Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE À FINALITÉ APPROFONDIE

Conservation de la structure de liaison entre les protéines de la membrane externe et le peptidoglycane de Brucella Abortus chez Agrobacterium Tumefaciens

Lannoy, Adélie

Award date:
2020

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 25. Apr. 2024

REMERCIEMENT

Je tiens à remercier M. Boutry (UCL) qui nous a fourni la souche sauvage d'*A. tumefaciens* C58 GV3101, M. Dieu et C. Demazy (URBC) pour les différentes analyses de spectrométrie de masse.

J'aimerais remercier les membres de mon jury, E. Bauwens, A. Demars, R. Hallez et P. Renard pour leurs questions pertinentes et le temps consacré à lire et évaluer ce travail.

J'aimerais remercier tous les membres de l'URBM pour leurs conseils et leurs soutiens apportés. Je remercie plus particulier la « Xa team » ; A. Roba, C. Servais, A. Reboul, M. Van der Henst et A. Demars pour leur l'accueil, les discussions et bien sûr, la bonne ambiance dans le laboratoire.

Je souhaiterais remercier mon promoteur, le professeur Xavier De Bolle pour m'avoir proposé ce sujet de mémoire particulièrement intéressant et enrichissant. Je le remercie pour les discussions très instructives concernant le sujet du mémoire. Je le remercie également de sa disponibilité de ses conseils et du temps passé pour la correction ce travail. Un grand merci également pour sa confiance pour mener à bien ce sujet de mémoire.

J'aimerais remercier tout particulièrement mon tuteur, Pierre Godessart. Je te remercie pour ta patience et de ton écoute. Je te remercie pour m'avoir poussée dans mes retranchements avec tes « chop chop ». Je te remercie pour tes conseils et ton aide durant ces 10 mois. Je te remercie également pour la correction ce travail. Je te remercie de la confiance que tu m'as accordée et de m'avoir fait partager ta passion pour le monde de la recherche.

Merci aux mémorants, C. Philippe, A. Vitali et M. Galia pour la bonne ambiance, les pleurs et les fous rires dans le bureau des mémos et merci pour le soutient durant la rédaction.

Je souhaiterais ajouter un mot pour remercier ma famille de m'avoir soutenue durant mon parcours, particulièrement mes parents qui ont corrigé l'orthographe de ce mémoire sans en comprendre grand-chose.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENT 1
INTRODUCTION 4
1. La membrane cytoplasmique 4
2. La paroi bactérienne 4
3. Le peptidoglycane 5
3.1. Structure du peptidoglycane 5
3.2. Synthèse du peptidoglycane 6
3.3. Le PG dans la division bactérienne 6
4. Transpeptidation lors de la biosynthèse du peptidoglycane 7
5. Le modèle *Escherichia coli* 8
6. Les α-protéobactéries 9
6.1. L'enveloppe de *Brucella abortus* 10
6.2. L'enveloppe d'*Agrobacterium tumefaciens* 11
OBJECTIFS 11
MATÉRIEL ET MÉTHODES 12
1. Plasmides et souches 12
2. Extraction ADN 12
2.1. Génomique 12
2.2. Plasmidiques 12
3. PCR 12
3.1. PCR préparatrice 12
3.2. PCR jointive 12
3.3. PCR de diagnostic 12
4. Restriction enzymatique 13
5. Ligation 13
6. Construction des souches 13
6.1. Transformation 13
6.2. Conjugaison 13
6.3. Électroporation 13
6.4. Sélection des souches de délétion 14
7. Extraction du peptidoglycane 14
7.1. Extraction PG pour un analyse protéomique 14
7.2. Extractions de PG pour les westerns blot et autres analyses protéomiques 14
7.3. Digestion du PG 15
8. Spectrométrie de masse 15
9. Détection des protéines 16

9.1. Western Blot 16
9.2. Coloration à l'argent 16
10. Purification de l'amidase de *Staphylococcus aureus* 16
11. Immunomarquage de l'Omp25 17
12. Microscopie à fluorescence 17
13. Analyses bioinformatiques 18
RÉSULTATS 19
1. Détection du PG d'*A. tumefaciens* 19
2. Homologie des protéines de la membrane externe (OMPs) 19
3. Etude des protéines du PG d'*A. tumefaciens* 20
4. Expression de l'Omp25 dans *A. tumefaciens* 22
5. Homologie des L,D-transpeptidases (LDts) 23
6. Co-expression dans *E. coli* 23
7. LDts de *B. abortus* 24
7.1. Fonction de la $LDt_{Ba}11$ 24
DISCUSSION ET PERSPECTIVES 26
BIBLIOGRAPHIE 31
ANNEXES 36

