses par HPLC du contenu en prénoles des membranes des cellules d'*E. coli* traitées par les différents homologues issus de *Pseudomonas* spp.. Les extraits membranaires des cellules FB8 d'*E. coli* transformées par le vecteur pASK vide ou les plasmides pASK exprimant les protéines PfIM, PfIM Δ1-115, PsyM Δ1-122 ou PaeM F232S ont été obtenus selon la procédure de Bligh et Dyer. Les cellules ont été cultivées dans du milieu 2YT-ampicilline et l'induction de l'expression périplasmique a été effectuée par ajout, dans le milieu de culture, d'AHT à une concentration finale de 200 ng.mL⁻¹ lorsque la DO_{600nm} a atteint une valeur égale à 0,2. Les pics correspondant au C₅₅-P (Tr ≈ 21 min) et au C₅₅-OH (Tr ≈ 36 min) sont indiqués sur les chromatogrammes.

Sur l'ensemble de cette étude, nous avons démontré que différents variants des protéines PcaM1, PaeM, PfIM et PsyM étaient capables d'induire la lyse d'*E. coli* dès lors qu'elles avaient atteint le périplasme de leur cellule cible. Ces résultats mettent donc en avant le potentiel de ces enzymes qui semblent *a priori* capables d'éliminer n'importe quelle souche bactérienne dès lors qu'elles ont atteint leur cible, le lipide II. Les étapes de réception et de translocation, qui sont à l'origine du spectre d'action restreint de ces différentes protéines, constituent donc le problème majeur quant à leur utilisation en tant que nouveaux agents antimicrobiens.

Pour contourner en partie ce problème de spécificité d'espèce, nous avons décidé de construire des protéines chimères entre la ColM et certains de ses homologues.

IV. Création de colicines chimères ciblant spécifiquement *E. coli* :

Les différentes études menées jusqu'à présent ont permis de mettre en évidence que les différents homologues de la ColM pouvaient exercer leur activité cytotoxique sur une souche non ciblée naturellement, dès lors qu'ils avaient atteint son périplasma. Il a ainsi été montré au cours de ce travail que les protéines PcaM1, PaeM, PflM et PsyM étaient capables d'induire la lyse d'une souche d'*E. coli* suite à leur expression périplasmique. Ce phénomène lytique était la conséquence d'un arrêt de synthèse du peptidoglycane, provoqué par l'activité enzymatique de clivage du lipide II par les différents homologues étudiés. Par ailleurs, il est également apparu que la PaeM était capable d'induire la lyse d'*E. coli* en milieu solide. Cet effet lytique n'a cependant été observé qu'en présence d'une quantité importante de protéine purifiée.

Ces différentes données ont permis de montrer que les domaines catalytiques de ces différentes protéines étaient *a priori* capables d'éliminer n'importe quelle souche bactérienne. Les étapes limitantes pour observer une cytotoxicité croisée semblent donc être celles permettant à la protéine de traverser la membrane externe. Afin d'élargir le spectre d'action initial de ces enzymes, des bactériocines hybrides ont été créées, en fusionnant les domaines catalytiques issus des homologues PcaM1 et PaeM à la suite des domaines de réception et de translocation de la ColM.

1. Conception des colicines chimères :

Afin de valider la démarche visant à créer des bactériocines hybrides entre la ColM et certains de ses homologues, il a été décidé de créer, dans un premier temps, des colicines chimères ciblant spécifiquement *E. coli* pour avoir une preuve de concept.

Contrairement aux autres colicines, la ColM et ses homologues ne possèdent pas de domaines clairement séparés les uns des autres. Ces protéines présentent une structure très compacte, comme l'a démontré la résolution des structures tridimensionnelles des protéines ColM, PaeM et PsyM (Zeth *et al.*, 2008; Barreteau *et al.*, 2012b; Grinter *et al.*, 2012b). Au sein de cette famille d'enzymes, seule la PcaM2 possède une structure différente, moins compacte, puisque son domaine catalytique est séparé du domaine ferrédoxine, impliqué dans les étapes de réception et de translocation, par une hélice α (Grinter *et al.*, 2014). Pour créer des colicines chimères, il était donc difficile de se baser uniquement sur des données structurales pour délimiter la longueur des différents domaines à fusionner en aval des domaines de réception et de translocation de la ColM.

La conception de ces protéines hybrides s'est donc basée à la fois sur les données structurales disponibles, mais également sur des données biochimiques présentes dans la littérature. Ainsi, les études biochimiques et structurales menées sur la ColM ont permis de délimiter la longueur de ses différents domaines. Il a ainsi été montré que le domaine de translocation était composé des résidus 1 à 35, le domaine de réception des résidus 36 à 122 et le domaine catalytique des résidus 123 à 271 (Zeth *et al.*, 2008; Barreteau *et al.*, 2010). De même, des expériences de troncation menées sur la PaeM ont permis de montrer que des domaines catalytiques isolés de différentes longueurs (résidus 127 à 289 ou 134 à 289) possédaient toujours une activité de dégradation du lipide II *in vitro*. De plus, ces

deux variants étaient capables d'induire la mort d'une souche d'*E. coli* lorsqu'ils étaient envoyés directement dans le périplasme par le biais d'un choc osmotique (Barreteau *et al.*, 2012b). La résolution de la structure de la PcaM2 a, quant à elle, permis de délimiter les différents domaines qui la composent. Il a ainsi été montré que le domaine ferrédoxine était composé des résidus 1 à 94, l'hélice α centrale des résidus 95 à 115 et le domaine catalytique des résidus 116 à 271 (Grinter *et al.*, 2014).

Le choix de la longueur des différents domaines à fusionner a donc été effectué en tenant compte des informations mentionnées ci-dessus. Ainsi, pour l'ensemble des chimères, les domaines de réception et de translocation ont été composés des résidus 1 à 120 de la ColM, dont la longueur a été inchangée. En revanche, la longueur des domaines catalytiques fusionnés en C-terminal a été modulée, de façon à déterminer si la longueur de ce domaine pouvait influencer à la fois l'activité enzymatique mais également le repliement tridimensionnel des colicines chimères.

Les études de troncation de la PaeM menées au laboratoire en 2012 ont permis d'identifier deux formes protéiques, constituées des résidus 127 à 289 ou 134 à 289, capables d'exercer une activité cytotoxique vis-à-vis d'*E. coli* dès lors qu'elles avaient atteint le périplasme (Barreteau *et al.*, 2012b). Ces deux formes du domaine catalytique de la PaeM ont donc été fusionnées à la suite des domaines de réception et de translocation de la ColM. En plus de ces deux formes protéiques, un domaine catalytique composé des résidus 124 à 289, possédant trois résidus supplémentaires par rapport au domaine composé des résidus 127 à 289, a également été fusionné, dans l'optique de déterminer si la longueur du domaine catalytique pouvait influencer l'activité et le repliement de ces colicines chimères. En effet, ces trois résidus supplémentaires sont localisés dans une boucle dont la flexibilité pourrait avoir une importance particulière dans le repliement tridimensionnel. Ces constructions ont conduit à l'obtention des chimères CCA1 (*Chimère Coli-Aeruginosa 1*), CCA2 et CCA3 (**Figure 100, A**).

Les PcaM1 et PcaM2 partageant 58 % d'identité de séquence et possédant donc très probablement une structure tridimensionnelle identique, un alignement de séquence entre ces deux protéines a été réalisé afin de délimiter, au sein de la séquence de la PcaM1, les résidus encadrant l'hélice α centrale. Ainsi, le domaine catalytique seul, composé des résidus 114 à 268, ou le domaine catalytique précédé de l'hélice α centrale, composé des résidus 93 à 268, ont été fusionnés aux domaines de réception et de translocation de la ColM, aboutissant respectivement à la construction des chimères CCC1 (*Chimère Coli-Carotovorum 1*) et CCC2 (**Figure 100, B**).

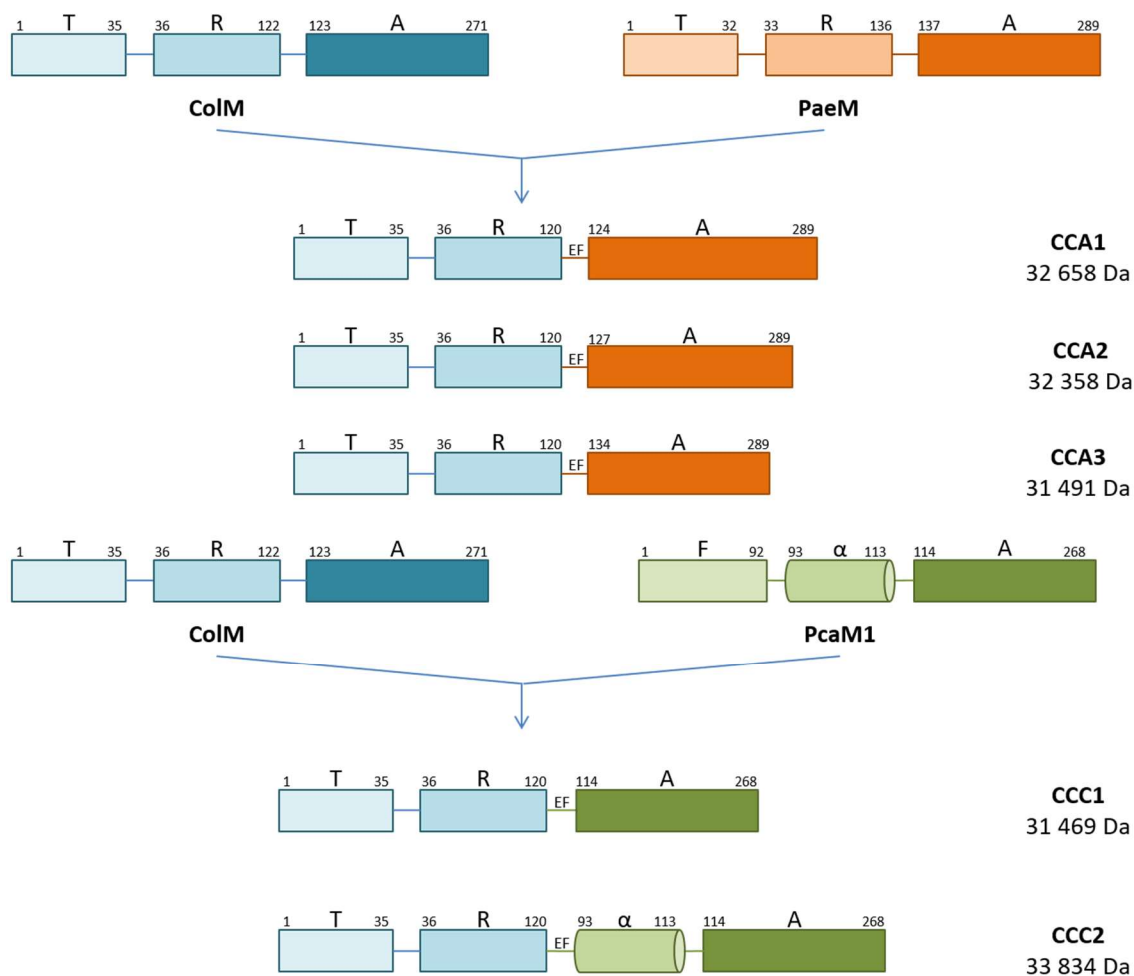


Figure 100 : Représentation schématique des différentes colicines chimères construites. Les résidus délimitant les domaines de translocation (T), de réception (R), d'activité (A) ou le linker en hélice α (α) sont indiqués. La fusion entre la ColM et la Paem a conduit à l'obtention des chimères de type CCA (*Chimère Coli-Aeruginosa*) (en haut), celle entre la ColM et la PcaM1 à l'obtention des chimères de type CCC (*Chimère Coli-Carotovorum*) (en bas). Le poids moléculaire de chaque chimère est indiqué.

2. Construction des vecteurs permettant l'expression des colicines chimères :

L'ensemble des constructions a été réalisé au sein d'un plasmide de type pET2130, inducible à l'IPTG, permettant la fusion d'une étiquette histidine (extension Met-His₆-Gly-Ser) en N-terminal de la protéine exprimée. La construction des différentes colicines chimères a été effectuée en deux étapes selon le protocole décrit dans la partie Matériels et Méthodes. Dans un premier temps, la séquence codant pour les résidus 1 à 120 de la ColM a été clonée entre les sites de restriction BamHI et EcoRI. La présence du site EcoRI en 3' a introduit la substitution des résidus Gln¹²¹ et Met¹²², naturellement retrouvés dans la séquence du domaine de réception de la ColM, par les résidus Glu¹²¹ et Phe¹²². Le plasmide obtenu, où ¹²¹EF¹²² remplacent ¹²¹QM¹²², a été nommé pMLD283.

Les séquences codant pour les différentes longueurs choisies des domaines catalytiques des protéines Paem et PcaM1 ont ensuite été insérées dans le plasmide pMLD283, en aval de la séquence codant pour les domaines de réception et de translocation de la ColM, entre les sites de restriction EcoRI et HindIII. L'introduction des séquences codant pour les domaines catalytiques constitués des

résidus 124 à 289, 127 à 289 ou 134 à 289 de la PaeM et des résidus 93 à 268 ou 114 à 268 de la PcaM1 a permis d'obtenir les plasmides pET2130 *cca1*, pET2130 *cca2*, pET2130 *cca3*, pET2130 *ccc2* et pET2130 *ccc1*, permettant respectivement l'expression des colicines chimères CCA1, CCA2, CCA3, CCC2 et CCC1. Afin de vérifier que la double mutation $^{121}\text{QM}^{122}::^{121}\text{EF}^{122}$ n'était pas à l'origine d'un défaut de la fonction du domaine de réception de la ColM, la séquence codant pour les résidus 123 à 271 de la ColM a également été clonée au sein du pMLD283. Cela a permis d'obtenir le plasmide pMLD284, permettant l'expression de la ColM $^{121}\text{QM}^{122}::^{121}\text{EF}^{122}$. Il est intéressant de noter que cette double mutation par substitution, générée suite à l'introduction du site EcoRI, a conduit à l'insertion des résidus $^{121}\text{EF}^{122}$ qui sont naturellement retrouvés au sein de la séquence de la PflM à la position équivalente des résidus $^{121}\text{QM}^{122}$ de la ColM (**Figure 51**). Par conséquent, aucune altération de l'activité de la ColM n'était attendue suite à la substitution de ces deux acides aminés.

3. Détermination des conditions d'expression et purification des colicines chimères :

Par la suite, les meilleures conditions de production de chacune des protéines chimères ont été déterminées. Étant donné que ces dernières constituaient des protéines artificielles, il était possible qu'elles ne soient produites que très faiblement sous forme soluble. Par conséquent, différents paramètres ont été modulés pour maximiser le rendement de production : différentes souches bactériennes, températures et durées d'expression, et concentrations en inducteur ont été testées.

Ainsi, différentes souches de *E. coli* (C43(DE3), C43(DE3)(pREP4groESL), Rosetta(DE3)(pREP4groESL)(plysS)) ont été transformées avec les plasmides permettant la production des protéines chimères. La présence, au sein d'une souche d'expression, du plasmide pREP4groESL permet la co-expression des protéines chaperonnes GroES (≈ 10 kDa) et GroEL (≈ 60 kDa), qui améliorent le repliement et augmentent de ce fait la solubilité de la protéine d'intérêt (Amrein *et al.*, 1995). Le plasmide *plysS* permet, quant à lui, l'expression du lysozyme du phage T7, un inhibiteur naturel de l'ARN polymérase du phage T7, évitant ainsi toute expression basale de la protéine en absence d'inducteur (Studier, 1991).

Pour chaque construction, différentes températures (37°C, 22°C ou 15°C) et durées (3 h ou sur la nuit) d'expression ont également été investiguées. La modulation à la baisse de la température, lors de la surproduction d'une protéine, peut en effet favoriser son repliement dans une conformation correcte et ainsi améliorer sa solubilité. Mais dans ce cas, une plus longue durée de surproduction peut s'avérer nécessaire, afin d'obtenir une quantité suffisante de protéine d'intérêt.

Enfin, différentes concentrations en IPTG (0,2, 0,5 ou 1 mM) ont également été expérimentées, puisqu'une concentration plus faible en inducteur permet une moindre stimulation de la production et favorise ainsi l'expression de la protéine d'intérêt sous forme soluble.

A l'issue des nombreux essais effectués en tenant compte des différents paramètres mentionnés ci-dessus, les meilleures conditions d'expression ont été déterminées pour chaque protéine chimère, par l'analyse des profils électrophorétiques obtenus après purification par chromatographie d'affinité : ainsi, les conditions pour lesquelles l'intensité de la bande correspondant à la protéine d'intérêt était la plus intense dans la fraction d'élution ont été retenues et sont présentées dans le **tableau 16**.

Tableau 16 : Conditions d'expression optimales des cinq colicines chimères et de la ColM ¹²¹QM¹²² :: ¹²¹EF¹²².

Protéine	Souche d' <i>E. coli</i>	Température de surproduction	Durée de la surproduction	Concentration en IPTG
ColM ¹²¹ QM ¹²² :: ¹²¹ EF ¹²²	C43(DE3)	37°C	3 h	1 mM
CCA1	Rosetta(DE3) (pREP4groESL)(plysS)	22°C	O/N	0,2 mM
CCA2	Rosetta(DE3) (pREP4groESL)(plysS)	22°C	O/N	0,2 mM
CCA3	C43(DE3)	22°C	O/N	0,2 mM
CCC1	Rosetta(DE3) (pREP4groESL)(plysS)	22°C	O/N	0,2 mM
CCC2	Rosetta(DE3) (pREP4groESL)(plysS)	22°C	O/N	0,2 mM

Il est apparu que les conditions d'expression pour la ColM ¹²¹QM¹²² :: ¹²¹EF¹²² étaient identiques à celles décrites dans la littérature pour la ColM (Barreteau *et al.*, 2010).

Des conditions d'expression communes ont été identifiées pour les protéines CCA1, CCA2, CCC1 et CCC2, qui ont nécessité la présence des chaperonnes GroEL et GroES, ainsi que celle du lysozyme T7. En revanche, l'obtention de la CCA3 sous forme soluble n'a pas nécessité leur co-expression. Ces protéines artificielles requièrent donc une combinaison importante de paramètres pour pouvoir être produites sous une forme soluble. Dans la plupart des cas, leur production a nécessité un contrôle fin de l'expression, puisque la co-expression du lysozyme T7 et une faible concentration en IPTG sont requis lors de la surproduction. De plus, une surproduction à basse température (22°C) a été absolument primordiale pour maximiser le rendement en protéine soluble. Les profils de purification des protéines CCA1, CCA3 et ColM ¹²¹QM¹²² :: ¹²¹EF¹²², représentatifs des trois conditions les plus favorables, et obtenus après surproduction et purification par chromatographie d'affinité sur Ni-NTA²⁺, sont présentés dans la **figure 101**.

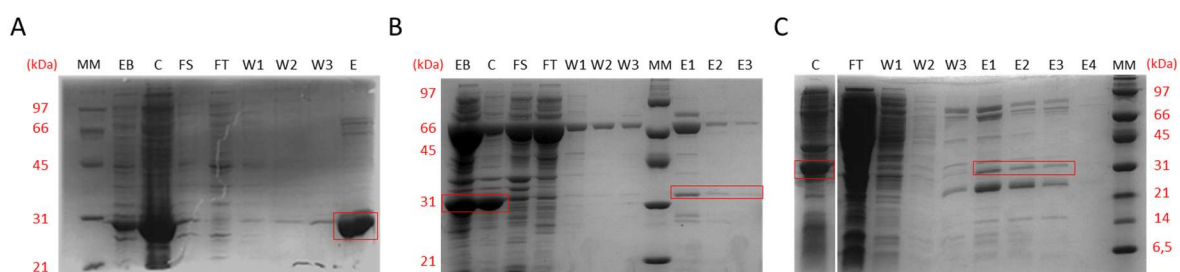


Figure 101 : Profil de purification des chimères CCA1, CCA3 et de la ColM ¹²¹QM¹²² :: ¹²¹EF¹²². Les protéines ColM ¹²¹QM¹²² :: ¹²¹EF¹²² (A), CCA1 (B) et CCA3 (C) ont été surproduites selon les conditions décrites dans le **tableau 16** et purifiées par chromatographie d'affinité sur résine Ni²⁺-NTA-agarose. Pour chaque profil de purification, la protéine d'intérêt est encadrée en rouge. EB : Extrait Brut ; C : Culot ; FS : Fraction Soluble ; FT : Fraction non retenue ; W1,W2 : Fractions de lavage à 20 mM

d'imidazole ; W3 : Fraction de lavage à 40 mM d'imidazole ; E, E1, E2, E3 : Fractions d'élution à 200 mM d'imidazole. MM : Marqueurs de poids moléculaire. Les masses des marqueurs sont indiquées en rouge.

L'analyse par SDS-PAGE des différentes fractions issues des purifications par chromatographie d'affinité a montré que la protéine ColM^{121QM¹²²::121EF¹²²} a été produite en grande majorité sous une forme soluble, comme c'est le cas pour la ColM sauvage (**Figure 101, A**) (Barreteau *et al.*, 2010). Suite à sa purification, l'activité cytotoxique de la ColM^{121QM¹²²::121EF¹²²} a été évaluée vis-à-vis d'une souche d'*E. coli* BW25113. Après une nuit d'incubation à 37°C, une plage de lyse a été observée suite au dépôt du double mutant, confirmant ainsi que la double substitution n'était pas responsable d'un défaut de fonction du domaine de réception (**Figure 102**). Ce résultat a permis de démontrer que la double substitution ne pouvait pas être à l'origine d'un défaut d'activité éventuel de la part des différentes chimères construites.

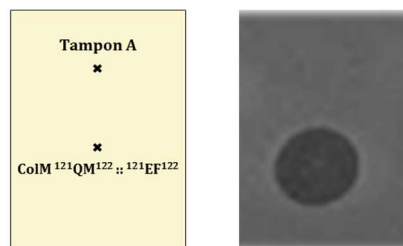


Figure 102 : Cytotoxicité de la ColM^{121QM¹²²::121EF¹²²} vis-à-vis d'une souche d'*E. coli* BW25113.

Toutes les chimères ont bien été obtenues, et en grande quantité, mais majoritairement sous la forme de corps d'inclusion, malgré l'optimisation des nombreux paramètres de production (**Figure 101, B et C**). Une bande intense correspondant à la protéine d'intérêt est en effet retrouvée dans la fraction insoluble, dans tous les cas. Les nombreuses conditions de production testées n'ont donc permis d'améliorer que très modérément la solubilité des colicines chimères ; les conditions listées dans le **tableau 16** sont pourtant celles ayant permis d'en obtenir la plus grande quantité à l'issue de la purification.

