

DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **20 décembre 2023**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Monsieur NICOLAI Xavier**

Titre de la thèse : « *Couplage covalent de protéines au peptidoglycane chez la γ -protéobactérie *Dickeya dadantii* : étude d'une protéine du système de sécrétion de type II, OutB* »



Résumé

Dickeya dadantii est une γ -protéobactérie phytopathogène à large spectre d'hôte qui provoque la maladie de la pourriture molle chez les végétaux. Elle sécrète des enzymes dégradant la paroi cellulaire végétale par le système de sécrétion de type II (T2SS), appelé Out. Le système Out est un complexe multiprotéique traversant l'enveloppe bactérienne. L'enveloppe des γ -protéobactéries est constituée de deux membranes qui délimitent un espace extracytoplasmique appelé le périplasme. Une couche de peptidoglycane (PG), située dans le périplasme assure la forme de la cellule et préserve les bactéries du stress osmotique. La lipoprotéine de Braun (Lpp) stabilise l'enveloppe en attachant le PG à la membrane externe par une liaison covalente. Jusqu'à récemment, Lpp était le seul exemple connu de protéine couplée covalamment au PG chez les bactéries à Gram-négatif. Dans ce travail de thèse, nous avons montré qu'OutB, un composant du T2SS de *D. dadantii*, est couplée au PG de manière covalente comme Lpp. OutB est ancrée dans la membrane interne et possède une région périplasmique qui stabilise le canal du T2SS. L'extrémité C-terminale d'OutB est très similaire à celle de Lpp et nos études ont démontré qu'elle est couplée au PG par la lysine C-terminale. Contrairement au Lpp, qui est une protéine très abondante et agit comme ancrage de la membrane au PG, OutB est exprimée modérément et utilise le PG comme une matrice pour son propre attachement, et pour l'attachement du système Out à l'enveloppe bactérienne. Afin de déchiffrer le mécanisme moléculaire de ce phénomène, une série de mutagenèses dirigées d'OutB a été réalisée et des variants d'OutB de longueur variée ont été construits. Pour évaluer la quantité de variants d'OutB liés au PG, ce dernier a été purifié et analysé par Western blot. Cette étude a été complétée par la mutagenèse dirigée de Lpp suivie de tests fonctionnels des variants, et de l'analyse de leur couplage au PG. Ainsi, nous avons montré que le motif de couplage au PG de Lpp, appelé Lpp-box, est assez permissif aux substitutions chez *D. dadantii*, et peut permettre l'attachement au PG de protéines assez variées. Nous avons montré que la fusion de la Lpp-box à la protéine périplasmique BlaM a permis l'attachement de cette dernière au PG. Par ailleurs, cette étude a suggéré qu'une pectinase périplasmique, PaeX, qui porte une Lpp-box assez dégénérée, semble également être couplée au PG. Nous avons ensuite montré que deux L,D-transpeptidases de *D. dadantii*, Ldt03 et Ldt84, sont responsables de l'attachement d'OutB et de Lpp au PG. Ldt03 et Ldt84 ne génèrent pas les mêmes profils de liaison de Lpp au PG ce qui suggère que

chacune des deux Ldt possède une spécificité enzymatique vis-à-vis de la taille du peptide-tige auquel elles attachent Lpp. Nous avons également montré que les L,D-transpeptidases d'*E. coli* ont une activité croisée sur la Lpp de *D. dadantii*, permettant son couplage au PG, bien que les Lpp-boxes des Lpp de ces bactéries soient dissimilaires. Ces travaux montrent que le phénomène d'attachement covalent des protéines au PG chez les γ -protéobactéries ne se limite pas à Lpp et aux porines de la membrane externe, mais qu'il peut également concerner des protéines de la membrane interne, comme OutB, ou périplasmiques, comme la pectinase PaeX. Il est donc probable que ce phénomène soit encore largement sous-estimé chez les bactéries à Gram-négatif.

Mots-clés : T2SS, peptidoglycane, bactéries à Gram-négatif, enveloppe bactérienne, Lipoprotéine de Braun, L,D-transpeptidase, *Dickeya dadantii*.