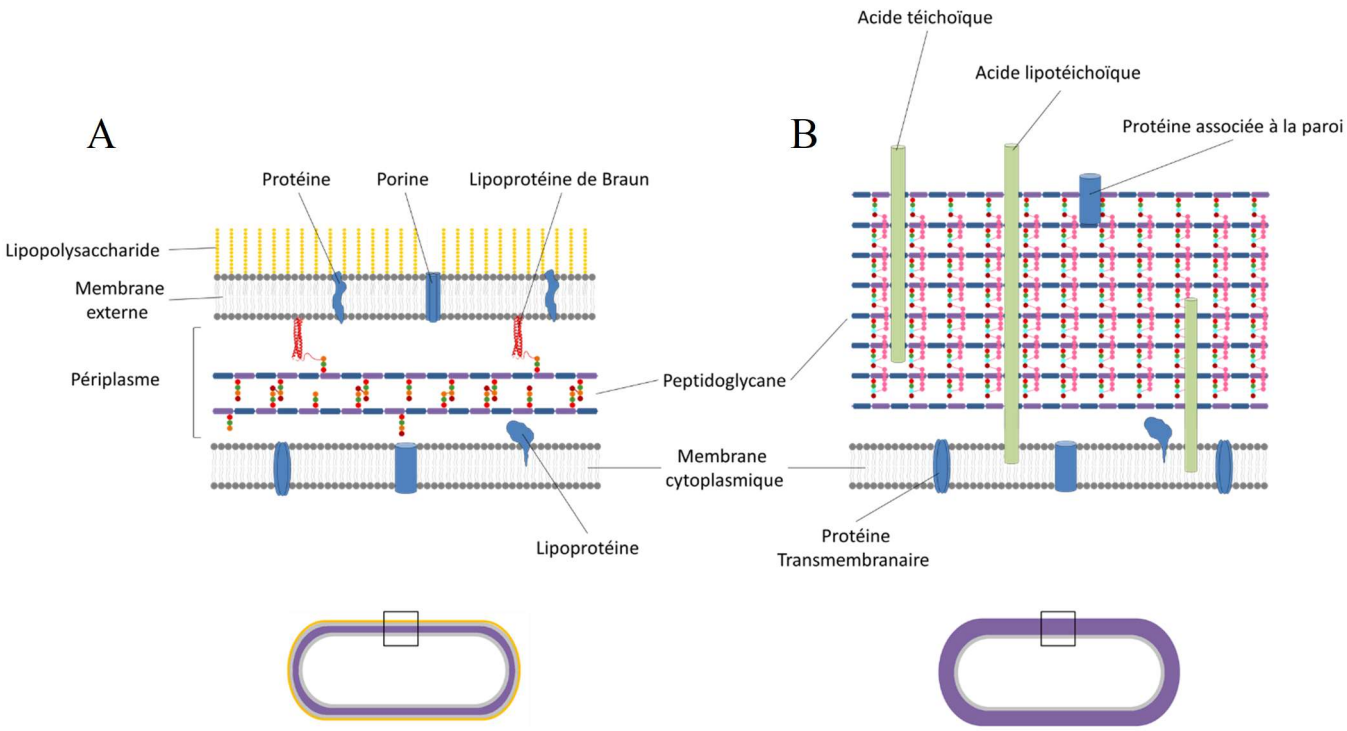


Figure 1 | Schémas des parois cellulaires des bactéries à Gram négatif et positif. (A) Représentation schématique de la paroi de *Escherichia coli*. La paroi est composée de deux membranes lipidiques (une cytoplasmique et une externe) et d'une fine couche de peptidoglycane (PG). Le PG se situe entre les deux membranes dont l'espace formé est appelé périplasme. La membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique, dont le feuillet externe est composé de lipopolysaccharides. La lipoprotéine de Braun, une protéine ancrée dans le feuillet interne de la membrane externe, est liée de façon covalente au PG. (B) Représentation schématique de la paroi de *Staphylococcus aureus*. La paroi est composée de la membrane lipidique et d'une épaisse couche de peptidoglycane. Les acides téichoïques sont incrustés dans le PG et certains, appelés acides lipotéichoïques, sont liés de façon covalente aux lipides membranaires. Les protéines membranaires, représentées en bleu, peuvent être transmembranaires, périphériques ou lipoprotéiques.