L'analyse SDS-PAGE a révélé également que les fractions d'élutions contenaient une quantité importante de contaminants. Afin de les éliminer, des essais de purification par chromatographie échangeuse d'ions ont été menés sur des fractions d'élution dialysées. Ces essais n'ont été entrepris que sur la CCA1, afin de vérifier si cette approche était valable ou non. Il est apparu que la colicine chimère ne s'accrochait pas sur la colonne lorsqu'elle était solubilisée en tampon A (pH 7,4). Son point isoélectrique (pI) étant de 8,4, les mêmes essais ont été réalisés en tampon B (pH 6,2), de façon à augmenter sa charge négative globale et de favoriser son interaction avec la colonne. Ces nouvelles conditions ont permis l'élution de CCA1 en présence des plus fortes concentrations en NaCl (300 et 400 mM). Cependant, cette étape a contribué à diluer fortement la protéine chimère et les tentatives subséquentes de concentration par ultrafiltration sur membrane ont échouées. En effet, une perte totale de la protéine d'intérêt a été constatée à l'issue de cette étape, probablement suite à l'adsorption de la protéine CCA1 sur la membrane lors de la concentration (données du SDS-PAGE non présentées). Un contaminant de haut poids moléculaire, probablement la chaperonne GroEL, était de plus toujours présent à l'issue de cette étape de purification. En conséquence, la quantité de protéines solubles étant trop faible et la proportion de contaminants trop importante, aucune suite n'a été donnée à l'étude des colicines chimères provenant de la fraction soluble.

En 2012, K. Jakes a construit des colicines hybrides au sein desquelles le domaine de réception de la ColM avait été remplacé par celui de la ColE3 (Jakes, 2012). Malgré différents points de fusions testés entre ces deux colicines, toutes les chimères construites avaient été produites sous la forme de corps d'inclusion.

De la même manière, les chimères conçues lors de ce travail ont toutes été obtenues sous la forme de corps d'inclusion, alors que les protéines naturelles (ColM, PaeM et PcaM1) dont elles sont initialement issues, sont facilement produites sous forme soluble (Barreteau *et al.*, 2010, 2012b ; Chérier *et al.*, 2016). Comme mentionné précédemment, la ColM présente une structure compacte au sein de laquelle les trois domaines sont en interaction. Il est probable que la substitution de l'un de ces domaines par celui provenant d'une autre protéine engendre des perturbations au niveau de ces interactions, qui se traduisent par une diminution drastique de la solubilité de la protéine créée et par sa production sous forme de corps d'inclusion. Afin de pouvoir étudier les chimères qu'elle avait conçues, K. Jakes les avait purifiées à partir des corps d'inclusion. Cette méthode lui avait permis d'en obtenir une certaine quantité sous forme soluble (Jakes, 2012). La même stratégie a- donc été adoptée pour les protéines CCA1, CCA2, CCA3, CCC1 et CCC2.

4. Purification des colicines chimères à partir des corps d'inclusion :

Les corps d'inclusion sont des agrégats de protéine non ordonnés. Ils sont formés lorsqu'une chaîne polypeptidique naissante adopte une conformation partiellement repliée et généralement instable. Ces structures sont facilement isolables du reste du contenu cellulaire par une simple étape de centrifugation, une fois les cellules lysées. Elles sont en effet relativement denses et ont l'avantage de contenir la protéine d'intérêt à un haut niveau de pureté.

Il est possible de solubiliser et purifier les protéines qui constituent cette entité par un protocole de dénaturation/renaturation. La solubilisation des corps d'inclusion nécessite la dénaturation chimique (mais réversible) complète de la protéine agrégée par des agents dénaturants forts, tels que l'urée 8 M ou le chlorure de guanidinium 6 M. C'est lors de l'élimination de cet agent dénaturant, par dialyse ou par dilution, que va s'opérer la renaturation de la protéine. Pour favoriser la renaturation, différents additifs comme des détergents, des amides, du glycérol ou bien de l'arginine, dont le rôle est de limiter les interactions intermoléculaires pouvant provoquer la précipitation de la protéine, peuvent être ajoutés au cours de cette étape (De Bernardes Clark *et al.*, 1999). Lorsque la protéine possède une étiquette polyhistidine, il est également possible d'effectuer la renaturation sur colonne une fois la protéine fixée sur la résine de Ni²⁺-NTA-agarose (Middelberg, 2002).

Deux protocoles distincts, renaturation par dialyse ou par dilution, ont donc été expérimentés au cours de ce travail afin de déterminer lequel permettait d'obtenir le plus de protéine sous forme soluble. L'urée 8M a été utilisée comme agent chaotropique pour la solubilisation des corps d'inclusion et la dénaturation chimique complète de toutes les chimères.

Un premier essai de renaturation de la protéine CCA1 a été effectué par dialyse, selon le protocole décrit dans la partie Matériels et Méthodes. La renaturation a été effectuée par deux étapes de dialyse successives, la première contre du tampon A contenant de l'urée 4 M et la seconde contre du tampon A sans urée. La renaturation par dialyses successives permet de diminuer par étape la concentration de l'agent chaotropique, ce qui peut améliorer la renaturation de la protéine d'intérêt (Yamaguchi *et al.*, 2013). Malheureusement, à l'issue de la deuxième étape de dialyse, la CCA1 a

complètement précipitée et cette technique n'a donc pas permis d'obtenir la chimère sous une forme soluble.

Des essais de renaturation par dilution ont donc été entrepris. La renaturation des protéines produites sous forme de corps d'inclusion présente un caractère aléatoire et empirique, et les conditions de renaturation peuvent différer d'une protéine à l'autre. Différents temps d'incubation (30 min, 4 h, sur la nuit), différentes températures (4°C, température ambiante) ainsi que différents tampons ont été expérimentés. L'ajout de L-arginine ou de glycérol, additifs stabilisateurs, lors de la renaturation a également été exploré. Malgré un nombre important de conditions testées, aucune n'a réellement permis d'améliorer de manière significative la quantité de protéine obtenue sous forme soluble.

Parmi les nombreuses conditions de renaturation explorées, celles permettant d'obtenir le meilleur rendement final ont été déterminées. Ainsi, les chimères de type CCA ont été renaturées suite à leur dilution (cinquante fois) dans du tampon B supplémenté par 10 % de glycérol. Les chimères de type CCC ont, quant à elles, été diluées dans du tampon A également supplémenté par 10 % de glycérol. Pour les deux types de chimères, l'étape de renaturation a été effectuée sur une durée de 30 min à 4°C sous agitation rotative douce.

A l'issue de l'étape de renaturation, bien que la quantité de protéine correctement renaturée n'était pas connue, une purification par chromatographie d'affinité sur Ni²⁺-NTA-agarose a été entreprise pour la récupérer et l'utiliser pour effectuer des tests biochimiques. Le profil de purification de la CCA1, représentatif des profils obtenus pour les chimères de type CCA, et celui de CCC2, représentatif de ceux obtenus pour les chimères de type CCC, sont présentés dans la **figure 103**.

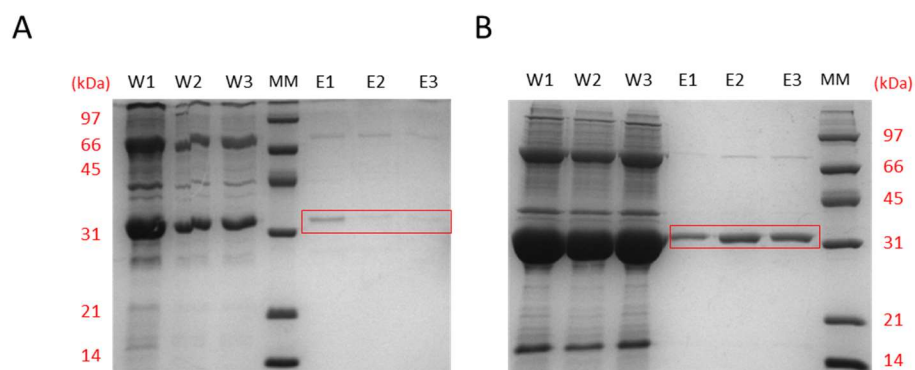


Figure 103 : Profils de purification des chimères CCA1 et CCC2 renaturées à partir des corps d'inclusion. Les chimères CCA1 (A) et CCC2 (B) ont été renaturées selon le protocole de renaturation par dilution puis purifiées par chromatographie d'affinité sur Ni²⁺-NTA-agarose. W1,W2 : Fractions de lavages à 20 mM d'imidazole ; W3 : Fraction de lavage à 40 mM d'imidazole ; E1-E3 : Fractions d'éluat à 200 mM d'imidazole. Les protéines d'intérêt sont encadrées en rouge.

L'analyse par SDS-PAGE des différentes fractions provenant de la purification par chromatographie d'affinité a révélé que la renaturation par dilution était un procédé fonctionnel, car des bandes intenses correspondant aux protéines d'intérêt étaient visibles sur les gels (W1, notamment) dans tous les cas. Cependant, il est apparu que la majeure partie de la protéine renaturée avait précipité au cours de la purification (**Figure 103, A et B, pistes W1, W2 et W3**). Pourtant, une quantité raisonnable de chaque protéine chimère a été obtenue par cette méthode sous forme renaturée et soluble. Malgré une forte précipitation des chimères renaturées lors des étapes de lavage, elles ont toutes pu être purifiées (**Figure 104**).

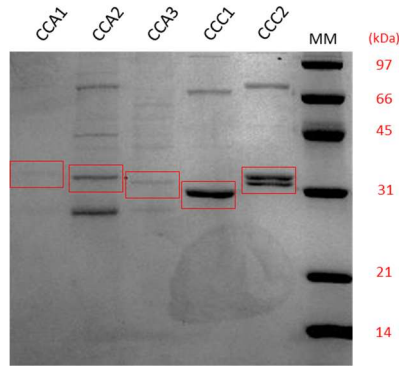


Figure 104 : Profils électrophorétiques des différentes chimères renaturées et purifiées.

Il est important de noter que la quantité de protéine obtenue à l'issue de la renaturation fut variable d'une expérience à l'autre alors que le protocole utilisé était inchangé.

Les quantités de protéines obtenues étant relativement faibles, des tentatives de concentrations par ultrafiltration sur membrane de seuil de coupure de 10 kDa ont été menées, mais sans succès. En effet, ces étapes ont dans la plupart des cas conduit à la perte des protéines d'intérêt, probablement suite à leur agrégation au contact de la membrane.

5. Evaluation de l'activité *in vitro* et *in vivo* des colicines chimères :

En dépit des relativement faibles quantités de protéines chimères obtenues sous forme soluble après renaturation, leur évaluation biochimique *in vitro* et *in vivo* a tout de même pu être réalisée. Dans un premier temps, l'activité enzymatique des différentes chimères renaturées et non concentrées a été évaluée, grâce au test classique de dégradation *in vitro* du lipide II. Les chromatogrammes obtenus à l'issue de ces essais sont présentés dans la **figure 105**.

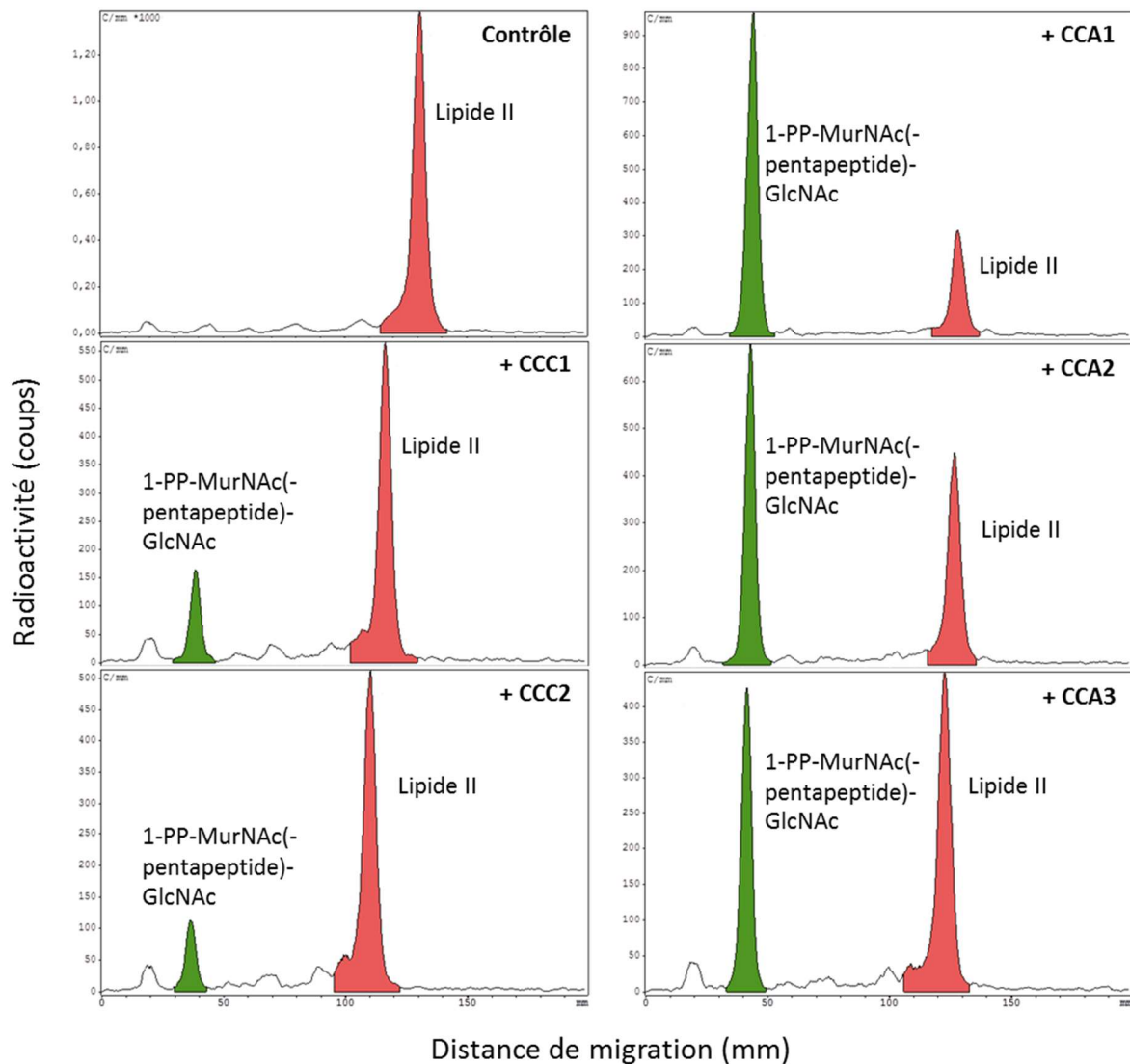


Figure 105 : Dégradation du lipide II *in vitro* par les colicines chimères. Du lipide II classique purifié (250 Bq) a été incubé en absence (contrôle) ou en présence des protéines CCA1, CCA2, CCA3, CCC1 et CCC2. Les substrat et produit de réaction ont été séparés par chromatographie sur couche mince. Le pic rouge correspond au substrat lipide II et le pic vert à son produit de dégradation soluble. Le mélange réactionnel à l'issue de la réaction a été déposé à 2 cm du bord inférieur de la plaque.

Il est apparu que les cinq chimères ont été capables de cliver le lipide II, puisqu'un pic radioactif migrant au R_f du produit de dégradation soluble apparaît sur chaque profil. Ces résultats ont permis de montrer que les domaines catalytiques des différentes chimères se sont repliés dans une conformation active, étant donné qu'elles possèdent toutes une activité enzymatique. En revanche, aucune valeur d'activité spécifique n'a pu être calculée, car la concentration des protéines renaturées, trop faible, n'a pu être évaluée ni au nanodrop, ni par analyse en acides aminés. Il n'a donc pas été possible de comparer l'activité spécifique de ces chimères entre elles, ni à celles des protéines PaeM et PcaM1.

Par la suite, la cytotoxicité des différentes colicines chimères vis-à-vis d'une souche d'*E. coli* BW25113 a été évaluée. Pour chaque chimère renaturée, un volume de 10 μ L d'une solution non diluée a été déposé sur un tapis cellulaire. A l'issue d'une incubation sur la nuit à 37°C, il n'a été observé aucune plage de lyse, donc aucune activité cytotoxique vis-à-vis d'*E. coli*.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'innocuité des différentes chimères construites vis-à-vis d'*E. coli* :

- La quantité de protéine déposée sur le tapis cellulaire était trop faible pour induire la lyse d'*E. coli*. Etant donné qu'aucune concentration protéique n'a pu être déterminée, la quantité de protéine déposée était inconnue.
- Les chimères construites ne se sont pas liées au récepteur FhuA, bien qu'elles possèdent en théorie tous les déterminants nécessaires aux étapes de réception et de translocation. La substitution du domaine catalytique de la ColM, par celui issu des protéines PaeM ou PcaM1, a peut-être altéré la structure tridimensionnelle globale de la chimère qui ne possède alors plus un domaine de réception fonctionnel.
- Les chimères se sont liées au récepteur FhuA mais n'ont pas traversé la membrane externe. Il est possible qu'après leur liaison, et bien que possédant une *TonB box* active, elles n'aient pas pu traverser la membrane. La conformation globale des chimères serait alors à l'origine du défaut de l'import des colicines chimères
- Elles ont pénétré au sein de la cellule cible mais n'étaient plus actives une fois dans le périplasma. Il est supposé que la translocation de la ColM à travers la membrane externe nécessite un dépliement partiel ou total de la protéine. Il est donc envisageable que le même phénomène soit requis pour de telles colicines chimères. Ainsi, le passage à travers FhuA aurait provoqué la dénaturation partielle des chimères qui ne se seraient alors pas repliées dans une conformation active au sein du périplasma. La ColM nécessite une étape de maturation par la protéine FkpA après avoir traversé la membrane. Il est possible que les différentes chimères aient également besoin d'une étape similaire après leur transport. Cependant, leurs séquences étant différentes par rapport à celle de la ColM, elles ne seraient pas reconnues par FkpA.

A cette étape du travail, il est apparu que seule l'expression périplasmique des différentes colicines pouvait apporter des informations supplémentaires sur leur éventuel pouvoir cytotoxique.

6. Evaluation de la cytotoxicité des colicines chimères vis-à-vis d'*E. coli* par le biais d'une expression périplasmique :

6.1. Construction des vecteurs d'expression périplasmique :

Les gènes codant pour chacune des colicines chimères ont été introduits au sein du plasmide pASK-IBA4 qui permet la fusion de la séquence OmpA en N-terminal de la protéine d'intérêt, responsable de l'adressage périplasmique des protéines néo-synthétisées. La construction des différents plasmides a été effectuée selon le protocole décrit dans la partie Matériels et Méthodes. Les plasmides pASK *cca1 F244S*, pASK *cca2 Y239H*, pASK *cca3 L141P*, pASK *ccc1* et pASK *ccc2* permettant l'expression respective des protéines CCA1 F244S, CCA2 Y239H, CCA3 L141P, CCC1 et CCC2 ont ainsi été obtenus.

Comme lors du clonage de certains homologues de la ColM dans ce vecteur, il n'a pas été possible d'obtenir de séquence nucléotidique sans mutation pour les colicines chimères de type CCA, c'est-à-dire possédant le domaine catalytique de la PaeM. Pour rappel, le mutant ponctuel PaeM F232S avait été obtenu lors du clonage du gène de la PaeM au sein du pASK-IBA4. De la même façon, pour chacune des CCA, seules des séquences contenant une ou plusieurs mutations dans le domaine catalytique ont pu être obtenues. Nous avons choisi arbitrairement les séquences codant pour les protéines CCA1 F244S, CCA2 Y239H et CCA3 L141P. Le fait qu'aucune séquence sans mutation n'ait pu être obtenue pour les chimères de type CCA est probablement dû au fait que leur expression à niveau basal, en absence d'induction, était létale pour la bactérie. Ainsi, les mutations sélectionnées ont certainement abouti à la production de protéines moins actives ou moins solubles, dont l'expression basale n'était plus létale.

Le résidu F244 de la chimère CCA1 correspond au résidu F245 de la PaeM. Ce dernier a été localisé au sein d'une boucle reliant le brin $\beta 6$ à l'hélice $\alpha 9$ au sein de sa structure tridimensionnelle (Barreteau *et al.*, 2012b). Cette boucle présente une orientation différente de celle retrouvée au sein de la structure de la ColM, et il a été suggéré cette orientation particulière puisse être en partie à l'origine de la différence d'activité *in vitro* entre les protéines PaeM et ColM. La mutation de ce résidu au sein de la CCA1 pourrait donc être à l'origine d'un changement de l'orientation de cette boucle responsable d'une diminution de son activité enzymatique.

Le résidu Y239 de la CCA2 correspond au résidu Y243 de la PaeM qui a été identifié comme essentiel à son activité (Barreteau *et al.*, 2012b). Sa mutation en alanine était d'ailleurs responsable d'une chute drastique de l'activité enzymatique qui ne représentait alors plus que 1,5 % de celle mesurée pour la protéine sauvage. Sa mutation en histidine au sein de la CCA2 pourrait être responsable d'une diminution, voire d'une abolition complète, de son activité.

Enfin, le résidu L141 de la CCA3 correspond au résidu L152 de la PaeM, localisé à l'extrémité de l'hélice $\alpha 6$. Sa mutation en proline au sein de la CCA3 pourrait avoir provoqué un changement de conformation, responsable soit d'une diminution d'activité, soit d'une diminution de sa solubilité. L'ensemble des mutants ponctuels identifiés présentent *a priori* une diminution de leur activité intrinsèque ayant permis leur sélection lors des étapes de clonage.

En revanche, les pASK *ccc1* et pASK *ccc2* ont été obtenus tous les deux sans mutation. La sélection de séquences mutées semble donc reliée à l'activité intrinsèque des protéines puisque la

PaeM présente une activité enzymatique égale à $13 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, nettement supérieure à celle de la PcaM1 qui est de $0,53 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Par conséquent, l'expression périplasmique à un niveau basal de la PcaM1, ainsi que celle des chimères de type CCC dont le domaine catalytique est issu de PcaM1, n'est pas létale pour la bactérie du fait de leur faible activité enzymatique. En revanche, la PaeM et les CCA possèdent un domaine catalytique intrinsèquement beaucoup plus actif dont l'expression à un niveau basal est létale pour *E. coli*, ce qui conduit à la sélection de mutations.

6.2. Expression périplasmique des colicines chimères :

Suite à la construction des différents vecteurs, ceux-ci ont été introduits par le procédé de transformation dans la souche d'*E. coli* BW25113, et l'effet de l'expression périplasmique des chimères correspondantes sur cette souche bactérienne a été étudié (**Figure 106**). L'expression protéique a été induite par ajout d'AHT dans le milieu et la croissance bactérienne a été suivie par mesure de l'absorbance à 600 nm. Une souche transformée par le vecteur vide et induite dans les mêmes conditions a été utilisée comme contrôle.

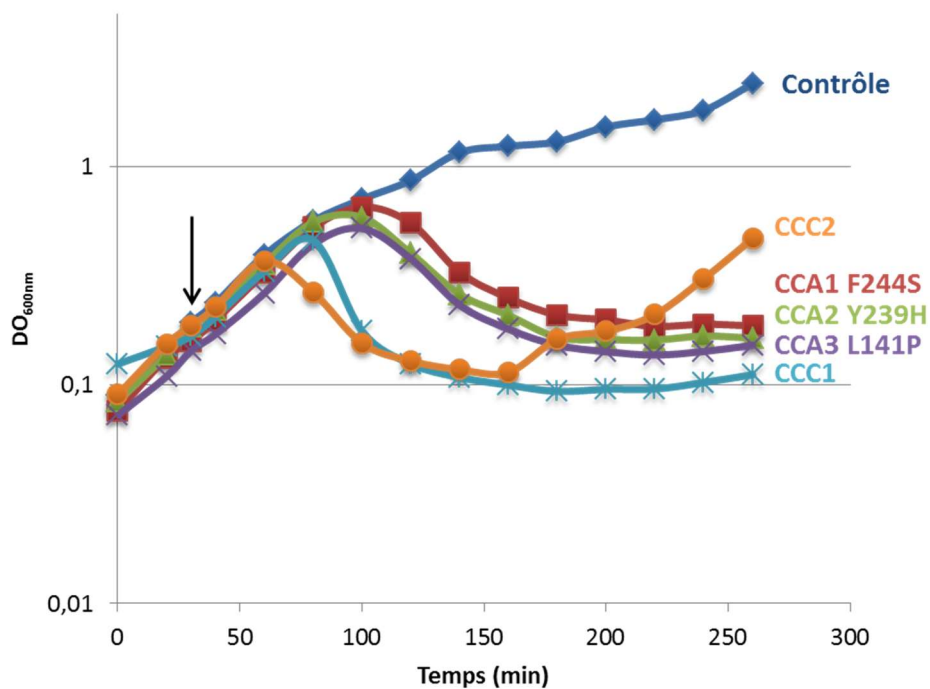


Figure 106 : Effet de l'expression périplasmique des différentes colicines chimères sur la croissance d'*E. coli*. Les cellules d'*E. coli* BW25113 ont été cultivées à 37°C dans du milieu 2YT-ampicilline et l'expression périplasmique des différentes chimères a été induite par l'ajout d'AHT dans le milieu à $60 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Flèche). Pour chaque courbe, le nom de la colicine chimère exprimée est indiqué.

Toutes les chimères ont provoqué la lyse des cellules d'*E. coli* suite à leur envoi dans le périplasme. Ces résultats étaient attendus pour les chimères CCA1 F244S, CCA3 L141P, CCC1 et CCC2 qui possèdent toutes *a priori* un site actif fonctionnel malgré la présence de mutations pour les CCA1 et CCA3. En revanche, la lyse provoquée par la CCA2 Y239H a constitué un résultat plus surprenant puisque cette dernière est en effet mutée au niveau de l'un de ses résidus essentiels à l'activité. Il est néanmoins possible que cette forme protéique ait conservé une activité enzymatique ou, du moins, une certaine capacité à interagir avec le lipide II, lui permettant d'induire la lyse des cellules traitées. Pour rappel, un résultat similaire avait été observé avec les protéines PcaM1 D222A et D222N, mutées au niveau d'un résidu essentiel à l'activité et qui étaient pourtant toujours capables d'induire la lyse d'*E. coli* suite à leur expression périplasmique. Il est important de rappeler également que le système d'expression qui a été utilisé permet très probablement l'envoi d'une quantité importante de protéine dans le périplasme, qui a pu être à l'origine d'une amplification du phénomène observé.

6.3. Analyse du contenu en pré-nols des membranes des cellules traitées par les colicines chimères :

Ces analyses ont eu pour but de déterminer si la lyse observée était bien la conséquence de l'activité enzymatique exercée par les différentes colicines chimères envoyées dans le périplasme. En effet, étant donné que les chimères CCA possèdent toutes des mutations au niveau de leur domaine catalytique, il fallait vérifier que ces dernières présentaient tout de même une activité de dégradation du lipide II *in vivo*, notamment pour la chimère CCA2 qui présente une mutation au niveau de l'un des résidus essentiels à son activité.

Comme lors des travaux complémentaires effectués sur la PcaM1, les membranes des cellules d'*E. coli* exprimant les différentes chimères fusionnées à OmpA ont été isolées et leur contenu en pré-nols a été analysé qualitativement. Les chromatogrammes obtenus suite à l'extraction sont présentés dans la **figure 107**.

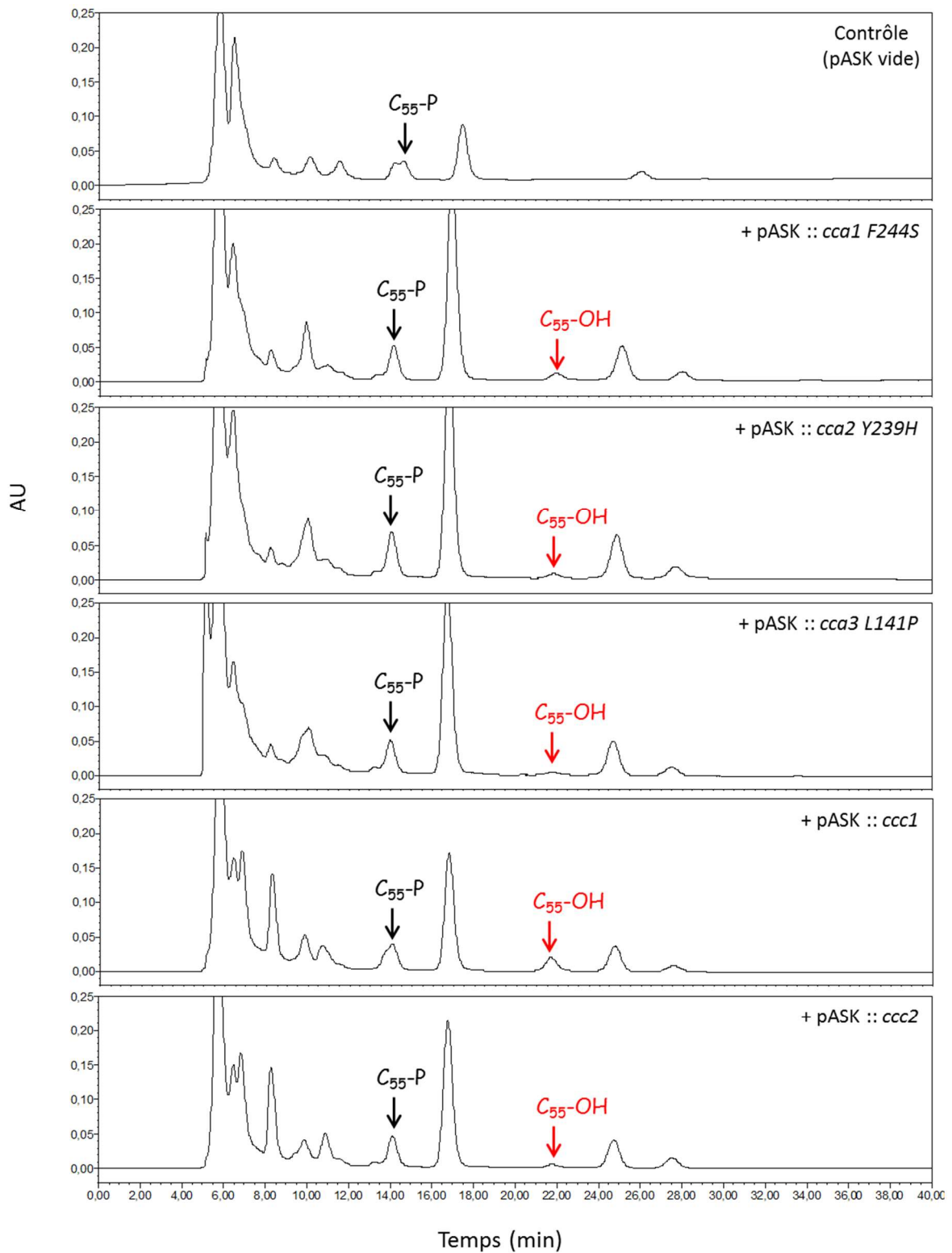


Figure 107 : Analyse par HPLC du contenu en prénoles des membranes des cellules traitées par les différentes colicines chimères. Les extraits membranaires des cellules d'*E. coli* BW25113 transformées par le vecteur pASK vide (contrôle) ou par les plasmides exprimant les protéines CCA1 F244S, CCA2 Y239H, CCA3 L141P, CCC1 et CCC2 ont été obtenus selon la procédure de Bligh et Dyer. Les cellules ont été cultivées dans du milieu 2YT-ampicilline et l'induction de l'expression périplasmique a été effectuée par ajout, dans le milieu de culture, d'AHT à une concentration finale de 60 ng.mL⁻¹, lorsque la DO_{600nm} avait atteint une valeur égale à 0,4. Les pics correspondant au C₅₅-P (Tr = 14 min) et au C₅₅-OH (Tr = 22 min) sont indiqués sur le chromatogramme.

De l'undécaprénol a été détecté dans les extraits membranaires des cellules d'*E. coli* traitées par chacune des chimères. Pour rappel, cette molécule est naturellement absente des membranes d'*E. coli* et sa présence était donc le signe d'un clivage du lipide II par les chimères. Ce résultat était attendu pour les protéines CCA1 F244S, CCA3 L141P, CCC1 et CCC2 qui possèdent toutes *a priori* un site actif fonctionnel, malgré la présence de mutations au sein des CCA1 et CCA3. En revanche la présence de C₅₅-OH au sein des cellules traitées par la CCA2 Y239H n'était pas forcément attendue. En effet, la mutation du résidu Y239 aurait pu être à l'origine d'une perte totale de l'activité enzymatique. Le fait que du C₅₅-OH ait été détecté dans ces membranes montre que la CCA2 Y239H possède toujours la capacité de cliver le lipide II, et suggère ainsi que le résidu Y239 ne soit pas impliqué directement dans le clivage du lipide II, mais plutôt dans sa liaison et son positionnement correct au sein du site actif. Ce résidu tyrosine est extrêmement conservé chez la ColM et ses différents homologues (**Figure 51**), et il est possible d'imaginer que son cycle aromatique soit impliqué dans la liaison de la partie glucidique du substrat. La mutation de ce résidu en histidine affecterait donc sa capacité de liaison mais le noyau imidazole pourrait tout de même rétablir dans une moindre mesure des interactions avec la partie glucidique. En revanche, sa mutation en alanine perturberait complètement la liaison du substrat et serait alors à l'origine de la chute d'activité observée (Barreteau *et al.*, 2012b).

Il serait alors intéressant de produire le mutant ponctuel PaeM Y243H et de mesurer son activité enzymatique *in vitro* ainsi que son efficacité catalytique, afin de voir si cette mutation a un effet plus modéré sur l'activité que la mutation en alanine. Ce résultat permettrait alors de favoriser l'hypothèse formulée selon laquelle ce résidu tyrosine n'est pas directement impliqué dans la coupure mais plutôt dans la liaison du substrat. Par ailleurs, il apparaît que ce résidu extrêmement conservé est remplacé par une phénylalanine au sein de la BurM2, homologue de la ColM issu de *Burkholderia*. Ce résidu étant dépourvu de toute fonction réactive, il est possible de lui assigner un rôle de fixation du substrat plutôt qu'un rôle purement catalytique.

La présence de C₅₅-OH confirme aussi les résultats obtenus *in vitro*, à savoir que le domaine catalytique est correctement replié au sein des protéines chimères. Par ailleurs, le système d'expression utilisé nécessite que la protéine soit dans un état dénaturé lors sa traversée de la membrane interne *via* le système Sec. Ces résultats montrent que la dénaturation de la protéine lors de son transport à travers la membrane n'a en rien affecté sa capacité à induire la lyse de la cellule cible une fois dans le périplasma, permettant donc de réfuter l'une des hypothèses émises précédemment selon laquelle le dépliement induit lors de la translocation à travers la membrane externe serait responsable de l'innocuité de ces protéines chimères vis-à-vis d'*E. coli* lors de la réalisation des tests de cytotoxicité en milieu solide.

L'autre hypothèse, selon laquelle les chimères étaient possiblement dépendantes de la protéine FkpA, peut également être réfutée. Il a été montré que la ColM était toujours dépendante de la protéine FkpA lorsqu'elle était envoyée directement dans la périplasma par le biais d'une expression périplasmique (Barnéoud-Arnoulet *et al.*, 2010). Par conséquent, si les chimères étaient dépendantes de FkpA et non reconnues par cette dernière, aucune cytotoxicité n'aurait été observée lors de leur envoi périplasmique. Les résultats obtenus suggèrent donc que les protéines chimères sont soit reconnues par FkpA, soit indépendantes de tout processus de maturation par cette dernière. Il serait donc intéressant de mener des expériences similaires dans une souche délétée du gène *fkpA* pour répondre à cette nouvelle interrogation.

Ces différents résultats suggèrent donc que si elles avaient pu pénétrer au sein des cellules cibles par la voie d'entrée classique, en parasitant le récepteur FhuA ainsi que le système de

translocation, elles en auraient probablement induit la lyse. Cette absence de cytotoxicité pose donc la question de la reconnaissance du récepteur FhuA par les différentes chimères. Pour tester l'interaction des chimères avec le récepteur FhuA, il faudrait tester leur capacité à inhiber l'action de la ColM lors d'un test de cytotoxicité en milieu solide. En effet, si les chimères sont déposées en excès par rapport à la ColM et qu'elles saturent tous les récepteurs FhuA présents à la surface membranaire, la ColM ne devrait plus être en mesure de s'y fixer et par conséquent d'induire la lyse.

Enfin, comme mentionné précédemment, il est possible que les solutions protéiques des différentes chimères testées n'étaient pas assez concentrées pour observer un effet lytique sur boîte, en particulier si elles possèdent une affinité plus faible que la ColM pour le récepteur FhuA. Pour s'assurer que l'innocuité observée n'est pas uniquement due à une concentration protéique trop faible, il faudrait tenter d'optimiser encore les conditions de renaturation de ces protéines chimères afin d'en obtenir une plus grande quantité sous forme soluble.

Conclusions et Perspectives

L'utilisation massive et à mauvais escient des antibiotiques au cours des dernières décennies est responsable de l'émergence accrue de bactéries pathogènes résistantes à un ou plusieurs antibiotiques (Levy et Marshall, 2004; Marshall et Levy, 2011). Ce phénomène est un problème de santé public majeur et reconnu aujourd'hui. Un « plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens » a d'ailleurs été adopté par l'organisation mondiale de la santé (OMS) en 2016 (OMS, 2016). Face à cette urgence sanitaire il est nécessaire de trouver rapidement de nouveaux agents capables d'éliminer ce type de souche bactérienne.

Les colicines, au regard de leurs propriétés antimicrobiennes intrinsèques, constituent des candidats intéressants. Elles exercent dans la très grande majorité des cas leur cytotoxicité par le biais d'une activité soit de type ionophorique, soit de type nucléasique (Cascales *et al.*, 2007). Seuls la colicine M et ses homologues présentent un mode d'action différent puisqu'il s'agit de la seule famille de colicines identifiée à ce jour pour interférer avec la voie de biosynthèse du peptidoglycane et cibler une molécule spécifique et essentielle au monde bactérien : le lipide II (El Ghachi *et al.*, 2006; Barreteau *et al.*, 2009; Grinter *et al.*, 2014). Cette caractéristique fait donc de ces enzymes des postulants sérieux quant à leur potentielle utilisation future en tant qu'alternative crédible aux antibiotiques conventionnels.

Cependant, avant de pouvoir envisager leur utilisation à des fins thérapeutiques, la connaissance de cette famille d'enzymes sur le plan fondamental doit encore être approfondie. C'est dans ce contexte que s'est inséré mon travail de thèse, orienté autour de trois principaux axes de recherche, fondamentaux ou plus appliqués :

- L'étude structurale, en présence ou en absence de ligand, et biochimique de la PaeM, homologue de la ColM issu de *P. aeruginosa*.
- L'étude de la cytotoxicité de différents homologues de la ColM vis-à-vis d'*E. coli*, souche bactérienne non ciblée naturellement par ces derniers.
- La création de colicines chimères, entre la ColM et certains de ses homologues, dans le but d'élargir le spectre d'action initial de ces bactériocines.

Le mécanisme catalytique de cette famille d'enzymes étant encore inconnu, des études structurales ont été menées sur la protéine PaeM afin de tenter de l'élucider. L'un des objectifs initiaux de ma thèse consistait à obtenir une structure tridimensionnelle de cette protéine en complexe avec un ligand, de façon à pouvoir visualiser précisément les interactions qui s'établissent au sein du site actif entre les résidus identifiés comme essentiels à l'activité et le substrat. Bien qu'aucune structure de ce type n'ait été obtenue, les études structurales réalisées au cours ce travail ont tout de même permis d'apporter un certain nombre d'informations, à la fois sur le plan technique, par une meilleure connaissance de la manipulation de cette protéine lors des expériences de cristallogénèse, mais également sur le plan fondamental.

En effet, ce travail a permis de mettre en évidence un problème récurrent quant à la reproductibilité d'obtention de cristaux de la PaeM sous sa forme entière, pour une condition de cristallisation donnée. Une telle variabilité posait donc clairement problème dans le cadre de la réalisation d'essais de co-cristallisation. L'obtention de la structure du mutant catalytique D241A a permis d'expliquer en partie pourquoi cette protéine présentait certaines difficultés pour cristalliser de manière reproductible dans une condition donnée : les trente résidus N-terminaux étaient absents de la structure du mutant et aucune densité électronique n'a pu être associée à cette région lors de la résolution de cette structure. L'absence de densité électronique au sein d'une structure tridimensionnelle de protéine étant souvent le signe d'une grande flexibilité de la région concernée, le caractère aléatoire de la cristallisation de la PaeM a donc été corrélé à la flexibilité accrue de sa région N-terminale. Par conséquent, une forme protéique tronquée, la PaeM Δ 1-30, a été générée. La construction de cette forme protéique a permis d'améliorer grandement la reproductibilité d'obtention des cristaux. Ce dernier point constitue une avancée essentielle pour la future réalisation d'expériences de co-cristallisation. En revanche, il est apparu que les cristaux de la PaeM tronquée ne diffractaient qu'à faible résolution (3,4 Å pour le meilleur jeu de données obtenu). Les conditions de cristallisation identifiées devront donc encore être optimisées, ou de nouvelles conditions devront être déterminées, dans le but d'obtenir des cristaux diffractant à plus haute résolution.

La détermination de la structure du mutant catalytique D241A de la PaeM à haute résolution (2,04 Å) a permis de mettre en évidence la présence d'une molécule d'eau qui pourrait *a priori* être impliquée dans le mécanisme catalytique de cette enzyme. En effet, il est apparu que cette molécule d'eau, engagée dans la coordination hexaédrique du cation Mg^{2+} au sein de la PaeM native, était maintenue au sein du site actif du mutant catalytique malgré la déstructuration complète du réseau de coordination provoquée par la mutation du résidu D241 en alanine. Cette observation a permis d'attribuer à cette molécule d'eau conservée un rôle potentiellement catalytique dans le mécanisme de coupure du lipide II par la PaeM. Parmi les différents mécanismes évoqués dans la littérature (Barreteau *et al.*, 2010; Grinter *et al.*, 2012b), tous relatent l'intervention d'une molécule d'eau lors de l'acte catalytique, que ce soit pour un mécanisme de coupure en une ou en deux étapes. Dans le cas d'un mécanisme en une seule étape, la molécule d'eau conservée attaquerait directement la liaison phosphodiester du lipide II, permettant la libération concomitante des deux produits de dégradation, l'undécaprénol et le 1-PP-MurNAc(-pentapeptide)-GlcNAc. En revanche, si la coupure du lipide II se fait en deux étapes, elle serait alors responsable de l'hydrolyse de l'intermédiaire covalent Enzyme-PP-MurNAc(-pentapeptide)-GlcNAc formé lors de la première étape. Afin de pouvoir discriminer entre ces deux types de mécanismes, l'idéal serait de réussir à piéger l'intermédiaire covalent, s'il existe, et de soumettre le complexe à une analyse par spectrométrie de masse. Pour piéger un tel intermédiaire, il faudrait réussir à identifier de manière certaine le résidu jouant le rôle de base catalytique lors de la seconde étape. En effet, si un tel résidu est muté, il ne pourra alors plus activer la molécule d'eau responsable de l'attaque et du clivage de l'acyl-enzyme, permettant ainsi de piéger ce dernier. Il a par exemple été montré que l'intermédiaire phospho-enzyme formé pour la β -phosphoglucomutase de *L. lactis*, appartenant à la famille des haloacides déshydrogénases, était capable de persister naturellement dans le temps étant donné qu'aucun résidu pouvant jouer le rôle d'une base n'était localisé à proximité du groupement aspartyl-phosphate formé (Lahiri *et al.*, 2002).

Comme mentionné précédemment, des études structurales ont également été menées sur la PaeM Δ 1-30. Bien qu'aucune structure à haute résolution de cette protéine n'ait pour l'heure été obtenue, les premières données en notre possession permettent raisonnablement d'émettre

l'hypothèse selon laquelle un réarrangement des domaines s'établirait au sein de cette forme protéique. Les domaines de réception et d'activité de la PaeM Δ 1-30 semblent en effet présenter une orientation spatiale respective différente de celle de la PaeM native. Par ailleurs, bien que de nombreux cristaux aient été obtenus, nombre d'entre eux n'ont diffracté qu'à basse résolution. Cette observation peut laisser supposer que la protéine, au sein même du cristal, présente une certaine mobilité. Il serait donc intéressant d'effectuer une étude de diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS, *Small Angle X-ray Scattering*) sur la PaeM Δ 1-30, de façon à voir si elle existe sous différentes conformations en solution. Si tel est le cas, il faudrait alors explorer de nouvelles conditions de cristallisation pour tenter de la cristalliser sous ses différents états conformationnels. Ce type de flexibilité a déjà été observé pour la PcaM2, homologue de la ColM issu *P. carotovorum*, qui existe sous deux formes en solution : une forme étendue et une forme courbée qui ont toutes deux été cristallisées (Grinter *et al.*, 2014). Par ailleurs, il a également été montré que la PaeM Δ 1-30 présentait une activité spécifique 25 fois supérieure à celle de la PaeM native. Un phénomène similaire avait été observé pour la ColM suite à la délétion de son domaine N-terminal de translocation (Barreteau *et al.*, 2010). Au niveau structural, il a également été montré que le domaine N-terminal est en interaction avec les domaines de réception et/ou d'activité au sein des protéines ColM et PaeM (Zeth *et al.*, 2008; Barreteau *et al.*, 2012b). Il est donc tentant de corréliser cette augmentation de l'activité spécifique avec le changement conformationnel putatif qui semble s'établir au sein de la PaeM Δ 1-30. Le réarrangement des domaines peut en effet être à l'origine d'une augmentation de l'accessibilité du site actif pour le substrat. Par ailleurs, il est possible que les chaînes latérales des résidus essentiels à l'activité de cette protéine présentent une orientation différente de celle retrouvée au sein de la PaeM native, participant ainsi à l'augmentation de l'activité enzymatique de ce variant. La résolution de la structure de la PaeM Δ 1-30 à haute résolution apparaît donc désormais primordiale pour répondre à ces interrogations. Il est possible d'imaginer que ce changement conformationnel observé *in vitro* s'établisse également *in vivo*. En effet, comme la traversée de la membrane externe nécessite l'interaction du domaine N-terminal de la protéine avec une machinerie de translocation spécialisée, il est possible que la partie N-terminale de la protéine reste en interaction avec cette dernière, suite à l'import de la PaeM dans le périplasma. Ce domaine n'exercerait alors plus de contraintes physiques sur les domaines de réception et d'activité, permettant ainsi un réarrangement spatial des domaines de la protéine qui serait *de facto* plus active. Pour confirmer cette hypothèse, il est nécessaire de déterminer si une interaction assez forte peut s'établir entre le domaine N-terminal de la PaeM et l'homologue de TonB issu de *P. aeruginosa*, par des méthodes biochimiques telles que la co-purification ou la mesure d'interaction par microcalorimétrie.

En parallèle des études structurales, des conditions permettant la synthèse et la purification de ligands solubles potentiels ont été mises au point, dans le but des les utiliser *in fine* lors d'essais de co-cristallisation. Du 1-PP-MurNAc-pentapeptide, correspondant au produit de dégradation soluble du lipide I généré sous l'action de la ColM ou de ses homologues, a ainsi été produit à partir d'UDP-MurNAc-pentapeptide et purifié. Sa capacité d'interaction avec la PaeM a été évaluée par la réalisation d'expériences de microcalorimétrie. Malheureusement, aucune interaction n'a pu être mise en évidence dans les conditions testées, et cette molécule n'a donc pas été retenue pour de futurs essais de co-cristallisation.

Afin de disposer d'une molécule soluble susceptible d'établir une interaction assez forte avec la PaeM pour être utilisée lors d'essais de co-cristallisation, des lipides II solubles possédant une chaîne lipidique à 10 ou 15 atomes de carbone ont été obtenus par le biais d'une synthèse enzymatique. Ces

substrats possèdent en théorie tous les déterminants nécessaires à leur reconnaissance par la PaeM, puisque seule la longueur de la chaîne lipidique varie par rapport au substrat naturel. Il est apparu que le lipide II en C₁₅ n'était pas substrat de la PaeM, contrairement au lipide II en C₁₀, et constituait donc un substrat potentiellement non hydrolysable. Une telle molécule présente l'avantage de mimer parfaitement le substrat naturel sans pour autant être dégradé par la protéine d'intérêt. Les conditions de purification de ce ligand ayant été mises au point récemment, aucun test d'interaction n'a pour l'heure été mené. En effet, avant de pouvoir envisager son utilisation lors d'essais de co-cristallisation, il sera nécessaire de déterminer en amont si ce dernier est correctement reconnu par la PaeM. Pour cela, des expériences de microcalorimétrie (ITC ou DSC) ou de résonance plasmonique de surface (SPR) pourront être réalisées. Ce type de test nécessite, tout comme les essais de co-cristallisation, des quantités importantes de substrat. Afin de les mener à bien, une synthèse de ce substrat à plus grande échelle sera nécessaire. Dans le cas où aucune interaction entre le lipide II en C₁₅ et la PaeM ne serait détectée, les conditions de synthèse du lipide II en C₁₀, qui lui est substrat de la PaeM, devront être optimisées de façon à limiter sa dégradation spontanée. Puis, le même type d'études que celles réalisées avec le lipide II en C₁₅ seront alors nécessaires. Par ailleurs, il serait intéressant d'effectuer des essais d'interaction avec la PaeM Δ1-30, étant donné que cette forme de la protéine présente probablement un site actif dont la conformation est plus proche de celle retrouvée *in vivo*, et de comparer l'affinité respective des formes protéiques natives et tronquées vis-à-vis de ces substrats. Si elle se révèle meilleure pour la PaeM Δ1-30, alors les essais de co-cristallisation devront être menés entre cette dernière et le lipide II en C₁₅, afin de favoriser l'obtention d'une structure de la PaeM en complexe avec un ligand.

Le deuxième axe de recherche de mon travail de thèse était centré sur l'étude la cytotoxicité de différents homologues de la ColM vis-à-vis d'*E. coli*. Toutes les protéines de cette famille d'enzymes exercent leur action létale selon un mode d'action similaire en trois étapes : liaison à un récepteur spécifique de membrane externe, translocation au sein du périplasma de la cellule cible et dégradation du lipide II. La très grande spécificité des interactions protéine-protéine mises en jeu lors des deux premières étapes est responsable de leur spectre d'action antibactérien très restreint.

Afin d'étudier le pouvoir cytotoxique des différents homologues de la ColM vis-à-vis d'*E. coli* tout en s'affranchissant des étapes de réception et de translocation responsables de la spécificité d'espèce, ces homologues ont été fusionnés à la séquence d'adressage de la protéine OmpA, responsable de l'export des protéines néosynthétisées directement dans le périplasma de la cellule productrice. Cette étude de cytotoxicité par expression périplasmique a débuté avec la protéine PcaM1, homologue issu de *P. carotovorum*. Il a ainsi été montré que la PcaM1, ainsi que deux variants, PcaM1 D222A et PcaM1 Δ1-107, étaient tous capables de provoquer la lyse d'*E. coli*. Ce phénomène lytique a été corrélé à une dégradation du lipide II *in vivo*, ainsi qu'à un arrêt de synthèse du peptidoglycane pour les bactéries traitées par les formes sauvage et tronquée. La lyse provoquée par le mutant catalytique D222A de la PcaM1 a, quant à elle, constitué un résultat plus surprenant, cette forme s'étant avérée incapable de cliver le lipide II *in vitro* ou de tuer une souche sensible de *P. carotovorum* (Grinter *et al.*, 2012a). L'analyse de plusieurs paramètres physiologiques a permis de démontrer que ce mutant était pourtant bien capable d'inhiber la voie de biosynthèse du peptidoglycane chez *E. coli*, conduisant ainsi à la lyse de la cellule cible. Il a donc été supposé que la PcaM1 D222A, bien qu'étant catalytiquement inactive, avait probablement conservé une certaine

capacité à lier le lipide II. En séquestrant ce dernier, la PcaM1 D222A empêcherait alors sa prise en charge par les PBP. Pour confirmer cette hypothèse, la mise en évidence d'une interaction *in vitro* entre le lipide II et la PcaM1 apparaît essentielle. Pour cela, il est possible de réaliser un test d'activité classique de dégradation *in vitro* du lipide II par la PcaM1 en présence d'un excès de PcaM1 D222A. Si une diminution de la dégradation est observée dans ces conditions, cela constituerait une preuve indirecte de l'interaction. Elle pourrait également être mesurée par la réalisation d'expériences de microcalorimétrie en utilisant comme substrat le lipide II en C₁₅. Une interaction protéine-lipide II pourrait également être identifiée par la réalisation d'un gel retard en conditions natives. Cette méthode, qui nécessite l'utilisation d'un lipide II fluorescent, a notamment été utilisée pour démontrer une interaction entre la PBP1b de *S. pneumoniae* et le lipide II (Di Guilmi *et al.*, 2003).

L'étude de la cytotoxicité des homologues de ColM vis-à-vis d'*E. coli* a ensuite été étendue aux protéines PaeM, PsyM et PflM, issues respectivement de *P. aeruginosa*, *P. syringae* et *P. fluorescens*, en utilisant la même méthodologie. Il est apparu clairement que ces trois protéines étaient également capables de provoquer la lyse d'*E. coli*, souche bactérienne non ciblée naturellement par ces trois protéines. Cette lyse a été directement corrélée à leur activité enzymatique, puisque de l'undécaprénol, molécule non présente en temps normal chez *E. coli*, a bien été détecté au sein des membranes des cellules ainsi traitées.

Le pouvoir cytotoxique de tous les homologues cités précédemment vis-à-vis d'*E. coli* a également été évalué par la réalisation d'un test d'antibiose classique. Aucune activité cytotoxique n'a été observée de la part des protéines PcaM1, PsyM et PflM dans ce cas, même lorsque d'importantes quantités de protéines purifiées (jusqu'à 70 µg) étaient mises en jeu. En revanche, il a été mis en évidence que de fortes doses de PaeM purifiée pouvaient provoquer une inhibition de croissance d'*E. coli* en milieu solide. Cette observation constitue l'un des résultats les plus surprenants et inattendus obtenus au cours de ma thèse. En effet, la spécificité des étapes de réception et de translocation empêche en théorie ces bactériocines d'exercer leur activité létale sur une autre espèce bactérienne que celle ciblée naturellement. Or, il a clairement été identifié ici que la PaeM était capable de provoquer une inhibition de croissance chez *E. coli* selon le mode d'action classique : liaison au récepteur de membrane externe, translocation et activité. Par ailleurs, il est apparu que cette activité cytotoxique semblait dépendre des mêmes partenaires protéiques que la ColM, des souches de *E. coli* mutées pour les gènes *fhuA*, *tonB*, et *fkpA* ayant été montrées insensibles à la PaeM aussi bien qu'à la ColM. Face à ces résultats, il convient donc d'approfondir l'étude de la cytotoxicité de la PaeM vis-à-vis d'*E. coli*. La mise en évidence d'interactions directes entre la PaeM et les différents partenaires précédemment cités et la PaeM, *via* l'utilisation de différentes méthodes (co-purification, microcalorimétrie, retard sur gel) apparaît essentielle pour comprendre par quels mécanismes la PaeM réussit à parasiter la machinerie d'import de la ColM.

La dépendance de la PaeM vis-à-vis de la chaperonne FkpA a aussi été démontrée. Pour rappel, cette protéine possède deux domaines : l'un portant une activité chaperonne et l'autre une activité peptidylprolyl *cis-trans* isomérase. Afin de confirmer cette dépendance, l'expression périplasmique dans une souche mutée pour le gène de la chaperonne devrait conduire à une absence de phénotype lytique, comme cela a pu être montré pour la ColM (Barnéoud-Arnoulet *et al.*, 2010). De plus, pour déterminer si les deux fonctions portées par cette protéine sont nécessaires, la même expérience d'expression périplasmique pourra être effectuée au sein d'une souche $\Delta fkpA$ exprimant l'une ou

l'autre seulement de ces activités chaperonne et isomérase, les deux domaines correspondants de la protéine FkpA ayant été démontrés fonctionnellement indépendants (Saul *et al.*, 2004).

De manière plus globale, l'étude de la cytotoxicité, selon le mode d'action classique, des protéines PaeM, PflM et PcaM1 vis-à-vis d'*E. coli* pourrait être poursuivie par l'expression hétérologue chez cette dernière espèce des récepteurs spécifiques de ces différentes protéines qui ont récemment été identifiés (FiuA pour PaeM et PflM, FusA pour PcaM1) (Grinter *et al.*, 2016; Ghequire *et al.*, 2017a). Ces deux récepteurs sont en effet des récepteurs TonB-dépendants. Il serait donc intéressant de voir si le système de translocation TonB d'*E. coli* permet l'import de ces bactériocines dès lors que leurs récepteurs dédiés sont exprimés au niveau de la membrane externe.

Enfin, il est apparu que la Cmi, protéine d'immunité associée à la ColM, était également capable de protéger *E. coli* contre les effets toxiques de la PaeM, mettant ainsi en évidence que l'immunité croisée était possible. Afin de déterminer si la Cmi est également en capacité de protéger *E. coli* contre les autres homologues, il conviendrait de la co-exprimer lors de l'expression périplasmique de chacun d'entre eux. Cela permettrait de voir si la Cmi protège de « manière universelle » une souche d'*E. coli* contre les effets toxiques des différents homologues de la ColM. Le même type d'expériences pourrait être réalisée suite à l'expression des protéines d'immunité associées à PaeM, PflM, PsyM et PcaM1, qui ont également été identifiées (Grinter *et al.*, 2012b; Ghequire *et al.*, 2017b), ceci afin d'approfondir les connaissances concernant les mécanismes d'immunité associés à cette famille d'enzymes. En effet, les différentes protéines d'immunité identifiées à ce jour ne possèdent pas toute la même topologie et présentent donc probablement des mécanismes d'action différents. Dans une perspective d'utilisation des différentes protéines ColM-like en tant qu'alternative aux antibiotiques, il s'avère donc nécessaire de comprendre également les mécanismes d'immunité afin de pouvoir les contourner.

Les résultats obtenus suite à cette étude globale de cytotoxicité des différents homologues de la ColM vis-à-vis d'*E. coli* a donc permis de démontrer que les membres de cette famille d'enzymes pourraient *a priori* éliminer n'importe quelle espèce bactérienne dès lors qu'ils auraient accès à son périplasme et donc au lipide II. Ces résultats ont aussi permis de valider l'approche consistant à élargir le spectre d'action initial de ces enzymes par la création de bactériocines hybrides. Ce point a constitué le dernier axe de recherche de mon travail de thèse. Afin de valider cette démarche, seules des colicines chimères ciblant spécifiquement *E. coli* ont été conçues. Deux types de chimères ont été construites : entre ColM et PaeM (chimères CCA) d'une part et entre ColM et PcaM1 (chimères CCC) d'autre part. Dans les deux cas, les chimères construites possédaient les domaines de réception et de translocation de la ColM, nécessaires à leur import au sein d'une souche d'*E. coli*. Leur domaine catalytique était, quant à lui, issu de la PaeM ou de la PcaM1. Toutes les chimères construites ont démontré une activité de dégradation du lipide II *in vitro*, confirmant ainsi que leur domaine catalytique était correctement replié. Leur activité cytotoxique a également été évaluée. Il a ainsi été montré que l'expression périplasmique de chacune des chimères était à l'origine d'un phénotype lytique, qui a été corrélé à un arrêt de synthèse du peptidoglycane suite à la dégradation du lipide II (mise en évidence d'undécaprénol dans les membranes des cellules traitées). En revanche, aucune chimère construite n'a développé une quelconque cytotoxicité vis-à-vis d'*E. coli* lorsqu'elle était administrée depuis le milieu extérieur. Ce résultat, qui soulevait donc la question de l'import des colicines au sein de la cellule cible, a conduit à émettre trois hypothèses pour expliquer cette absence de toxicité : (i). la quantité de protéine administrée n'était pas suffisante pour induire la lyse d'*E. coli* ;

(ii). les colicines chimères ne se sont pas liées au récepteur FhuA ; (iii). les colicines chimères se sont liées au récepteur mais n'ont pas été transloquées au sein de la cellule cible. Des expériences complémentaires devront être mises en jeu afin d'apporter des éclaircissements sur ces différents points.

Au cours de ce travail, il est nettement apparu que la quantité de colicine chimère obtenue sous forme soluble était dans tous les cas extrêmement faible, malgré les nombreuses conditions de production et de purification testées. Afin d'améliorer l'efficacité de la production de ces protéines sous forme soluble, une expression hétérologue au sein d'un autre organisme que *E. coli*, tel que la levure, pourra être menée. Ce type d'expression hétérologue peut parfois améliorer de façon significative la proportion de protéine produite sous forme soluble. Afin de vérifier si les protéines construites possèdent un domaine de réception fonctionnel, il faudra évaluer leur capacité à inhiber l'activité de la ColM native *in vivo*, ainsi que leur capacité d'interaction avec le récepteur FhuA *in vitro*. Ce type de test nécessite cependant une quantité importante de protéine purifiée.

Il est également possible que la délimitation des différents domaines à fusionner, effectuée lors de la conception des chimères, soit à l'origine de leur innocuité. Par exemple, nous avons choisi d'utiliser les résidus 1 à 120 de la ColM pour constituer les domaines de réception et de translocation. Ce choix a uniquement découlé des données biochimiques obtenues au laboratoire qui avaient permis de définir plus précisément la longueur du domaine catalytique de la ColM, composé des résidus 123 à 271 ; les domaines de réception et de translocation ont par conséquent été considérés comme constitués des résidus 1 à 122 (Barreteau *et al.*, 2010). Or, suite à la publication de la structure tridimensionnelle de la ColM, Zeth et ses collaborateurs avaient attribué les résidus 1 à 140 aux domaines de réception et de translocation (Zeth *et al.*, 2008). Il est donc possible que les éléments structuraux compris entre les résidus 120 et 140 aient à la fois un rôle dans la liaison au récepteur et dans l'activité. Il serait donc intéressant de construire le même type de colicines chimères en prenant cette fois-ci les résidus 1 à 140 de la ColM pour constituer les domaines de réception et de translocation, et de leur fusionner les domaines catalytiques provenant de différents homologues. De telles constructions permettront peut-être également d'améliorer la solubilité des chimères.

Par ailleurs, il serait également intéressant de fusionner, à la suite des domaines de réception et de translocation de la ColM des domaines catalytiques provenant de colicines ionophoriques, telles que les ColA ou ColB, qui ont pour cible la membrane interne. En effet, de telles constructions, si elles s'avéraient actives, permettraient de cibler des souches résistantes à la ColA ou la ColB (souches naturellement résistantes, mutants d'*E. coli* affectés au niveau des récepteurs nécessaires à l'import de ces colicines ...). Les domaines catalytiques de ColA et ColB accèderaient alors à leur cible en empruntant une voie d'accès différente de celles classiquement utilisées.

Des données de la littérature montrent que la seule présence du domaine de translocation de la Colla permet l'import au sein de la cellule d'une Colla amputée de son domaine de réception (Jakes et Finkelstein, 2010). Cette propriété intrinsèque du domaine de translocation de la Colla pourrait donc être détournée pour permettre l'import des protéines PaeM, PflM, PsyM et PcaM1 au sein d'une souche d'*E. coli* afin qu'elles y exercent leur action cytotoxique.

Toujours dans l'optique d'élargir le spectre d'action initial de ces toxines, il est possible d'imaginer la création de colicines chimères ciblant spécifiquement les bactéries à Gram positif. Pour cela, la fusion du domaine catalytique provenant de la ColM ou de l'un de ses homologues à un

domaine de liaison au peptidoglycane, tel que le domaine LysM (Mesnage *et al.*, 2014), permettrait de cibler ce type de bactérie dont le peptidoglycane est directement accessible depuis le milieu extérieur et non protégé par une membrane externe.

L'ensemble des travaux effectués et les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse ont donc permis de confirmer le fort potentiel de la colicine M et de ses différents homologues en tant qu'alternative crédible aux antibiotiques conventionnels. Une étude récente a par ailleurs montré que cette colicine, parmi l'ensemble des colicines testées (ColE2, E3, E6, E7, D, N, K, 5, U, B, Ia et M), était celle présentant le spectre d'action le plus large sur une gamme de souches pathogènes d'*E. coli*. Il a en particulier été montré que la ColM était en mesure d'éliminer la souche d'*E. coli* de sérotype O104:H4, célèbre pour avoir causé l'épidémie de diarrhée sanglante en Europe en 2011 (Schulz *et al.*, 2015). Suite à cette étude, un mélange, nommé « COLICIN », composé par les ColE1, ColE7, ColIa, ColN, ColK, ColU, Col5, ColB et ColM a obtenu le statut de GRAS (*Generally Recognized As Safe*), délivré par la FDA (*Food and Drug Administration*) pour son utilisation en tant qu'additif alimentaire pour traiter des fruits et légumes en 2015 et des produits carnés en 2017 (FDA, 2015, 2017). Ces accréditations ouvrent donc la voie quant à l'utilisation thérapeutique de la colicine M et ses homologues en tant qu'alternative viable aux antibiotiques conventionnels.

Références Bibliographiques

- A Gratia, and Fredericq, P. (1946). Diversité des souches antibiotiques d'*E. coli* et étendue variable de leur champs d'action. *C R Soc Biol Paris* 140, 1032–1033.
- Abraham, E.P., and Chain, E. (1988). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev. Infect. Dis.* 10, 677–678.
- Alkhatib, Z., Lagedroste, M., Fey, I., Kleinschrodt, D., Abts, A., and Smits, S.H.J. (2014). Lantibiotic Immunity: Inhibition of Nisin Mediated Pore Formation by NisI. *PLOS ONE* 9, e102246.
- Allen, N.E., and Nicas, T.I. (2003). Mechanism of action of oritavancin and related glycopeptide antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 511–532.
- Amrein, K.E., Takacs, B., Stieger, M., Molnos, J., Flint, N.A., and Burn, P. (1995). Purification and characterization of recombinant human p50csk protein-tyrosine kinase from an *Escherichia coli* expression system overproducing the bacterial chaperones GroES and GroEL. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 1048–1052.
- Andes, D., Craig, W., Nielsen, L.A., and Kristensen, H.H. (2009). In Vivo Pharmacodynamic Characterization of a Novel Plectasin Antibiotic, NZ2114, in a Murine Infection Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 3003–3009.
- Arthur, M. (2016). Regulation of Bacterial Peptidoglycan Polymerization. *Trends Microbiol.* 24, 519–521.
- Arthur, M., Reynolds, P., and Courvalin, P. (1996). Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends Microbiol.* 4, 401–407.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., and Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* 2, 2006.0008.
- Babič, A., Patin, D., Boniface, A., Hervé, M., Mengin-Lecreulx, D., Pecar, S., Gobec, S., and Blanot, D. (2007). Chemoenzymatic synthesis of the nucleotide substrates of the Mur ligases. (Portoroz, Slovenia: Kikelj D, ed.), pp. 1–4.
- Baboolal, T.G., Conroy, M.J., Gill, K., Ridley, H., Visudtiphole, V., Bullough, P.A., and Lakey, J.H. (2008). Colicin N Binds to the Periphery of Its Receptor and Translocator, Outer Membrane Protein F. *Structure* 16, 371–379.
- Baddiley, J. (1972). Teichoic acids in cell walls and membranes of bacteria. *Essays Biochem.* 8, 35–77.
- Badet, B., Vermoote, P., Haumont, P.Y., Lederer, F., and LeGoffic, F. (1987). Glucosamine synthetase from *Escherichia coli*: purification, properties, and glutamine-utilizing site location. *Biochemistry (Mosc.)* 26, 1940–1948.
- Badet, B., Vermoote, P., and Le Goffic, F. (1988). Glucosamine synthetase from *Escherichia coli*: kinetic mechanism and inhibition by N3-fumaroyl-L-2,3-diaminopropionic derivatives. *Biochemistry (Mosc.)* 27, 2282–2287.
- Barnéoud-Arnoulet, A., Gavioli, M., Lloubès, R., and Cascales, E. (2010a). Interaction of the colicin K bactericidal toxin with components of its import machinery in the periplasm of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 192, 5934–5942.

- Barnéoud-Arnoulet, A., Barreteau, H., Touzé, T., Mengin-Lecreulx, D., Llobès, R., and Duché, D. (2010b). Toxicity of the colicin M catalytic domain exported to the periplasm is FkpA independent. *J. Bacteriol.* *192*, 5212–5219.
- Barreteau, H., Kovac, A., Boniface, A., Sova, M., Gobec, S., and Blanot, D. (2008). Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* *32*, 168–207.
- Barreteau, H., Magnet, S., El Ghachi, M., Touzé, T., Arthur, M., Mengin-Lecreulx, D., and Blanot, D. (2009a). Quantitative high-performance liquid chromatography analysis of the pool levels of undecaprenyl phosphate and its derivatives in bacterial membranes. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* *877*, 213–220.
- Barreteau, H., Bouhss, A., Fourgeaud, M., Mainardi, J.-L., Touzé, T., Gérard, F., Blanot, D., Arthur, M., and Mengin-Lecreulx, D. (2009b). Human- and plant-pathogenic *Pseudomonas* species produce bacteriocins exhibiting colicin M-like hydrolase activity towards peptidoglycan precursors. *J. Bacteriol.* *191*, 3657–3664.
- Barreteau, H., Bouhss, A., Gérard, F., Duché, D., Boussaid, B., Blanot, D., Llobès, R., Mengin-Lecreulx, D., and Touzé, T. (2010). Deciphering the catalytic domain of colicin M, a peptidoglycan lipid II-degrading enzyme. *J. Biol. Chem.* *285*, 12378–12389.
- Barreteau, H., El Ghachi, M., Barnéoud-Arnoulet, A., Sacco, E., Touzé, T., Duché, D., Gérard, F., Brooks, M., Patin, D., Bouhss, A., et al. (2012a). Characterization of colicin M and its orthologs targeting bacterial cell wall peptidoglycan biosynthesis. *Microb. Drug Resist. Larchmt. N* *18*, 222–229.
- Barreteau, H., Tiouajni, M., Graille, M., Josseume, N., Bouhss, A., Patin, D., Blanot, D., Fourgeaud, M., Mainardi, J.-L., Arthur, M., et al. (2012b). Functional and structural characterization of PaeM, a colicin M-like bacteriocin produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* *287*, 37395–37405.
- Barreteau, H., Blanot, D., Mengin-Lecreulx, D., and Touzé, T. (2017). Lipid Intermediates in Bacterial Peptidoglycan Biosynthesis. In *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes*, O. Geiger, ed. (Springer International Publishing), pp. 1–19.
- Baty, D., Llobès, R., Geli, V., Lazdunski, C., and Howard, S.P. (1987). Extracellular release of colicin A is non-specific. *EMBO J.* *6*, 2463–2468.
- Bauer, R., and Dicks, L.M.T. (2005). Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *Int. J. Food Microbiol.* *101*, 201–216.
- Bellais, S., Arthur, M., Dubost, L., Hugonnet, J.-E., Gutmann, L., van Heijenoort, J., Legrand, R., Brouard, J.-P., Rice, L., and Mainardi, J.-L. (2006). Aslfm, the D-aspartate ligase responsible for the addition of D-aspartic acid onto the peptidoglycan precursor of *Enterococcus faecium*. *J. Biol. Chem.* *281*, 11586–11594.
- Bénédicti, H., Lazdunski, C., and Llobès, R. (1991). Protein import into *Escherichia coli*: colicins A and E1 interact with a component of their translocation system. *EMBO J.* *10*, 1989–1995.
- Bénédicti, H., Llobès, R., Lazdunski, C., and Letellier, L. (1992). Colicin A unfolds during its translocation in *Escherichia coli* cells and spans the whole cell envelope when its pore has formed. *EMBO J.* *11*, 441–447.

Benson, T.E., Marquardt, J.L., Marquardt, A.C., Etkorn, F.A., and Walsh, C.T. (1993). Overexpression, purification, and mechanistic study of UDP-N-acetylenolpyruvylglucosamine reductase. *Biochemistry (Mosc.)* 32, 2024–2030.

Benson, T.E., Walsh, C.T., and Hogle, J.M. (1996). The structure of the substrate-free form of MurB, an essential enzyme for the synthesis of bacterial cell walls. *Struct. Lond. Engl.* 1993 4, 47–54.

Bernard, R., Joseph, P., Guiseppi, A., Chippaux, M., and Denizot, F. (2003). YtsCD and YwoA, two independent systems that confer bacitracin resistance to *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 228, 93–97.

Bittner, L.-M., Arends, J., and Narberhaus, F. (2017). When, how and why? Regulated proteolysis by the essential FtsH protease in *Escherichia coli*. *Biol. Chem.* 398, 625–635.

Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.

Boneca, I.G., Huang, Z.-H., Gage, D.A., and Tomasz, A. (2000). Characterization of *Staphylococcus aureus* Cell Wall Glycan Strands, Evidence for a New β -N-Acetylglucosaminidase Activity. *J. Biol. Chem.* 275, 9910–9918.

Bonsor, D.A., Hecht, O., Vankemmelbeke, M., Sharma, A., Krachler, A.M., Housden, N.G., Lilly, K.J., James, R., Moore, G.R., and Kleanthous, C. (2009). Allosteric beta-propeller signalling in TolB and its manipulation by translocating colicins. *EMBO J.* 28, 2846–2857.

Bouhss, A., Mengin-Lecreulx, D., Blanot, D., van Heijenoort, J., and Parquet, C. (1997). Invariant amino acids in the Mur peptide synthetases of bacterial peptidoglycan synthesis and their modification by site-directed mutagenesis in the UDP-MurNAc:L-alanine ligase from *Escherichia coli*. *Biochemistry (Mosc.)* 36, 11556–11563.

Bouhss, A., Mengin-Lecreulx, D., Le Beller, D., and Van Heijenoort, J. (1999). Topological analysis of the MraY protein catalysing the first membrane step of peptidoglycan synthesis. *Mol. Microbiol.* 34, 576–585.

Bouhss, A., Josseaume, N., Allanic, D., Crouvoisier, M., Gutmann, L., Mainardi, J.-L., Mengin-Lecreulx, D., van Heijenoort, J., and Arthur, M. (2001). Identification of the UDP-MurNAc-Pentapeptide:l-Alanine Ligase for Synthesis of Branched Peptidoglycan Precursors in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 183, 5122–5127.

Bouhss, A., Dementin, S., van Heijenoort, J., Parquet, C., and Blanot, D. (2002). MurC and MurD synthetases of peptidoglycan biosynthesis: borohydride trapping of acyl-phosphate intermediates. *Methods Enzymol.* 354, 189–196.

Bouhss, A., Trunkfield, A.E., Bugg, T.D.H., and Mengin-Lecreulx, D. (2008). The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 208–233.

Bourdineaud, J.P., Boulanger, P., Lazdunski, C., and Letellier, L. (1990). In vivo properties of colicin A: channel activity is voltage dependent but translocation may be voltage independent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 1037–1041.

Bouveret, E., Derouiche, R., Rigal, A., Llobès, R., Lazdunski, C., and Bénédicti, H. (1995). Peptidoglycan-associated lipoprotein-TolB interaction. A possible key to explaining the formation of

contact sites between the inner and outer membranes of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *270*, 11071–11077.

Bouveret, E., Rigal, A., Lazdunski, C., and Bénédicti, H. (1997). The N-terminal domain of colicin E3 interacts with TolB which is involved in the colicin translocation step. *Mol. Microbiol.* *23*, 909–920.

Bouveret, E., Rigal, A., Lazdunski, C., and Bénédicti, H. (1998). Distinct regions of the colicin A translocation domain are involved in the interaction with TolA and TolB proteins upon import into *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *27*, 143–157.

Boyle, D.S., and Donachie, W.D. (1998). *mraY* Is an Essential Gene for Cell Growth in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *180*, 6429.

Boyle, D.S., Khattar, M.M., Addinall, S.G., Lutkenhaus, J., and Donachie, W.D. (1997). *ftsW* is an essential cell-division gene in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *24*, 1263–1273.

Braun, V. (1975). Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* *415*, 335–377.

Braun, V. (1989). The structurally related *exbB* and *tolQ* genes are interchangeable in conferring tonB-dependent colicin, bacteriophage, and albomycin sensitivity. *J. Bacteriol.* *171*, 6387–6390.

Braun, V., and Herrmann, C. (1993). Evolutionary relationship of uptake systems for biopolymers in *Escherichia coli*: cross-complementation between the TonB-ExbB-ExbD and the TolA-TolQ-TolR proteins. *Mol. Microbiol.* *8*, 261–268.

Braun, V., Schaller, K., and Wolff, H. (1973). A common receptor protein for phage T5 and colicin M in the outer membrane of *Escherichia coli* B. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *323*, 87–97.

Braun, V., Schaller, K., and Wabl, M.R. (1974). Isolation, Characterization, and Action of Colicin M. *Antimicrob. Agents Chemother.* *5*, 520–533.

Braun, V., Hancock, R.E.W., Hantke, K., and Hartmann, A. (1976). Functional organization of the outer membrane of *Escherichia coli*: Phage and colicin receptors as components of iron uptake systems. *J. Supramol. Struct.* *5*, 37–58.

Braun, V., Frenz, J., Hantke, K., and Schaller, K. (1980). Penetration of colicin M into cells of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *142*, 162–168.

Braun, V., Gaisser, S., Herrmann, C., Kampfenkel, K., Killmann, H., and Traub, I. (1996). Energy-coupled transport across the outer membrane of *Escherichia coli*: ExbB binds ExbD and TonB in vitro, and leucine 132 in the periplasmic region and aspartate 25 in the transmembrane region are important for ExbD activity. *J. Bacteriol.* *178*, 2836–2845.

Braun, V., Patzer, S.I., and Hantke, K. (2002). Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie* *84*, 365–380.

Brennan, P.J. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc. Edinb. Scotl.* *83*, 91–97.

Breukink, E., and de Kruijff, B. (2006). Lipid II as a target for antibiotics. *Nat. Rev. Drug Discov.* *5*, 321–332.

- Brötz, H., Bierbaum, G., Leopold, K., Reynolds, P.E., and Sahl, H.G. (1998). The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrob. Agents Chemother.* *42*, 154–160.
- Brown, E.D., Marquardt, J.L., Lee, J.P., Walsh, C.T., and Anderson, K.S. (1994). Detection and characterization of a phospholactoyl-enzyme adduct in the reaction catalyzed by UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase, MurZ. *Biochemistry (Mosc.)* *33*, 10638–10645.
- Brown, L., Wolf, J.M., Prados-Rosales, R., and Casadevall, A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* *13*, 620–630.
- Buchanan, S.K., Lukacik, P., Grizot, S., Ghirlando, R., Ali, M.M.U., Barnard, T.J., Jakes, K.S., Kienker, P.K., and Esser, L. (2007). Structure of colicin I receptor bound to the R-domain of colicin Ia: implications for protein import. *EMBO J.* *26*, 2594–2604.
- Bugg, T.D., and Brandish, P.E. (1994). From peptidoglycan to glycoproteins: common features of lipid-linked oligosaccharide biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* *119*, 255–262.
- Bupp, K., and van Heijenoort, J. (1993). The final step of peptidoglycan subunit assembly in *Escherichia coli* occurs in the cytoplasm. *J. Bacteriol.* *175*, 1841–1843.
- Butala, M., Sonjak, S., Kamenšek, S., Hodošček, M., Browning, D.F., Žgur-Bertok, D., and Busby, S.J.W. (2012). Double locking of an *Escherichia coli* promoter by two repressors prevents premature colicin expression and cell lysis. *Mol. Microbiol.* *86*, 129–139.
- Byczynski, B., Mizyed, S., and Berti, P.J. (2003). Nonenzymatic Breakdown of the Tetrahedral (α -Carboxyketol Phosphate) Intermediates of MurA and AroA, Two Carboxyvinyl Transferases. Protonation of Different Functional Groups Controls the Rate and Fate of Breakdown. *J. Am. Chem. Soc.* *125*, 12541–12550.
- Candela, T., and Fouet, A. (2006). Poly- γ -glutamate in bacteria. *Mol. Microbiol.* *60*, 1091–1098.
- Cantu, D.C., Chen, Y., and Reilly, P.J. (2010). Thioesterases: A new perspective based on their primary and tertiary structures. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *19*, 1281–1295.
- Carr, S., Walker, D., James, R., Kleanthous, C., and Hemmings, A.M. (2000). Inhibition of a ribosome-inactivating ribonuclease: the crystal structure of the cytotoxic domain of colicin E3 in complex with its immunity protein. *Struct. Lond. Engl.* *1993* *8*, 949–960.
- Cascales, E., Gavioli, M., Sturgis, J.N., and Llobès, R. (2000). Proton motive force drives the interaction of the inner membrane TolA and outer membrane pal proteins in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *38*, 904–915.
- Cascales, E., Llobès, R., and Sturgis, J.N. (2001). The TolQ-TolR proteins energize TolA and share homologies with the flagellar motor proteins MotA-MotB. *Mol. Microbiol.* *42*, 795–807.
- Cascales, E., Buchanan, S.K., Duché, D., Kleanthous, C., Llobès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., and Cavard, D. (2007). Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* *71*, 158–229.
- Cavard, D. (2004). Role of Cal, the colicin A lysis protein, in two steps of colicin A release and in the interaction with colicin A-porin complexes. *Microbiology* *150*, 3867–3875.
- Cavard, D., and Lazdunski, C. (1981). Involvement of BtuB and OmpF proteins in binding and uptake of colicin A. *FEMS Microbiol. Lett.* *12*, 311–316.

- Chapot-Chartier, M.-P., and Kulakauskas, S. (2014). Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microb. Cell Factories* *13*, S9.
- Chauleau, M., Mora, L., Serba, J., and de Zamaroczy, M. (2011). FtsH-dependent Processing of RNase Colicins D and E3 Means That Only the Cytotoxic Domains Are Imported into the Cytoplasm. *J. Biol. Chem.* *286*, 29397–29407.
- Christenson, J.K., and Gordon, D.M. (2009). Evolution of colicin BM plasmids: the loss of the colicin B activity gene. *Microbiol. Read. Engl.* *155*, 1645–1655.
- Chung, B.C., Zhao, J., Gillespie, R.A., Kwon, D.-Y., Guan, Z., Hong, J., Zhou, P., and Lee, S.-Y. (2013). Crystal Structure of MraY, an Essential Membrane Enzyme for Bacterial Cell Wall Synthesis. *Science* *341*, 1012.
- Clowes, R.C. (1965). TRANSMISSION AND ELIMINATION OF COLICIN FACTORS AND SOME ASPECTS OF IMMUNITY TO COLICIN EL IN EXCHERICHIA COLI. In ZENTRALBLATT FUR BAKTERIOLOGIE PARASITENKUNDE INFEKTIONSKRANHEITEN UND HYGIENE ABTEILUNG 1-ORIGINALE MEDIZINISCH HYGIENSCH E BAKTERIOLOGIE VIRUSFORSCHUNG UND PARASITOLOGIE, p. 152.
- Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* *3*, 777–788.
- Cotter, P.D., Ross, R.P., and Hill, C. (2013). Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 95–105.
- Coulton, J.W., Mason, P., and DuBow, M.S. (1983). Molecular cloning of the ferrichrome-iron receptor of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* *156*, 1315–1321.
- Courvalin, P. (2006). Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clin. Infect. Dis.* *42*, S25–S34.
- Crouvoisier, M., Mengin-Lecreulx, D., and van Heijenoort, J. (1999). UDP-N-acetylglucosamine:N-acetylmuramoyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl undecaprenol N-acetylglucosamine transferase from *Escherichia coli*: overproduction, solubilization, and purification. *FEBS Lett.* *449*, 289–292.
- Crouvoisier, M., Auger, G., Blanot, D., and Mengin-Lecreulx, D. (2007). Role of the amino acid invariants in the active site of MurG as evaluated by site-directed mutagenesis. *Biochimie* *89*, 1498–1508.
- Dagert, M., and Ehrlich, S.D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* *6*, 23–28.
- Dal Peraro, M., and van der Goot, F.G. (2016). Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. *Nat. Rev. Microbiol.* *14*, 77–92.
- van Dam, V., Sijbrandi, R., Kol, M., Swiezewska, E., de Kruijff, B., and Breukink, E. (2007). Transmembrane transport of peptidoglycan precursors across model and bacterial membranes. *Mol. Microbiol.* *64*, 1105–1114.
- Das, D., Hervé, M., Elsliger, M.-A., Kadam, R.U., Grant, J.C., Chiu, H.-J., Knuth, M.W., Klock, H.E., Miller, M.D., Godzik, A., et al. (2013). Structure and function of a novel LD-carboxypeptidase involved in peptidoglycan recycling. *J. Bacteriol.* *195*, 5555–5566.
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 6640–6645.

- Davis, R.W., Thomas, M., Cameron, J., St John, T.P., Scherer, S., and Padgett, R.A. (1980). Rapid DNA isolations for enzymatic and hybridization analysis. *Methods Enzymol.* *65*, 404–411.
- De Bernardez Clark, E., Schwarz, E., and Rudolph, R. (1999). [15] Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. In *Methods in Enzymology*, (Academic Press), pp. 217–236.
- Deprez, C., Blanchard, L., Guerlesquin, F., Gavioli, M., Simorre, J.-P., Lazdunski, C., Marion, D., and Llobès, R. (2002). Macromolecular Import into *Escherichia coli*: The TolA C-Terminal Domain Changes Conformation When Interacting with the Colicin A Toxin. *Biochemistry (Mosc.)* *41*, 2589–2598.
- Derouiche, R., Bénédicti, H., Lazzaroni, J.C., Lazdunski, C., and Llobès, R. (1995). Protein complex within *Escherichia coli* inner membrane. TolA N-terminal domain interacts with TolQ and TolR proteins. *J. Biol. Chem.* *270*, 11078–11084.
- Destoumieux-Garzón, D., Duquesne, S., Peduzzi, J., Goulard, C., Desmadril, M., Letellier, L., Rebuffat, S., and Boulanger, P. (2005). The iron–siderophore transporter FhuA is the receptor for the antimicrobial peptide microcin J25: role of the microcin Val11–Pro16 β -hairpin region in the recognition mechanism. *Biochem. J.* *389*, 869–876.
- Di Guilmi, A.M., Dessen, A., Dideberg, O., and Vernet, T. (2003). Functional Characterization of Penicillin-Binding Protein 1b from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* *185*, 1650–1658.
- Di Masi, D.R., White, J.C., Schnaitman, C.A., and Bradbeer, C. (1973). Transport of vitamin B12 in *Escherichia coli*: common receptor sites for vitamin B12 and the E colicins on the outer membrane of the cell envelope. *J. Bacteriol.* *115*, 506–513.
- Diep, D.B., and Nes, I.F. (2002). Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets* *3*, 107–122.
- Dodd, H.M., Horn, N., Chan, W.C., Giffard, C.J., Bycroft, B.W., Roberts, G.C., and Gasson, M.J. (1996). Molecular analysis of the regulation of nisin immunity. *Microbiol. Read. Engl.* *142 (Pt 9)*, 2385–2392.
- Doublet, P., van Heijenoort, J., Bohin, J.P., and Mengin-Lecreulx, D. (1993). The *murl* gene of *Escherichia coli* is an essential gene that encodes a glutamate racemase activity. *J. Bacteriol.* *175*, 2970–2979.
- Dreher, R., Braun, V., and Wittmann-Liebold, B. (1985). Functional domains of colicin M. *Arch. Microbiol.* *140*, 343–346.
- Drlica, K., Malik, M., Kerns, R.J., and Zhao, X. (2008). Quinolone-Mediated Bacterial Death. *Antimicrob. Agents Chemother.* *52*, 385–392.
- Dubuisson, J.F., Vianney, A., and Lazzaroni, J.C. (2002). Mutational Analysis of the TolA C-Terminal Domain of *Escherichia coli* and Genetic Evidence for an Interaction between TolA and TolB. *J. Bacteriol.* *184*, 4620–4625.
- Duché, D. (2007). Colicin E2 Is Still in Contact with Its Receptor and Import Machinery When Its Nuclease Domain Enters the Cytoplasm. *J. Bacteriol.* *189*, 4217–4222.
- Duché, D., Baty, D., Chartier, M., and Letellier, L. (1994a). Unfolding of colicin A during its translocation through the *Escherichia coli* envelope as demonstrated by disulfide bond engineering. *J. Biol. Chem.* *269*, 24820–24825.

- Duché, D., Parker, M.W., González-Mañas, J.M., Pattus, F., and Baty, D. (1994b). Uncoupled steps of the colicin A pore formation demonstrated by disulfide bond engineering. *J. Biol. Chem.* *269*, 6332–6339.
- Dunkel, S., P. Pulagam, L., Steinhoff, H.-J., and P. Klare, J. (2015). In vivo EPR on spin labeled colicin A reveals an oligomeric assembly of the pore-forming domain in *E. coli* membranes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* *17*, 4875–4878.
- Duquesne, S., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., and Rebuffat, S. (2007). Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat. Prod. Rep.* *24*, 708–734.
- Egan, A.J.F., and Vollmer, W. (2013). The physiology of bacterial cell division. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1277*, 8–28.
- Egan, A.J.F., Biboy, J., Veer, I. van't, Breukink, E., and Vollmer, W. (2015). Activities and regulation of peptidoglycan synthases. *Phil Trans R Soc B* *370*, 20150031.
- Eick-Helmerich, K., and Braun, V. (1989). Import of biopolymers into *Escherichia coli*: nucleotide sequences of the *exbB* and *exbD* genes are homologous to those of the *tolQ* and *tolR* genes, respectively. *J. Bacteriol.* *171*, 5117–5126.
- El Ghachi, M., Bouhss, A., Blanot, D., and Mengin-Lecreulx, D. (2004). The *bacA* Gene of *Escherichia coli* Encodes an Undecaprenyl Pyrophosphate Phosphatase Activity. *J. Biol. Chem.* *279*, 30106–30113.
- El Ghachi, M., Derbise, A., Bouhss, A., and Mengin-Lecreulx, D. (2005). Identification of Multiple Genes Encoding Membrane Proteins with Undecaprenyl Pyrophosphate Phosphatase (UppP) Activity in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *280*, 18689–18695.
- El Ghachi, M., Bouhss, A., Barreteau, H., Touzé, T., Auger, G., Blanot, D., and Mengin-Lecreulx, D. (2006). Colicin M exerts its bacteriolytic effect via enzymatic degradation of undecaprenyl phosphate-linked peptidoglycan precursors. *J. Biol. Chem.* *281*, 22761–22772.
- El Zoeiby, A., Sanschagrín, F., and Levesque, R.C. (2003). Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Mol. Microbiol.* *47*, 1–12.
- Elkins, P., Bunker, A., Cramer, W.A., and Stauffacher, C.V. (1997). A mechanism for toxin insertion into membranes is suggested by the crystal structure of the channel-forming domain of colicin E1. *Struct. Lond. Engl.* *1993* *5*, 443–458.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., and Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *66*, 486–501.
- Endriss, F., and Braun, V. (2004). Loop deletions indicate regions important for FhuA transport and receptor functions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *186*, 4818–4823.
- Errington, J. (2017). Cell wall-deficient, L-form bacteria in the 21st century: a personal perspective. *Biochem. Soc. Trans.* *45*, 287–295.
- Eschenburg, S., Priestman, M., and Schönbrunn, E. (2005). Evidence that the fosfomycin target Cys115 in UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) is essential for product release. *J. Biol. Chem.* *280*, 3757–3763.

- Espeset, D., Duché, D., Baty, D., and Géli, V. (1996). The channel domain of colicin A is inhibited by its immunity protein through direct interaction in the *Escherichia coli* inner membrane. *EMBO J.* *15*, 2356–2364.
- Eveland, S.S., Pompliano, D.L., and Anderson, M.S. (1997). Conditionally lethal *Escherichia coli* murein mutants contain point defects that map to regions conserved among murein and folyl poly-gamma-glutamate ligases: identification of a ligase superfamily. *Biochemistry (Mosc.)* *36*, 6223–6229.
- Fan, J., Jiang, D., Zhao, Y., Liu, J., and Zhang, X.C. (2014). Crystal structure of lipid phosphatase *Escherichia coli* phosphatidylglycerophosphate phosphatase B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 7636–7640.
- Fay, A., and Dworkin, J. (2009). *Bacillus subtilis* Homologs of MviN (MurJ), the Putative *Escherichia coli* Lipid II Flippase, Are Not Essential for Growth. *J. Bacteriol.* *191*, 6020–6028.
- FDA (2015). GRAS Notices, GRN No 593.
- FDA (2017). GRAS Notices, GRN No 676.
- Ferber, D.M., and Brubaker, R.R. (1979). Mode of action of pesticin: N-acetylglucosaminidase activity. *J. Bacteriol.* *139*, 495–501.
- Ferguson, A.D., and Deisenhofer, J. (2004). Metal import through microbial membranes. *Cell* *116*, 15–24.
- Figueiredo, T.A., Sobral, R.G., Ludovice, A.M., Almeida, J.M.F. de, Bui, N.K., Vollmer, W., de Lencastre, H., and Tomasz, A. (2012). Identification of genetic determinants and enzymes involved with the amidation of glutamic acid residues in the peptidoglycan of *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog.* *8*, e1002508.
- Fischer, E., Günter, K., and Braun, V. (1989). Involvement of ExbB and TonB in transport across the outer membrane of *Escherichia coli*: phenotypic complementation of *exb* mutants by overexpressed *tonB* and physical stabilization of TonB by ExbB. *J. Bacteriol.* *171*, 5127–5134.
- Fiser, A., Filipe, S.R., and Tomasz, A. (2003). Cell wall branches, penicillin resistance and the secrets of the MurM protein. *Trends Microbiol.* *11*, 547–553.
- Fleming, A. (1929). On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* *10*, 226–236.
- Floquet, N., Mouilleron, S., Daher, R., Maigret, B., Badet, B., and Badet-Denisot, M.-A. (2007). Ammonia channeling in bacterial glucosamine-6-phosphate synthase (GlmS): molecular dynamics simulations and kinetic studies of protein mutants. *FEBS Lett.* *581*, 2981–2987.
- Floss, H.G., and Yu, T.-W. (2005). Rifamycin-mode of action, resistance, and biosynthesis. *Chem. Rev.* *105*, 621–632.
- Foster, S.J., and Popham, D.L. (2002). Structure and synthesis of cell wall, spore cortex, teichoic acids, S-layers, and capsules. In *Bacillus Subtilis and Its Closest Relatives*, (American Society of Microbiology), pp. 21–41.

- Fotheringham, I.G., Bledig, S.A., and Taylor, P.P. (1998). Characterization of the Genes Encoding d-Amino Acid Transaminase and Glutamate Racemase, Two d-Glutamate Biosynthetic Enzymes of *Bacillus sphaericus* ATCC 10208. *J. Bacteriol.* *180*, 4319.
- Fraipont, C., Sapunaric, F., Zervosen, A., Auger, G., Devreese, B., Lioux, T., Blanot, D., Mengin-Lecreulx, D., Herdewijn, P., Van Beeumen, J., et al. (2006). Glycosyl transferase activity of the *Escherichia coli* penicillin-binding protein 1b: specificity profile for the substrate. *Biochemistry (Mosc.)* *45*, 4007–4013.
- Fredericq, P., and Betz-Bareau, M. (1953). [Genetic transfer of colicinogenic property in *E. coli*]. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* *147*, 1110–1112.
- Frenette, M., Bénédicti, H., Bernadac, A., Baty, D., and Lazdunski, C. (1991). Construction, expression and release of hybrid colicins. *J. Mol. Biol.* *217*, 421–428.
- Fumeaux, C., and Bernhardt, T.G. (2017). Identification of MupP as a New Peptidoglycan Recycling Factor and Antibiotic Resistance Determinant in *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio* *8*, e00102-17.
- Galperin, M.Y., and Koonin, E.V. (1997). A diverse superfamily of enzymes with ATP-dependent carboxylate-amine/thiol ligase activity. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *6*, 2639.
- Gan, L., Chen, S., and Jensen, G.J. (2008). Molecular organization of Gram-negative peptidoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 18953.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., and Bairoch, A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* *31*, 3784–3788.
- Gehring, A.M., Lees, W.J., Mindiola, D.J., Walsh, C.T., and Brown, E.D. (1996). Acetyltransfer precedes uridylyltransfer in the formation of UDP-N-acetylglucosamine in separable active sites of the bifunctional GlmU protein of *Escherichia coli*. *Biochemistry (Mosc.)* *35*, 579–585.
- Geli, V., and Lazdunski, C. (1992). An alpha-helical hydrophobic hairpin as a specific determinant in protein-protein interaction occurring in *Escherichia coli* colicin A and B immunity systems. *J. Bacteriol.* *174*, 6432–6437.
- Gérard, F., Brooks, M.A., Barreteau, H., Touzé, T., Graille, M., Bouhss, A., Blanot, D., van Tilbeurgh, H., and Mengin-Lecreulx, D. (2011). X-ray structure and site-directed mutagenesis analysis of the *Escherichia coli* colicin M immunity protein. *J. Bacteriol.* *193*, 205–214.
- Germon, P., Ray, M.C., Vianney, A., and Lazzaroni, J.C. (2001). Energy-dependent conformational change in the TolA protein of *Escherichia coli* involves its N-terminal domain, TolQ, and TolR. *J. Bacteriol.* *183*, 4110–4114.
- Ghequire, M.G.K., and De Mot, R. (2014). Ribosomally encoded antibacterial proteins and peptides from *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol. Rev.* *38*, 523–568.
- Ghequire, M.G.K., and De Mot, R. (2015). Distinct colicin M-like bacteriocin-immunity pairs in *Burkholderia*. *Sci. Rep.* *5*, 17368.
- Ghequire, M.G.K., Kemland, L., Anoz-Carbonell, E., Buchanan, S.K., and De Mot, R. (2017a). A Natural Chimeric *Pseudomonas* Bacteriocin with Novel Pore-Forming Activity Parasitizes the Ferrichrome Transporter. *MBio* *8*.

- Ghequire, M.G.K., Kemland, L., and De Mot, R. (2017b). Novel Immunity Proteins Associated with Colicin M-like Bacteriocins Exhibit Promiscuous Protection in *Pseudomonas*. *Front. Microbiol.* *8*, 93.
- Gillor, O., Vriezen, J.A.C., and Riley, M.A. (2008). The role of SOS boxes in enteric bacteriocin regulation. *Microbiol. Read. Engl.* *154*, 1783–1792.
- Goemaere, E.L., Cascales, E., and Lloubès, R. (2007). Mutational Analyses Define Helix Organization and Key Residues of a Bacterial Membrane Energy-transducing Complex. *J. Mol. Biol.* *366*, 1424–1436.
- Goffin, C., and Ghuysen, J.-M. (1998). Multimodular Penicillin-Binding Proteins: An Enigmatic Family of Orthologs and Paralogs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *62*, 1079.
- Goodell, E.W. (1985). Recycling of murein by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *163*, 305–310.
- Graille, M., Mora, L., Buckingham, R.H., van Tilbeurgh, H., and de Zamaroczy, M. (2004). Structural inhibition of the colicin D tRNase by the tRNA-mimicking immunity protein. *EMBO J.* *23*, 1474–1482.
- Gratia, A. (1925). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *C R Soc Biol Paris* *93*:1040-1041.
- Gray, A.N., Egan, A.J.F., Van't Veer, I.L., Verheul, J., Colavin, A., Koumoutsis, A., Biboy, J., Altelaar, A.F.M., Damen, M.J., Huang, K.C., et al. (2015). Coordination of peptidoglycan synthesis and outer membrane constriction during *Escherichia coli* cell division. *ELife* *4*.
- Green, E.R., and Meccas, J. (2016). Bacterial Secretion Systems – An overview. *Microbiol. Spectr.* *4*.
- Griko, Y.V., Zakharov, S.D., and Cramer, W.A. (2000). Structural stability and domain organization of colicin E1. *J. Mol. Biol.* *302*, 941–953.
- Grinter, R., Milner, J., and Walker, D. (2012a). Ferredoxin containing bacteriocins suggest a novel mechanism of iron uptake in *Pectobacterium* spp. *PLoS One* *7*, e33033.
- Grinter, R., Roszak, A.W., Cogdell, R.J., Milner, J.J., and Walker, D. (2012b). The crystal structure of the lipid II-degrading bacteriocin syringacin M suggests unexpected evolutionary relationships between colicin M-like bacteriocins. *J. Biol. Chem.* *287*, 38876–38888.
- Grinter, R., Milner, J., and Walker, D. (2013). Beware of proteins bearing gifts: protein antibiotics that use iron as a Trojan horse. *FEMS Microbiol. Lett.* *338*, 1–9.
- Grinter, R., Josts, I., Zeth, K., Roszak, A.W., McCaughey, L.C., Cogdell, R.J., Milner, J.J., Kelly, S.M., Byron, O., and Walker, D. (2014). Structure of the atypical bacteriocin pectocin M2 implies a novel mechanism of protein uptake. *Mol. Microbiol.*
- Grinter, R., Josts, I., Mosbahi, K., Roszak, A.W., Cogdell, R.J., Bonvin, A.M.J.J., Milner, J.J., Kelly, S.M., Byron, O., Smith, B.O., et al. (2016). Structure of the bacterial plant-ferredoxin receptor Fusa. *Nat. Commun.* *7*, 13308.
- Gross, P., and Braun, V. (1996). Colicin M is inactivated during import by its immunity protein. *Mol. Gen. Genet. Ger.*
- Gupta, R., Lavollay, M., Mainardi, J.-L., Arthur, M., Bishai, W.R., and Lamichhane, G. (2010). The *Mycobacterium tuberculosis* protein LdtMt2 is a nonclassical transpeptidase required for virulence and resistance to amoxicillin. *Nat. Med.* *16*, 466–469.

- Guterman, S.K. (1973). Colicin B: mode of action and inhibition by enterochelin. *J. Bacteriol.* *114*, 1217–1224.
- Ha, S., Walker, D., Shi, Y., and Walker, S. (2000). The 1.9 Å crystal structure of Escherichia coli MurG, a membrane-associated glycosyltransferase involved in peptidoglycan biosynthesis. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *9*, 1045–1052.
- Hall, P.J., and Brubaker, R.R. (1978). Pesticin-dependent generation of somotically stable spheroplast-like structures. *J. Bacteriol.* *136*, 786–789.
- Hannauer, M., Barda, Y., Mislin, G.L.A., Shanzer, A., and Schalk, I.J. (2010). The ferrichrome uptake pathway in Pseudomonas aeruginosa involves an iron release mechanism with acylation of the siderophore and recycling of the modified desferrichrome. *J. Bacteriol.* *192*, 1212–1220.
- Hansen, J.N. (1994). Nisin as a model food preservative. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* *34*, 69–93.
- Hardy, K.G., Meynell, G.G., Dowman, J.E., and Spratt, B.G. (1973). Two major groups of colicin factors: their evolutionary significance. *Mol. Gen. Genet. MGG* *125*, 217–230.
- Harkness, R.E., and Braun, V. (1989a). Inhibition of lipopolysaccharide O-antigen synthesis by colicin M. *J. Biol. Chem.* *264*, 14716–14722.
- Harkness, R.E., and Braun, V. (1989b). Colicin M inhibits peptidoglycan biosynthesis by interfering with lipid carrier recycling. *J. Biol. Chem.* *264*, 6177–6182.
- Harkness, R.E., and Braun, V. (1990). Colicin M is only bactericidal when provided from outside the cell. *Mol. Gen. Genet. MGG* *222*, 37–40.
- Harz, H., Burgdorf, K., and Höltje, J.V. (1990). Isolation and separation of the glycan strands from murein of Escherichia coli by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* *190*, 120–128.
- Hasper, H.E., de Kruijff, B., and Breukink, E. (2004). Assembly and stability of nisin-lipid II pores. *Biochemistry (Mosc.)* *43*, 11567–11575.
- Healy, V.L., Mullins, L.S., Li, X., Hall, S.E., Raushel, F.M., and Walsh, C.T. (2000). d-Ala-d-X ligases: evaluation of d-alanyl phosphate intermediate by MIX, PIX and rapid quench studies. *Chem. Biol.* *7*, 505–514.
- van Heijenoort, J. (2001). Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Nat. Prod. Rep.* *18*, 503–519.
- van Heijenoort, J. (2011). Peptidoglycan Hydrolases of Escherichia coli. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* *75*, 636–663.
- van Heijenoort, Y., Gómez, M., Derrien, M., Ayala, J., and van Heijenoort, J. (1992). Membrane intermediates in the peptidoglycan metabolism of Escherichia coli: possible roles of PBP 1b and PBP 3. *J. Bacteriol.* *174*, 3549–3557.
- Helbig, S., and Braun, V. (2011). Mapping Functional Domains of Colicin M. *J. Bacteriol.* *193*, 815–821.
- Helbig, S., Patzer, S.I., Schiene-Fischer, C., Zeth, K., and Braun, V. (2011). Activation of Colicin M by the FkpA Prolyl Cis-Trans Isomerase/Chaperone. *J. Biol. Chem.* *286*, 6280–6290.

- Helbig, S., Hantke, K., Ammelburg, M., and Braun, V. (2012). CbrA is a flavin adenine dinucleotide protein that modifies the Escherichia coli outer membrane and confers specific resistance to Colicin M. *J. Bacteriol.* *194*, 4894–4903.
- Hendlin, D., Stapley, E.O., Jackson, M., Wallick, H., Miller, A.K., Wolf, F.J., Miller, T.W., Chaiet, L., Kahan, F.M., Foltz, E.L., et al. (1969). Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of streptomyces. *Science* *166*, 122–123.
- Heng, N.C.K., Wescombe, P.A., Burton, J.P., Jack, R.W., and Tagg, J.R. (2007). The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In *Bacteriocins*, P.D.M.A. Riley, and D.M.A. Chavan, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 45–92.
- Hervé, M., Boniface, A., Gobec, S., Blanot, D., and Mengin-Lecreulx, D. (2007). Biochemical Characterization and Physiological Properties of Escherichia coli UDP-N-Acetylmuramate:l-Alanyl- γ -d-Glutamyl-meso-Diaminopimelate Ligase. *J. Bacteriol.* *189*, 3987–3995.
- van Heusden, H.E., de Kruijff, B., and Breukink, E. (2002). Lipid II induces a transmembrane orientation of the pore-forming peptide lantibiotic nisin. *Biochemistry (Mosc.)* *41*, 12171–12178.
- Higgs, P.I., Myers, P.S., and Postle, K. (1998). Interactions in the TonB-dependent energy transduction complex: ExbB and ExbD form homomultimers. *J. Bacteriol.* *180*, 6031–6038.
- Hilsenbeck, J.L., Park, H., Chen, G., Youn, B., Postle, K., and Kang, C. (2004). Crystal structure of the cytotoxic bacterial protein colicin B at 2.5 Å resolution. *Mol. Microbiol.* *51*, 711–720.
- Hofinger, C., Karch, H., and Schmidt, H. (1998). Structure and Function of Plasmid pColD157 of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157 and Its Distribution among Strains from Patients with Diarrhea and Hemolytic-Uremic Syndrome. *J. Clin. Microbiol.* *36*, 24–29.
- Höltje, J.-V. (1998). Growth of the Stress-Bearing and Shape-Maintaining Murein Sacculus of Escherichia coli. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *62*, 181.
- Höltje, J.V., and Tuomanen, E.I. (1991). The murein hydrolases of Escherichia coli: properties, functions and impact on the course of infections in vivo. *J. Gen. Microbiol.* *137*, 441–454.
- Hooper, D.C., and Jacoby, G.A. (2015). Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1354*, 12–31.
- Housden, N.G., Loftus, S.R., Moore, G.R., James, R., and Kleanthous, C. (2005). Cell entry mechanism of enzymatic bacterial colicins: porin recruitment and the thermodynamics of receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 13849–13854.
- Hsieh, S.Y., Ko, T.P., Tseng, M.Y., Ku, W., Chak, K.F., and Yuan, H.S. (1997). A novel role of ImmE7 in the autoregulatory expression of the ColE7 operon and identification of possible RNase active sites in the crystal structure of dimeric ImmE7. *EMBO J.* *16*, 1444–1454.
- Hsu, S.-T.D., Breukink, E., Tischenko, E., Lutters, M.A.G., de Kruijff, B., Kaptein, R., Bonvin, A.M.J.J., and van Nuland, N.A.J. (2004). The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 963–967.
- Hu, Y., Chen, L., Ha, S., Gross, B., Falcone, B., Walker, D., Mokhtarzadeh, M., and Walker, S. (2003). Crystal structure of the MurG:UDP-GlcNAc complex reveals common structural principles of a superfamily of glycosyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 845–849.

- Hullmann, J., Patzer, S.I., Römer, C., Hantke, K., and Braun, V. (2008). Periplasmic chaperone FkpA is essential for imported colicin M toxicity. *Mol. Microbiol.* *69*, 926–937.
- Ikeda, M., Wachi, M., Jung, H.K., Ishino, F., and Matsushashi, M. (1991). The *Escherichia coli* mraY gene encoding UDP-N-acetylmuramoyl-pentapeptide: undecaprenyl-phosphate phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide transferase. *J. Bacteriol.* *173*, 1021.
- Inoue, A., Murata, Y., Takahashi, H., Tsuji, N., Fujisaki, S., and Kato, J. (2008). Involvement of an Essential Gene, mviN, in Murein Synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *190*, 7298.
- Ito, K., and Akiyama, Y. (2005). Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annu. Rev. Microbiol.* *59*, 211–231.
- Jack, R.W., Tagg, J.R., and Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* *59*, 171–200.
- Jakes, K.S. (2012). Translocation trumps receptor binding in colicin entry into *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans.* *40*, 1443–1448.
- Jakes, K.S. (2014). DARING TO BE DIFFERENT: COLICIN N FINDS ANOTHER WAY. *Mol. Microbiol.* *92*, 435–439.
- Jakes, K.S., and Cramer, W.A. (2012). Border crossings: colicins and transporters. *Annu. Rev. Genet.* *46*, 209–231.
- Jakes, K.S., and Finkelstein, A. (2010). THE COLICIN Ia RECEPTOR, Cir, IS ALSO THE TRANSLOCATOR FOR COLICIN Ia. *Mol. Microbiol.* *75*, 567–578.
- Jakes, K., Zinder, N.D., and Boon, T. (1974). Purification and Properties of Colicin E3 Immunity Protein. *J. Biol. Chem.* *249*, 438–444.
- James, R., Kleanthous, C., and Moore, G.R. (1996). The biology of E colicins: paradigms and paradoxes. *Microbiol. Read. Engl.* *142 (Pt 7)*, 1569–1580.
- James, R., Penfold, C.N., Moore, G.R., and Kleanthous, C. (2002). Killing of *E. coli* cells by E group nuclease colicins. *Biochimie* *84*, 381–389.
- Johnson, C.L., Ridley, H., Marchetti, R., Silipo, A., Griffin, D.C., Crawford, L., Bonev, B., Molinaro, A., and Lakey, J.H. (2014). The antibacterial toxin colicin N binds to the inner core of lipopolysaccharide and close to its translocator protein. *Mol. Microbiol.* *92*, 440–452.
- Jolly, L., Ferrari, P., Blanot, D., Van Heijenoort, J., Fassy, F., and Mengin-Lecreulx, D. (1999). Reaction mechanism of phosphoglucosamine mutase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* *262*, 202–210.
- Jolly, L., Pompeo, F., van Heijenoort, J., Fassy, F., and Mengin-Lecreulx, D. (2000). Autophosphorylation of phosphoglucosamine mutase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *182*, 1280–1285.
- Journet, L., Bouveret, E., Rigal, A., Lloubes, R., Lazdunski, C., and Bénédicti, H. (2001). Import of colicins across the outer membrane of *Escherichia coli* involves multiple protein interactions in the periplasm. *Mol. Microbiol.* *42*, 331–344.
- Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *66*, 125–132.

- Kageyama, M., Kobayashi, M., Sano, Y., and Masaki, H. (1996). Construction and characterization of pyocin-colicin chimeric proteins. *J. Bacteriol.* *178*, 103–110.
- Kamenšek, S., and Žgur-Bertok, D. (2013). Global transcriptional responses to the bacteriocin colicin M in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol.* *13*, 42.
- Kamio, Y., and Nikaido, H. (1976). Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: accessibility of phospholipid head groups to phospholipase c and cyanogen bromide activated dextran in the external medium. *Biochemistry (Mosc.)* *15*, 2561–2570.
- Karlsson, M., Hannavy, K., and Higgins, C.F. (1993). A sequence-specific function for the N-terminal signal-like sequence of the TonB protein. *Mol. Microbiol.* *8*, 379–388.
- Kato, J., Fujisaki, S., Nakajima, K., Nishimura, Y., Sato, M., and Nakano, A. (1999). The *Escherichia coli* Homologue of Yeast Rer2, a Key Enzyme of Dolichol Synthesis, Is Essential for Carrier Lipid Formation in Bacterial Cell Wall Synthesis. *J. Bacteriol.* *181*, 2733–2738.
- Kim, M.-K., Cho, M.K., Song, H.-E., Kim, D., Park, B.-H., Lee, J.H., Kang, G.B., Kim, S.H., Im, Y.J., Lee, D.-S., et al. (2007). Crystal structure of UDP-N-acetylenolpyruvylglucosamine reductase (MurB) from *Thermus caldophilus*. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* *66*, 751–754.
- Kim, Y.C., Tarr, A.W., and Penfold, C.N. (2014). Colicin import into *E. coli* cells: a model system for insights into the import mechanisms of bacteriocins. *Biochim. Biophys. Acta* *1843*, 1717–1731.
- Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* *12*, 39–85.
- Kleanthous, C. (2010). Swimming against the tide: progress and challenges in our understanding of colicin translocation. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 843–848.
- Kleanthous, C., and Walker, D. (2001). Immunity proteins: enzyme inhibitors that avoid the active site. *Trends Biochem. Sci.* *26*, 624–631.
- Kleanthous, C., Hemmings, A.M., Moore, G.R., and James, R. (1998). Immunity proteins and their specificity for endonuclease colicins: telling right from wrong in protein–protein recognition. *Mol. Microbiol.* *28*, 227–233.
- Klein, A., Wojdyla, J.A., Joshi, A., Josts, I., McCaughey, L.C., Housden, N.G., Kaminska, R., Byron, O., Walker, D., and Kleanthous, C. (2016). Structural and biophysical analysis of nuclease protein antibiotics. *Biochem. J.* *473*, 2799–2812.
- Köck, J., Olschläger, T., Kamp, R.M., and Braun, V. (1987). Primary structure of colicin M, an inhibitor of murein biosynthesis. *J. Bacteriol.* *169*, 3358–3361.
- Ködding, J., Killig, F., Polzer, P., Howard, S.P., Diederichs, K., and Welte, W. (2005). Crystal Structure of a 92-Residue C-terminal Fragment of TonB from *Escherichia coli* Reveals Significant Conformational Changes Compared to Structures of Smaller TonB Fragments. *J. Biol. Chem.* *280*, 3022–3028.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., and Collins, J.J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 423–435.
- Konopka, J.B. (2012). N-Acetylglucosamine Functions in Cell Signaling. *Scientifica* *2012*, e489208.

- de Kruijff, B., van Dam, V., and Breukink, E. (2008). Lipid II: A central component in bacterial cell wall synthesis and a target for antibiotics. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *79*, 117–121.
- Kuk, A.C.Y., Mashalidis, E.H., and Lee, S.-Y. (2017). Crystal structure of the MOP flippase MurJ in an inward-facing conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *24*, 171–176.
- Kurusu, G., Zakharov, S.D., Zhalnina, M.V., Bano, S., Eroukova, V.Y., Rokitskaya, T.I., Antonenko, Y.N., Wiener, M.C., and Cramer, W.A. (2003). The structure of BtuB with bound colicin E3 R-domain implies a translocon. *Nat. Struct. Biol.* *10*, 948–954.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.
- Lahiri, S.D., Zhang, G., Dunaway-Mariano, D., and Allen, K.N. (2002). Caught in the act: the structure of phosphorylated beta-phosphoglucomutase from *Lactococcus lactis*. *Biochemistry (Mosc.)* *41*, 8351–8359.
- Lahey, J.H., Duche, D., González-Mañás, J.-M., Baty, D., and Pattus, F. (1993). Fluorescence Energy Transfer Distance Measurements. *J. Mol. Biol.* *230*, 1055–1067.
- Lambert, T. (2012). Antibiotics that affect the ribosome. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* *31*, 57–64.
- Lancaster, L.E., Savelsbergh, A., Kleanthous, C., Wintermeyer, W., and Rodnina, M.V. (2008). Colicin E3 cleavage of 16S rRNA impairs decoding and accelerates tRNA translocation on *Escherichia coli* ribosomes. *Mol. Microbiol.* *69*, 390–401.
- Larsen, R.A., Thomas, M.G., Wood, G.E., and Postle, K. (1994). Partial suppression of an *Escherichia coli* TonB transmembrane domain mutation ($\Delta V17$) by a missense mutation in ExbB. *Mol. Microbiol.* *13*, 627–640.
- Larsen, R.A., Thomas, M.G., and Postle, K. (1999). Protonmotive force, ExbB and ligand-bound FepA drive conformational changes in TonB. *Mol. Microbiol.* *31*, 1809–1824.
- Lavollay, M., Arthur, M., Fourgeaud, M., Dubost, L., Marie, A., Veziris, N., Blanot, D., Gutmann, L., and Mainardi, J.-L. (2008). The Peptidoglycan of Stationary-Phase *Mycobacterium tuberculosis* Predominantly Contains Cross-Links Generated by l,d-Transpeptidation. *J. Bacteriol.* *190*, 4360–4366.
- Lazzaroni, J.C., Vianney, A., Popot, J.L., Bénédicti, H., Samatey, F., Lazdunski, C., Portalier, R., and Géli, V. (1995). Transmembrane alpha-helix interactions are required for the functional assembly of the *Escherichia coli* Tol complex. *J. Mol. Biol.* *246*, 1–7.
- Levefaudes, M., Patin, D., de Sousa-d’Auria, C., Chami, M., Blanot, D., Hervé, M., Arthur, M., Houssin, C., and Mengin-Lecreulx, D. (2015). Diaminopimelic Acid Amidation in Corynebacteriales: NEW INSIGHTS INTO THE ROLE OF LtsA IN PEPTIDOGLYCAN MODIFICATION. *J. Biol. Chem.* *290*, 13079–13094.
- Levy, S.B., and Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* *10*, S122–S129.
- Lewis, K. (2013). Platforms for antibiotic discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* *12*, 371–387.

- Li, W., Keeble, A.H., Giffard, C., James, R., Moore, G.R., and Kleanthous, C. (2004). Highly discriminating protein-protein interaction specificities in the context of a conserved binding energy hotspot. *J. Mol. Biol.* *337*, 743–759.
- Lindeberg, M., and Cramer, W.A. (2001). Identification of Specific Residues in Colicin E1 Involved in Immunity Protein Recognition. *J. Bacteriol.* *183*, 2132–2136.
- Little, J.W., and Mount, D.W. (1982). The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* *29*, 11–22.
- Little, J.W., Edmiston, S.H., Pacelli, L.Z., and Mount, D.W. (1980). Cleavage of the *Escherichia coli* *lexA* protein by the *recA* protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 3225–3229.
- Llobès, R., Granger-Schnarr, M., Lazdunski, C., and Schnarr, M. (1988). *LexA* repressor induces operator-dependent DNA bending. *J. Mol. Biol.* *204*, 1049–1054.
- Llobès, R., Granger-Schnarr, M., Lazdunski, C., and Schnarr, M. (1991). Interaction of a regulatory protein with a DNA target containing two overlapping binding sites. *J. Biol. Chem.* *266*, 2303–2312.
- Lo, M.C., Helm, J.S., Sarngadharan, G., Pelczer, I., and Walker, S. (2001). A new structure for the substrate-binding antibiotic ramoplanin. *J. Am. Chem. Soc.* *123*, 8640–8641.
- Lovering, A.L., de Castro, L.H., Lim, D., and Strynadka, N.C.J. (2007). Structural insight into the transglycosylation step of bacterial cell-wall biosynthesis. *Science* *315*, 1402–1405.
- Lowe, P.N., and Beechey, R.B. (1982a). Interactions between the mitochondrial adenosinetriphosphatase and periodate-oxidized adenosine 5'-triphosphate, an affinity label for adenosine 5'-triphosphate binding sites. *Biochemistry (Mosc.)* *21*, 4073–4082.
- Lowe, P.N., and Beechey, R.B. (1982b). Preparation, structure, and properties of periodate-oxidised ATP, a potential affinity-labelling reagent. *Bioorganic Chem.* *11*, 55–71.
- Lowe, P.N., Baum, H., and Beechey, R.B. (1979). Preparation and chemical properties of periodate-oxidized adenosine triphosphate and some related compounds [proceedings]. *Biochem. Soc. Trans.* *7*, 1131–1133.
- Lukacik, P., Barnard, T.J., Keller, P.W., Chaturvedi, K.S., Seddiki, N., Fairman, J.W., Noinaj, N., Kirby, T.L., Henderson, J.P., Steven, A.C., et al. (2012). Structural engineering of a phage lysin that targets gram-negative pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 9857–9862.
- Luna-Chávez, C., Lin, Y.-L., and Huang, R.H. (2006). Molecular basis of inhibition of the ribonuclease activity in colicin E5 by its cognate immunity protein. *J. Mol. Biol.* *358*, 571–579.
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *18*, 268–281.
- Magnet, S., Bellais, S., Dubost, L., Fourgeaud, M., Mainardi, J.-L., Petit-Frère, S., Marie, A., Mengin-Lecreulx, D., Arthur, M., and Gutmann, L. (2007). Identification of the *l,d*-Transpeptidases Responsible for Attachment of the Braun Lipoprotein to *Escherichia coli* Peptidoglycan. *J. Bacteriol.* *189*, 3927.

- Magnet, S., Dubost, L., Marie, A., Arthur, M., and Gutmann, L. (2008). Identification of the I,d-Transpeptidases for Peptidoglycan Cross-Linking in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *190*, 4782–4785.
- Mahapatra, S., Yagi, T., Belisle, J.T., Espinosa, B.J., Hill, P.J., McNeil, M.R., Brennan, P.J., and Crick, D.C. (2005). Mycobacterial lipid II is composed of a complex mixture of modified muramyl and peptide moieties linked to decaprenyl phosphate. *J. Bacteriol.* *187*, 2747–2757.
- Mainardi, J.-L., Morel, V., Fourgeaud, M., Cremniter, J., Blanot, D., Legrand, R., Frehel, C., Arthur, M., Van Heijenoort, J., and Gutmann, L. (2002). Balance between two transpeptidation mechanisms determines the expression of beta-lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *J. Biol. Chem.* *277*, 35801–35807.
- Mainardi, J.-L., Fourgeaud, M., Hugonnet, J.-E., Dubost, L., Brouard, J.-P., Ouazzani, J., Rice, L.B., Gutmann, L., and Arthur, M. (2005). A novel peptidoglycan cross-linking enzyme for a beta-lactam-resistant transpeptidation pathway. *J. Biol. Chem.* *280*, 38146–38152.
- Mainardi, J.-L., Villet, R., Bugg, T.D., Mayer, C., and Arthur, M. (2008). Evolution of peptidoglycan biosynthesis under the selective pressure of antibiotics in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* *32*, 386–408.
- Manat, G., Roure, S., Auger, R., Bouhss, A., Barreteau, H., Mengin-Lecreulx, D., and Touzé, T. (2014). Deciphering the Metabolism of Undecaprenyl-Phosphate: The Bacterial Cell-Wall Unit Carrier at the Membrane Frontier. *Microb. Drug Resist. Larchmt. N 20*, 199–214.
- Manat, G., El Ghachi, M., Auger, R., Baouche, K., Olatunji, S., Kerff, F., Touzé, T., Mengin-Lecreulx, D., and Bouhss, A. (2015). Membrane Topology and Biochemical Characterization of the *Escherichia coli* BacA Undecaprenyl-Pyrophosphate Phosphatase. *PLoS One* *10*, e0142870.
- Mankovich, J.A., Hsu, C.H., and Konisky, J. (1986). DNA and amino acid sequence analysis of structural and immunity genes of colicins Ia and Ib. *J. Bacteriol.* *168*, 228–236.
- Markovski, M., Bohrhunter, J.L., Lupoli, T.J., Uehara, T., Walker, S., Kahne, D.E., and Bernhardt, T.G. (2016). Cofactor bypass variants reveal a conformational control mechanism governing cell wall polymerase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 4788–4793.
- Marshall, B.M., and Levy, S.B. (2011). Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clin. Microbiol. Rev.* *24*, 718–733.
- Martin, N.I., Sprules, T., Carpenter, M.R., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., and Vederas, J.C. (2004). Structural characterization of lacticin 3147, a two-peptide lantibiotic with synergistic activity. *Biochemistry (Mosc.)* *43*, 3049–3056.
- Matsushashi, M., Wachi, M., and Ishino, F. (1990). Machinery for cell growth and division: penicillin-binding proteins and other proteins. *Res. Microbiol.* *141*, 89–103.
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2007). Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* *40*, 658–674.
- Meeske, A.J., Sham, L.-T., Kimsey, H., Koo, B.-M., Gross, C.A., Bernhardt, T.G., and Rudner, D.Z. (2015). MurJ and a novel lipid II flippase are required for cell wall biogenesis in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 6437.

- Meeske, A.J., Riley, E.P., Robins, W.P., Uehara, T., Mekelanos, J.J., Kahne, D., Walker, S., Kruse, A.C., Bernhardt, T.G., and Rudner, D.Z. (2016). SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases. *Nature* 537, 634.
- Mehra-Chaudhary, R., Mick, J., and Beamer, L.J. (2011a). Crystal structure of *Bacillus anthracis* phosphoglucosamine mutase, an enzyme in the peptidoglycan biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.* 193, 4081–4087.
- Mehra-Chaudhary, R., Mick, J., Tanner, J.J., and Beamer, L.J. (2011b). Quaternary structure, conformational variability and global motions of phosphoglucosamine mutase. *FEBS J.* 278, 3298–3307.
- Mende, J., and Braun, V. (1990). Import-defective colicin B derivatives mutated in the TonB box. *Mol. Microbiol.* 4, 1523–1533.
- Meng, G., Surana, N.K., St Geme, J.W., and Waksman, G. (2006). Structure of the outer membrane translocator domain of the *Haemophilus influenzae* Hia trimeric autotransporter. *EMBO J.* 25, 2297–2304.
- Mengin-Lecreulx, D., and van Heijenoort, J. (1993). Identification of the *glmU* gene encoding N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175, 6150–6157.
- Mengin-Lecreulx, D., and van Heijenoort, J. (1994). Copurification of glucosamine-1-phosphate acetyltransferase and N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase activities of *Escherichia coli*: characterization of the *glmU* gene product as a bifunctional enzyme catalyzing two subsequent steps in the pathway for UDP-N-acetylglucosamine synthesis. *J. Bacteriol.* 176, 5788–5795.
- Mengin-Lecreulx, D., and van Heijenoort, J. (1996). Characterization of the essential gene *glmM* encoding phosphoglucosamine mutase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 271, 32–39.
- Mengin-Lecreulx, D., and Lemaître, B. (2005). Structure and metabolism of peptidoglycan and molecular requirements allowing its detection by the *Drosophila* innate immune system. *J. Endotoxin Res.* 11, 105–111.
- Mengin-Lecreulx, D., Siegel, E., and van Heijenoort, J. (1989). Variations in UDP-N-acetylglucosamine and UDP-N-acetylmuramyl-pentapeptide pools in *Escherichia coli* after inhibition of protein synthesis. *J. Bacteriol.* 171, 3282–3287.
- Mengin-Lecreulx, D., Texier, L., Rousseau, M., and van Heijenoort, J. (1991). The *murG* gene of *Escherichia coli* codes for the UDP-N-acetylglucosamine: N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase involved in the membrane steps of peptidoglycan synthesis. *J. Bacteriol.* 173, 4625–4636.
- Mengin-Lecreulx, D., van Heijenoort, J., and Park, J.T. (1996). Identification of the *mpl* gene encoding UDP-N-acetylmuramate: L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate ligase in *Escherichia coli* and its role in recycling of cell wall peptidoglycan. *J. Bacteriol.* 178, 5347–5352.
- Mengin-Lecreulx, D., Ayala, J., Bouhss, A., van Heijenoort, J., Parquet, C., and Hara, H. (1998). Contribution of the *Pmra* promoter to expression of genes in the *Escherichia coli* *mra* cluster of cell envelope biosynthesis and cell division genes. *J. Bacteriol.* 180, 4406–4412.

- Mesnage, S., Dellarole, M., Baxter, N.J., Rouget, J.-B., Dimitrov, J.D., Wang, N., Fujimoto, Y., Hounslow, A.M., Lacroix-Desmazes, S., Fukase, K., et al. (2014). Molecular basis for bacterial peptidoglycan recognition by LysM domains. *Nat. Commun.* *5*, 4269.
- Middelberg, A.P.J. (2002). Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol.* *20*, 437–443.
- Ming, L.-J., and Epperson, J.D. (2002). Metal binding and structure–activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin. *J. Inorg. Biochem.* *91*, 46–58.
- Mogensen, J.E., and Otzen, D.E. (2005). Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins. *Mol. Microbiol.* *57*, 326–346.
- Mohammadi, T., van Dam, V., Sijbrandi, R., Vernet, T., Zapun, A., Bouhss, A., Diepeveen-de Bruin, M., Nguyen-Distèche, M., de Kruijff, B., and Breukink, E. (2011). Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *EMBO J.* *30*, 1425–1432.
- Molinari, H., Pastore, A., Lian, L.Y., Hawkes, G.E., and Sales, K. (1990). Structure of vancomycin and a vancomycin/D-Ala-D-Ala complex in solution. *Biochemistry (Mosc.)* *29*, 2271–2277.
- Mora, L., and de Zamaroczy, M. (2014). In vivo processing of DNase colicins E2 and E7 is required for their import into the cytoplasm of target cells. *PLoS One* *9*, e96549.
- Mora, L., Diaz, N., Buckingham, R.H., and de Zamaroczy, M. (2005). Import of the Transfer RNase Colicin D Requires Site-Specific Interaction with the Energy-Transducing Protein TonB. *J. Bacteriol.* *187*, 2693–2697.
- Mora, L., Moncoq, K., England, P., Oberto, J., and Zamaroczy, M. de (2015). The Stable Interaction Between Signal-Peptidase LepB of *Escherichia coli* and Nuclease Bacteriocins Promotes Toxin Entry into the Cytoplasm. *J. Biol. Chem.* jbc.M115.691907.
- Mosbahi, K., Walker, D., Lea, E., Moore, G.R., James, R., and Kleanthous, C. (2004). Destabilization of the colicin E9 Endonuclease domain by interaction with negatively charged phospholipids: implications for colicin translocation into bacteria. *J. Biol. Chem.* *279*, 22145–22151.
- Mosbahi, K., Walker, D., James, R., Moore, G.R., and Kleanthous, C. (2006). Global structural rearrangement of the cell penetrating ribonuclease colicin E3 on interaction with phospholipid membranes. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *15*, 620–627.
- Mouilleron, S., Badet-Denisot, M.-A., Badet, B., and Golinelli-Pimpaneau, B. (2011). Dynamics of glucosamine-6-phosphate synthase catalysis. *Arch. Biochem. Biophys.* *505*, 1–12.
- Mullins, L.S., Zawadzke, L.E., Walsh, C.T., and Raushel, F.M. (1990). Kinetic evidence for the formation of D-alanyl phosphate in the mechanism of D-alanyl-D-alanine ligase. *J. Biol. Chem.* *265*, 8993–8998.
- Münch, D., and Sahl, H.-G. (2015). Structural variations of the cell wall precursor lipid II in Gram-positive bacteria — Impact on binding and efficacy of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1848*, 3062–3071.
- Münch, D., Roemer, T., Lee, S.H., Engeser, M., Sahl, H.G., and Schneider, T. (2012). Identification and in vitro analysis of the GatD/MurT enzyme-complex catalyzing lipid II amidation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog.* *8*, e1002509.
- Munita, J.M., and Arias, C.A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Spectr.* *4*.

- Murshudov, G.N., Skubák, P., Lebedev, A.A., Pannu, N.S., Steiner, R.A., Nicholls, R.A., Winn, M.D., Long, F., and Vagin, A.A. (2011). REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *67*, 355–367.
- Nanninga, N. (1998). Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *62*, 110–129.
- Nardi, A., Corda, Y., Baty, D., and Duché, D. (2001). Colicin A immunity protein interacts with the hydrophobic helical hairpin of the colicin A channel domain in the *Escherichia coli* inner membrane. *J. Bacteriol.* *183*, 6721–6725.
- Neidhardt, F.C. (1996). *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology (Washington, D.C: ASM Press).
- Nes, I.F., Diep, D.B., and Holo, H. (2007). Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* *189*, 1189–1198.
- Ogawa, T., Inoue, S., Yajima, S., Hidaka, M., and Masaki, H. (2006). Sequence-specific recognition of colicin E5, a tRNA-targeting ribonuclease. *Nucleic Acids Res.* *34*, 6065–6073.
- Ogura, K., and Koyama, T. (1998). Enzymatic Aspects of Isoprenoid Chain Elongation. *Chem. Rev.* *98*, 1263–1276.
- Ollis, A.A., and Postle, K. (2012). Identification of Functionally Important TonB-ExbD Periplasmic Domain Interactions In Vivo. *J. Bacteriol.* *194*, 3078–3087.
- Ollis, A.A., Manning, M., Held, K.G., and Postle, K. (2009). Cytoplasmic membrane protonmotive force energizes periplasmic interactions between ExbD and TonB. *Mol. Microbiol.* *73*, 466–481.
- Olschläger, T., and Braun, V. (1987). Sequence, expression, and localization of the immunity protein for colicin M. *J. Bacteriol.* *169*, 4765–4769.
- Olschläger, T., Schramm, E., and Braun, V. (1984). Cloning and expression of the activity and immunity genes of colicins B and M on ColBM plasmids. *Mol. Gen. Genet.* *MGG 196*, 482–487.
- Olschläger, T., Turba, A., and Braun, V. (1991). Binding of the immunity protein inactivates colicin M. *Mol. Microbiol.* *5*, 1105–1111.
- Olsen, L.R., and Roderick, S.L. (2001). Structure of the *Escherichia coli* GlmU pyrophosphorylase and acetyltransferase active sites. *Biochemistry (Mosc.)* *40*, 1913–1921.
- Olsen, L.R., Vetting, M.W., and Roderick, S.L. (2007). Structure of the *E. coli* bifunctional GlmU acetyltransferase active site with substrates and products. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *16*, 1230–1235.
- OMS, O. mondiale de la (2016). Plan d’action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens (Organisation mondiale de la Santé).
- Op den Kamp, J.A. (1979). Lipid asymmetry in membranes. *Annu. Rev. Biochem.* *48*, 47–71.
- Padmavathi, P.V.L., and Steinhoff, H.-J. (2008). Conformation of the closed channel state of colicin A in proteoliposomes: an umbrella model. *J. Mol. Biol.* *378*, 204–214.

- Papadakos, G., Wojdyla, J.A., and Kleanthous, C. (2012). Nuclease colicins and their immunity proteins. *Q. Rev. Biophys.* *45*, 57–103.
- Park, J.T., and Uehara, T. (2008). How Bacteria Consume Their Own Exoskeletons (Turnover and Recycling of Cell Wall Peptidoglycan). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *MMBR 72*, 211–227.
- Parker, M.W., Pattus, F., Tucker, A.D., and Tsernoglou, D. (1989). Structure of the membrane-pore-forming fragment of colicin A. *Nature* *337*, 93–96.
- Parker, M.W., Postma, J.P., Pattus, F., Tucker, A.D., and Tsernoglou, D. (1992). Refined structure of the pore-forming domain of colicin A at 2.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* *224*, 639–657.
- Patin, D., Barreteau, H., Auger, G., Magnet, S., Crouvoisier, M., Bouhss, A., Touzé, T., Arthur, M., Mengin-Lecreulx, D., and Blanot, D. (2012). Colicin M hydrolyses branched lipids II from Gram-positive bacteria. *Biochimie* *94*, 985–990.
- Pawelek, P.D., Croteau, N., Ng-Thow-Hing, C., Khursigara, C.M., Moiseeva, N., Allaire, M., and Coulton, J.W. (2006). Structure of TonB in Complex with FhuA, *E. coli* Outer Membrane Receptor. *Science* *312*, 1399–1402.
- Perkins, H.R. (1969). Specificity of combination between mucopeptide precursors and vancomycin or ristocetin. *Biochem. J.* *111*, 195–205.
- Perry, A.M., Ton-That, H., Mazmanian, S.K., and Schneewind, O. (2002). Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. III. Lipid II is an in vivo peptidoglycan substrate for sortase-catalyzed surface protein anchoring. *J. Biol. Chem.* *277*, 16241–16248.
- PilsI, H., and Braun, V. (1995a). Strong function-related homology between the pore-forming colicins K and 5. *J. Bacteriol.* *177*, 6973–6977.
- PilsI, H., and Braun, V. (1995b). Novel colicin 10: assignment of four domains to TonB- and TolC-dependent uptake via the Tsx receptor and to pore formation. *Mol. Microbiol.* *16*, 57–67.
- PilsI, H., Glaser, C., Gross, P., Killmann, H., Olschläger, T., and Braun, V. (1993). Domains of colicin M involved in uptake and activity. *Mol. Gen. Genet.* *MGG 240*, 103–112.
- Pommer, A.J., Cal, S., Keeble, A.H., Walker, D., Evans, S.J., Kühlmann, U.C., Cooper, A., Connolly, B.A., Hemmings, A.M., Moore, G.R., et al. (2001). Mechanism and cleavage specificity of the H-N-H endonuclease colicin E9. *J. Mol. Biol.* *314*, 735–749.
- Pompeo, F., Bourne, Y., van Heijenoort, J., Fassy, F., and Mengin-Lecreulx, D. (2001). Dissection of the bifunctional *Escherichia coli* N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase enzyme into autonomously functional domains and evidence that trimerization is absolutely required for glucosamine-1-phosphate acetyltransferase activity and cell growth. *J. Biol. Chem.* *276*, 3833–3839.
- Postle, K. (1990). TonB and the Gram-negative dilemma. *Mol. Microbiol.* *4*, 2019–2025.
- Postle, K., and Kadner, R.J. (2003). Touch and go: tying TonB to transport. *Mol. Microbiol.* *49*, 869–882.
- Pshennikova, E.S., Kolot, M.N., and Khmel, I.A. (1988). STRUCTURAL AND FUNCTIONAL-ORGANIZATION OF THE COLICIN OPERON OF THE CO1D-CA23 PLASMID. *Mol. Biol.* *21*, 1273–1278.

- Pugsley, A.P. (1984a). The ins and outs of colicins. Part II. Lethal action, immunity and ecological implications. *Microbiol. Sci.* *1*, 203–205.
- Pugsley, A.P. (1984b). The ins and outs of colicins. Part I: Production, and translocation across membranes. *Microbiol. Sci.* *1*, 168–175.
- Pugsley, A.P., and Schwartz, M. (1983). Expression of a gene in a 400-base-pair fragment of colicin plasmid Cole2-P9 is sufficient to cause host cell lysis. *J. Bacteriol.* *156*, 109–114.
- Pulagam, L.P., and Steinhoff, H.-J. (2013). Acidic pH-induced membrane insertion of colicin A into *E. coli* natural lipids probed by site-directed spin labeling. *J. Mol. Biol.* *425*, 1782–1794.
- Qiu, X.Q., Jakes, K.S., Kienker, P.K., Finkelstein, A., and Slatin, S.L. (1996). Major transmembrane movement associated with colicin Ia channel gating. *J. Gen. Physiol.* *107*, 313–328.
- Ramm, K., and Plückthun, A. (2000). The Periplasmic *Escherichia coli* Peptidylprolyl cis,trans-Isomerase FkpA II. ISOMERASE-INDEPENDENT CHAPERONE ACTIVITY IN VITRO. *J. Biol. Chem.* *275*, 17106–17113.
- Rea, M.C., Ross, R.P., Cotter, P.D., and Hill, C. (2011). Classification of Bacteriocins from Gram-Positive Bacteria. In *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*, D. Drider, and S. Rebuffat, eds. (Springer New York), pp. 29–53.
- Rebuffat, S. (2012). Microcins in action: amazing defence strategies of Enterobacteria. *Biochem. Soc. Trans.* *40*, 1456–1462.
- Rebuffat, S. (2016). Microcins and Other Bacteriocins: Bridging the Gaps Between Killing Strategies, Ecology and Applications. In *The Bacteriocins: Current Knowledge and Future Prospects*, (Caister Academic Press), pp. 11–34.
- Riley, M.A. (1993). Molecular mechanisms of colicin evolution. *Mol. Biol. Evol.*
- Riley, M.A. (1998). Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annu. Rev. Genet.* *32*, 255–278.
- Rogers, H.J., Perkins, H.R., and Ward, J.B. (1980). *Microbial cell walls and membranes* (London: Chapman and Hall).
- Roos, U., Harkness, R.E., and Braun, V. (1989). Assembly of colicin genes from a few DNA fragments. Nucleotide sequence of colicin D. *Mol. Microbiol.* *3*, 891–902.
- Ruiz, N. (2008). Bioinformatics identification of MurJ (MviN) as the peptidoglycan lipid II flippase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 15553.
- Sabet, S.F., and Schnaitman, C.A. (1973). Purification and properties of the colicin E3 receptor of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *248*, 1797–1806.
- Sacco, E., Hugonnet, J.-E., Josseaume, N., Cremniter, J., Dubost, L., Marie, A., Patin, D., Blanot, D., Rice, L.B., Mainardi, J.-L., et al. (2010). Activation of the L,D-transpeptidation peptidoglycan cross-linking pathway by a metallo-D,D-carboxypeptidase in *Enterococcus faecium*. *Mol. Microbiol.* *75*, 874–885.
- Salmond, G.P., Lutkenhaus, J.F., and Donachie, W.D. (1980). Identification of new genes in a cell envelope-cell division gene cluster of *Escherichia coli*: cell envelope gene murG. *J. Bacteriol.* *144*, 438–440.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Mol. Cloning Lab. Man.
- Saul, F.A., Arié, J.-P., Vulliez-le Normand, B., Kahn, R., Betton, J.-M., and Bentley, G.A. (2004). Structural and functional studies of FkpA from *Escherichia coli*, a cis/trans peptidyl-prolyl isomerase with chaperone activity. *J. Mol. Biol.* *335*, 595–608.
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A., and Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* *32*, 234–258.
- Schaller, K., Höltje, J.V., and Braun, V. (1982). Colicin M is an inhibitor of murein biosynthesis. *J. Bacteriol.* *152*, 994–1000.
- Scheffers, D.-J., and Pinho, M.G. (2005). Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* *69*, 585–607.
- Schleifer, K.H., and Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* *36*, 407–477.
- Schneider, T., Senn, M.M., Berger-Bächli, B., Tossi, A., Sahl, H.-G., and Wiedemann, I. (2004). In vitro assembly of a complete, pentaglycine interpeptide bridge containing cell wall precursor (lipid II-Gly5) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* *53*, 675–685.
- Schneider, T., Kruse, T., Wimmer, R., Wiedemann, I., Sass, V., Pag, U., Jansen, A., Nielsen, A.K., Mygind, P.H., Raventós, D.S., et al. (2010). Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor Lipid II. *Science* *328*, 1168–1172.
- Schöffler, H., and Braun, V. (1989). Transport across the outer membrane of *Escherichia coli* K12 via the FhuA receptor is regulated by the TonB protein of the cytoplasmic membrane. *Mol. Gen. Genet. MGG* *217*, 378–383.
- Schönbrunn, E., Svergun, D.I., Amrhein, N., and Koch, M.H. (1998). Studies on the conformational changes in the bacterial cell wall biosynthetic enzyme UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyltransferase (MurA). *Eur. J. Biochem.* *253*, 406–412.
- Schulz, S., Stephan, A., Hahn, S., Bortesi, L., Jarczowski, F., Bettmann, U., Paschke, A.-K., Tusé, D., Stahl, C.H., Giritch, A., et al. (2015). Broad and efficient control of major foodborne pathogenic strains of *Escherichia coli* by mixtures of plant-produced colicins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, E5454-5460.
- Senior, B.W., and Holland, I.B. (1971). Effect of Colicin E3 upon the 30S Ribosomal Subunit of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *68*, 959–963.
- Sham, L.-T., Butler, E.K., Lebar, M.D., Kahne, D., Bernhardt, T.G., and Ruiz, N. (2014). Bacterial cell wall. MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. *Science* *345*, 220–222.
- Sharma, O., Yamashita, E., Zhalnina, M.V., Zakharov, S.D., Datsenko, K.A., Wanner, B.L., and Cramer, W.A. (2007). Structure of the complex of the colicin E2 R-domain and its BtuB receptor. The outer membrane colicin translocon. *J. Biol. Chem.* *282*, 23163–23170.
- Sharma, O., Datsenko, K.A., Ess, S.C., Zhalnina, M.V., Wanner, B.L., and Cramer, W.A. (2009). Genome-wide screens: novel mechanisms in colicin import and cytotoxicity. *Mol. Microbiol.* *73*, 571–585.

- Sheng, Y., Sun, X., Shen, Y., Bognar, A.L., Baker, E.N., and Smith, C.A. (2000). Structural and functional similarities in the ADP-forming amide bond ligase superfamily: implications for a substrate-induced conformational change in folylpolyglutamate synthetase¹¹Edited by I. A. Wilson. *J. Mol. Biol.* **302**, 425–438.
- Shockman, G.D., and Barrett, J.F. (1983). Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**, 501–527.
- Šink, R., Kotnik, M., Zega, A., Barreteau, H., Gobec, S., Blanot, D., Dessen, A., and Contreras-Martel, C. (2016). Crystallographic Study of Peptidoglycan Biosynthesis Enzyme MurD: Domain Movement Revisited. *PLOS ONE* **11**, e0152075.
- Skarzynski, T., Kim, D.H., Lees, W.J., Walsh, C.T., and Duncan, K. (1998). Stereochemical Course of Enzymatic Enolpyruvyl Transfer and Catalytic Conformation of the Active Site Revealed by the Crystal Structure of the Fluorinated Analogue of the Reaction Tetrahedral Intermediate Bound to the Active Site of the C115A Mutant of MurA. *Biochemistry (Mosc.)* **37**, 2572–2577.
- Slatin, S.L., Qiu, X.Q., Jakes, K.S., and Finkelstein, A. (1994). Identification of a translocated protein segment in a voltage-dependent channel. *Nature* **371**, 158–161.
- Smith, C.A. (2006). Structure, Function and Dynamics in the mur Family of Bacterial Cell Wall Ligases. *J. Mol. Biol.* **362**, 640–655.
- Smith, P.F. (1968). Microbial Protoplasts, Spheroplasts, and L-Forms. Proceedings of a conference, Kalamazoo, Mich., Nov. 1966. Lucien B. Guze, Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 1968. xxii + 523 pp., illus. \$24.50. *Science* **160**, 1217–1217.
- Somner, E.A., and Reynolds, P.E. (1990). Inhibition of peptidoglycan biosynthesis by ramoplanin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 413.
- Studier, F.W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.* **219**, 37–44.
- Sturgis, J.N. (2001). Organisation and evolution of the tol-pal gene cluster. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 113–122.
- Sung, M., and Dalbey, R.E. (1992). Identification of potential active-site residues in the Escherichia coli leader peptidase. *J. Biol. Chem.* **267**, 13154–13159.
- Tatar, L.D., Marolda, C.L., Polischuk, A.N., van Leeuwen, D., and Valvano, M.A. (2007). An Escherichia coli undecaprenyl-pyrophosphate phosphatase implicated in undecaprenyl phosphate recycling. *Microbiol. Read. Engl.* **153**, 2518–2529.
- Templin, M.F., Ursinus, A., and Höltje, J.V. (1999). A defect in cell wall recycling triggers autolysis during the stationary growth phase of Escherichia coli. *EMBO J.* **18**, 4108–4117.
- TePLYakov, A., Obmolova, G., Badet, B., and Badet-Denisot, M.-A. (2001). Channeling of ammonia in glucosamine-6-phosphate synthase¹¹Edited by R. Huber. *J. Mol. Biol.* **313**, 1093–1102.
- Tipper, D.J., and Strominger, J.L. (1968). Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. XII. Inhibition of cross-linking by penicillins and cephalosporins: studies in Staphylococcus aureus in vivo. *J. Biol. Chem.* **243**, 3169–3179.

- Tomita, K., Ogawa, T., Uozumi, T., Watanabe, K., and Masaki, H. (2000). A cytotoxic ribonuclease which specifically cleaves four isoaccepting arginine tRNAs at their anticodon loops. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 8278–8283.
- Touzé, T., Blanot, D., and Mengin-Lecreulx, D. (2008). Substrate specificity and membrane topology of *Escherichia coli* PgpB, an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase. *J. Biol. Chem.* *283*, 16573–16583.
- Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C.A., and Vollmer, W. (2012). From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat. Rev. Microbiol.* *10*, 123–136.
- Usón, I., Patzer, S.I., Rodríguez, D.D., Braun, V., and Zeth, K. (2012). The crystal structure of the dimeric colicin M immunity protein displays a 3D domain swap. *J. Struct. Biol.* *178*, 45–53.
- Vankemmelbeke, M., Zhang, Y., Moore, G.R., Kleanthous, C., Penfold, C.N., and James, R. (2009). Energy-dependent Immunity Protein Release during tol-dependent Nuclease Colicin Translocation. *J. Biol. Chem.* *284*, 18932–18941.
- Vetter, I.R., Parker, M.W., Tucker, A.D., Lakey, J.H., Pattus, F., and Tsernoglou, D. (1998). Crystal structure of a colicin N fragment suggests a model for toxicity. *Struct. Lond. Engl.* *1993* *6*, 863–874.
- Vollmer, W. (2008). Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiol. Rev.* *32*, 287–306.
- Vollmer, W., Pils, H., Hantke, K., Höltje, J.V., and Braun, V. (1997). Pesticin displays muramidase activity. *J. Bacteriol.* *179*, 1580–1583.
- Vollmer, W., Blanot, D., and de Pedro, M.A. (2008a). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* *32*, 149–167.
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., and Foster, S. (2008b). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol. Rev.* *32*, 259–286.
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., and Foster, S. (2008c). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol. Rev.* *32*, 259–286.
- van der Wal, F.J., Luirink, J., and Oudega, B. (1995). Bacteriocin release proteins: mode of action, structure, and biotechnological application. *FEMS Microbiol. Rev.* *17*, 381–399.
- Walker, D., Mosbahi, K., Vankemmelbeke, M., James, R., and Kleanthous, C. (2007). The role of electrostatics in colicin nuclease domain translocation into bacterial cells. *J. Biol. Chem.* *282*, 31389–31397.
- Wallis, R., Moore, G.R., James, R., and Kleanthous, C. (1995a). Protein-protein interactions in colicin E9 DNase-immunity protein complexes. 1. Diffusion-controlled association and femtomolar binding for the cognate complex. *Biochemistry (Mosc.)* *34*, 13743–13750.
- Wallis, R., Leung, K.Y., Pommer, A.J., Videler, H., Moore, G.R., James, R., and Kleanthous, C. (1995b). Protein-protein interactions in colicin E9 DNase-immunity protein complexes. 2. Cognate and noncognate interactions that span the millimolar to femtomolar affinity range. *Biochemistry (Mosc.)* *34*, 13751–13759.

- Waxman, D.J., Yocum, R.R., and Strominger, J.L. (1980). Penicillins and cephalosporins are active site-directed acylating agents: evidence in support of the substrate analogue hypothesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *289*, 257–271.
- Wiener, M.C. (2005). TonB-dependent outer membrane transport: going for Baroque? *Curr. Opin. Struct. Biol.* *15*, 394–400.
- Wiener, M., Freymann, D., Ghosh, P., and Stroud, R.M. (1997). Crystal structure of colicin Ia. *Nature* *385*, 461–464.
- Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G.W., McCoy, A., et al. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *67*, 235–242.
- von Wintersdorff, C.J.H., Penders, J., van Niekerk, J.M., Mills, N.D., Majumder, S., van Alphen, L.B., Savelkoul, P.H.M., and Wolffs, P.F.G. (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front. Microbiol.* *7*.
- Wu, H.C. (1996). Biosynthesis of lipoproteins. *Escherichia Coli Salmonella Cell. Mol. Biol.* *1*, 1005–1014.
- Yamaguchi, H., and Miyazaki, M. (2014). Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules* *4*, 235–251.
- Yamaguchi, S., Yamamoto, E., Mannen, T., Nagamune, T., and Nagamune, T. (2013). Protein refolding using chemical refolding additives. *Biotechnol. J.* *8*, 17–31.
- Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M., and Nakamura, S. (1990). Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *34*, 1271–1272.
- Zacharof, M.P., and Lovitt, R.W. (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia* *2*, 50–56.
- Zakharov, S.D., Sharma, O., Zhalnina, M.V., and Cramer, W.A. (2008). Primary events in the colicin translocon: FRET analysis of colicin unfolding initiated by binding to BtuB and OmpF. *Biochemistry (Mosc.)* *47*, 12802–12809.
- de Zamaroczy, M., and Buckingham, R.H. (2002). Importation of nuclease colicins into *E. coli* cells: endoproteolytic cleavage and its prevention by the Immunity protein. *Biochimie* *84*, 423–432.
- de Zamaroczy, M., Mora, L., Lecuyer, A., Géli, V., and Buckingham, R.H. (2001). Cleavage of colicin D is necessary for cell killing and requires the inner membrane peptidase LepB. *Mol. Cell* *8*, 159–168.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* *415*, 389–395.
- Zeng, X., and Lin, J. (2013). Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Front. Microbiol.* *4*.
- Zeth, K., Römer, C., Patzer, S.I., and Braun, V. (2008). Crystal structure of colicin M, a novel phosphatase specifically imported by *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *283*, 25324–25331.
- Zhai, Y.F., Heijne, W., and Saier, M.H. (2003). Molecular modeling of the bacterial outer membrane receptor energizer, ExbBD/TonB, based on homology with the flagellar motor, MotAB. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1614*, 201–210.

Zhang, Y.L., and Cramer, W.A. (1993). Intramembrane helix-helix interactions as the basis of inhibition of the colicin E1 ion channel by its immunity protein. *J. Biol. Chem.* *268*, 10176–10184.

Ziegler, K., Diener, A., Herpin, C., Richter, R., Deutzmann, R., and Lockau, W. (1998). Molecular characterization of cyanophycin synthetase, the enzyme catalyzing the biosynthesis of the cyanobacterial reserve material multi- L-arginyl-poly- L-aspartate (cyanophycin). *Eur. J. Biochem.* *254*, 154–159.

Zschüttig, A., Zimmermann, K., Blom, J., Goesmann, A., Pöhlmann, C., and Gunzer, F. (2012). Identification and Characterization of Microcin S, a New Antibacterial Peptide Produced by Probiotic *Escherichia coli* G3/10. *PLOS ONE* *7*, e33351.

Zuber, B., Chami, M., Houssin, C., Dubochet, J., Griffiths, G., and Daffé, M. (2008). Direct Visualization of the Outer Membrane of Mycobacteria and Corynebacteria in Their Native State. *J. Bacteriol.* *190*, 5672–5680.

Zwaig, R.N. de, and Luria, S.E. (1969). New Class of Conditional Colicin-tolerant Mutants. *J. Bacteriol.* *99*, 78–84.

Titre : Caractérisation biochimique et structurale de bactériocines ciblant le métabolisme du peptidoglycane bactérien, alternative potentielle aux antibiotiques

Mots clés : Peptidoglycane, colicines, colicine M, lipide II, antibactériens, chimères

Résumé : L'émergence de bactéries multirésistantes aux antibiotiques est la conséquence de leur utilisation à mauvais escient au cours de ces dernières décennies. Ce phénomène constitue un problème de santé publique majeur, et face à cette urgence sanitaire, il est nécessaire de trouver rapidement de nouveaux agents antibactériens.

Les **colicines**, au regard de leurs propriétés antimicrobiennes intrinsèques, constituent des candidats intéressants. Naturellement produites par *E. coli* dans le but de tuer des souches compétitrices de la même espèce ou d'espèces apparentées, elles exercent en général leur activité cytotoxique par le biais d'une activité ionophorique ou nucléasique. Parmi les nombreuses colicines connues à ce jour, la **colicine M** (ColM) est la seule à interférer avec la voie de biosynthèse du **peptidoglycane**, macromolécule essentielle et spécifique au monde bactérien. En effet, une fois dans le périplasma de *E. coli*, la ColM clive le lipide II, dernier précurseur de la voie de biosynthèse du peptidoglycane, conduisant de ce fait à la lyse bactérienne. Plusieurs homologues de la ColM ont été identifiés chez d'autres genres bactériens (*Pseudomonas*, *Pectobacterium* et *Burkholderia*) mais aucune cytotoxicité

croisée n'a été mise en évidence à ce jour, d'où un spectre d'action restreint pour les membres de cette **nouvelle famille d'enzymes antibactériennes**.

Ce travail traite de l'étude structurale et biochimique de la ColM et de certains de ses homologues. L'étude structurale de différents variants de la PaeM, homologue issu de *P. aeruginosa*, a permis d'identifier une molécule d'eau conservée au sein du site actif qui joue probablement un rôle central dans le mécanisme catalytique de cette famille d'enzyme. L'expression des homologues de la ColM issus de *Pseudomonas* et de *Pectobacterium*, directement dans le périplasma de *E. coli*, a permis de démontrer leur activité lytique, prouvant ainsi le grand potentiel de ces bactériocines en tant qu'alternatives aux antibiotiques. Enfin, la construction de plusieurs **colicines chimères** entre la ColM et ses homologues, capables de dégrader le lipide II *in vitro* et d'induire la lyse d'*E. coli* suite à leur expression périplasmique, ouvre la voie à de futurs espoirs thérapeutiques.

Title : Biochemical and structural characterization of bacteriocins targeting peptidoglycan metabolism, potential alternative to antibiotics.

Keywords : Peptidoglycan, colicins, colicin M, lipid II, antibacterials, chimera

Abstract : The misuse of **antibiotics** during the last decades led to the emergence of multidrug resistant pathogenic bacteria. This phenomenon constitutes a major public health issue. Given that urgency, the finding of new antibacterials in the short term is crucial.

Colicins, due to their antimicrobials properties, constitute good candidates. They are protein toxins produced by *E. coli* to kill competitors belonging to the same or related species. In most cases, they exhibit their cytotoxic activity through an ionophoric or nucleasic activity. Among the twenty colicins known to date, **colicin M** (ColM) is the only one known to interfere with peptidoglycan biosynthesis. It develops its lethal activity in the *E. coli* periplasm, in three steps deeply linked to its structural organization in three domains. Once in the periplasm, ColM degrades the lipid II, i.e. the last precursor in the peptidoglycan biosynthesis pathway, in two products that cannot be reused, thereby leading to cell lysis. Several ColM homologues have been identified in other bacterial genera, such as *Pseudomonas*, *Pectobacterium* and *Burkholderia*, but

no cross activity has been shown to date, explaining the narrow antibacterial spectrum displayed by the members of this **new family of antibacterial enzymes**.

This work deals with the structural and biochemical study of ColM and some of its homologues. Structural studies on several variants of PaeM, the ColM homologue from *P. aeruginosa*, led to identify a conserved water molecule in the active site, probably playing a central role in the catalytic mechanism of this enzyme family. Moreover, expression of ColM homologues from *Pseudomonas* or *Pectobacterium* species directly in the *E. coli* periplasm showed that all these homologues were able to induce *E. coli* cell lysis, thus demonstrating the great potential of these bacteriocins as an alternative to antibiotics. Following these results, several **chimera colicins** were created between ColM and its homologues, which were shown to degrade lipid II *in vitro* and to induce *E. coli* cell lysis after their periplasmic expression, opening the way to future new therapeutic options.