Position	Nature du résidu	Exemples
1	L-Ala	La plupart des espèces
2	D-Isoglutamate	La plupart des bactéries à Gram négatif
	D-Isoglutamine	La plupart des bactéries à Gram positif, Mycobacteria
3	*meso*DAP	La plupart des bactéries à Gram négatif, Bacille, Mycobacteria
	L-Lys	La plupart des bactéries à Gram positif
4	D-Ala	Toutes les bactéries
5	D-Ala	La plupart des bactéries

Tableau 1 | Variation des acides aminés dans les tiges peptidiques. Tableau simplifié de Vollmer, Blanot, and de Pedro (2008).

INTRODUCTION

Les procaryotes peuvent être divisés en deux grands groupes : les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. La distinction entre ces deux groupes est basée sur les différences de structure des parois cellulaires, qui jouent un rôle dans la réaction de coloration Gram.

La structure de la paroi bactérienne diffère fortement entre les bactéries à Gram négatifs ou positifs. Chez les bactéries à Gram positifs, la paroi est composée d'une membrane cytoplasmique (MC) et d'une épaisse couche de peptidoglycane (PG), un polymère rigide. Ces bactéries apparaissent violettes à la coloration de Gram. La paroi des bactéries à Gram négatifs, également appelée enveloppe, est composée de deux membranes lipidiques, une cytoplasmique (MC) et une externe (ME), et d'une fine couche de PG. Celle-ci se situe entre les deux membranes dont l'espace formé entre le feuillet externe de la MC et le feuillet interne de la ME est appelé périplasme (figure 1).

La différence de coloration est due aux différences de structure de la paroi cellulaire. La coloration basique réalisée avec le cristal violet colore toutes les bactéries. Ensuite, l'alcool décolore uniquement les bactéries à Gram négatif. Leur couche de peptidoglycane est plus pauvre et ne constitue pas une barrière imperméable à l'alcool, à l'inverse des bactéries à Gram positif. Ensuite, les bactéries sont colorées avec la safranine. La couleur rose n'influence pas la coloration violette toujours présente dans le cytoplasme des bactéries à Gram positif. Donc seules les bactéries à Gram négatif apparaitront roses.

1. La membrane cytoplasmique

La membrane cytoplasmique (MC) délimite le cytoplasme. Elle permet une séparation avec l'espace périplasmique chez les bactéries à Gram négatif ou avec l'environnement chez les bactéries à Gram positif. La MC est une bicouche phospholipidique symétrique contenant des protéines (figure 1). Ces protéines peuvent être attachées ou intégrées à la membrane. Les protéines traversant la membrane sont qualifiées de transmembranaires, tandis que les protéines à la surface du feuillet lipidique de la MC sont dites périphériques. Les protéines transmembranaires ont généralement des domaines hydrophobes s'intégrant dans la membrane et des domaines hydrophiles qui sont en contact avec le cytoplasme ou avec le milieu extracytoplasmique. Les protéines périphériques interagissent soit avec les têtes hydrophiles des phospholipides soit avec les protéines transmembranaires. Certaines protéines périphériques sont des lipoprotéines, c'est-à-dire qu'elles portent un fragment lipidique hydrophobe qui s'ancre dans un feuillet de la membrane.

Une fonction importante de la MC est la perméabilité sélective. La bicouche phospholipidique empêche la diffusion des molécules polaires et chargées. Le transport doit donc se faire qui à travers des transporteurs protéiques, le plus souvent sélectifs, intégrés dans la MC. Une autre fonction de la MC est la conservation et la consommation de l'énergie.

2. La paroi bactérienne

Pour les bactéries à Gram négatif, la paroi est composée PG et de la ME. La paroi apporte une résistance structurelle afin d'empêcher la lyse cellulaire due à la pression osmotique. En effet, le cytoplasme des bactéries a une concentration élevée en solutés solubles, induisant une forte pression osmotique (Rojas et al. 2018).

La ME des bactéries à Gram négatif est une bicouche lipidique asymétrique, dont le feuillet externe est composé de lipopolysaccharides (LPS) (figure 1A). Les LPS sont composés de polysaccharides liés à des lipides jouant un rôle dans la perméabilité de la ME et pouvant avoir une activité de toxicité pour les hôtes (Sanderson et al. 1974).

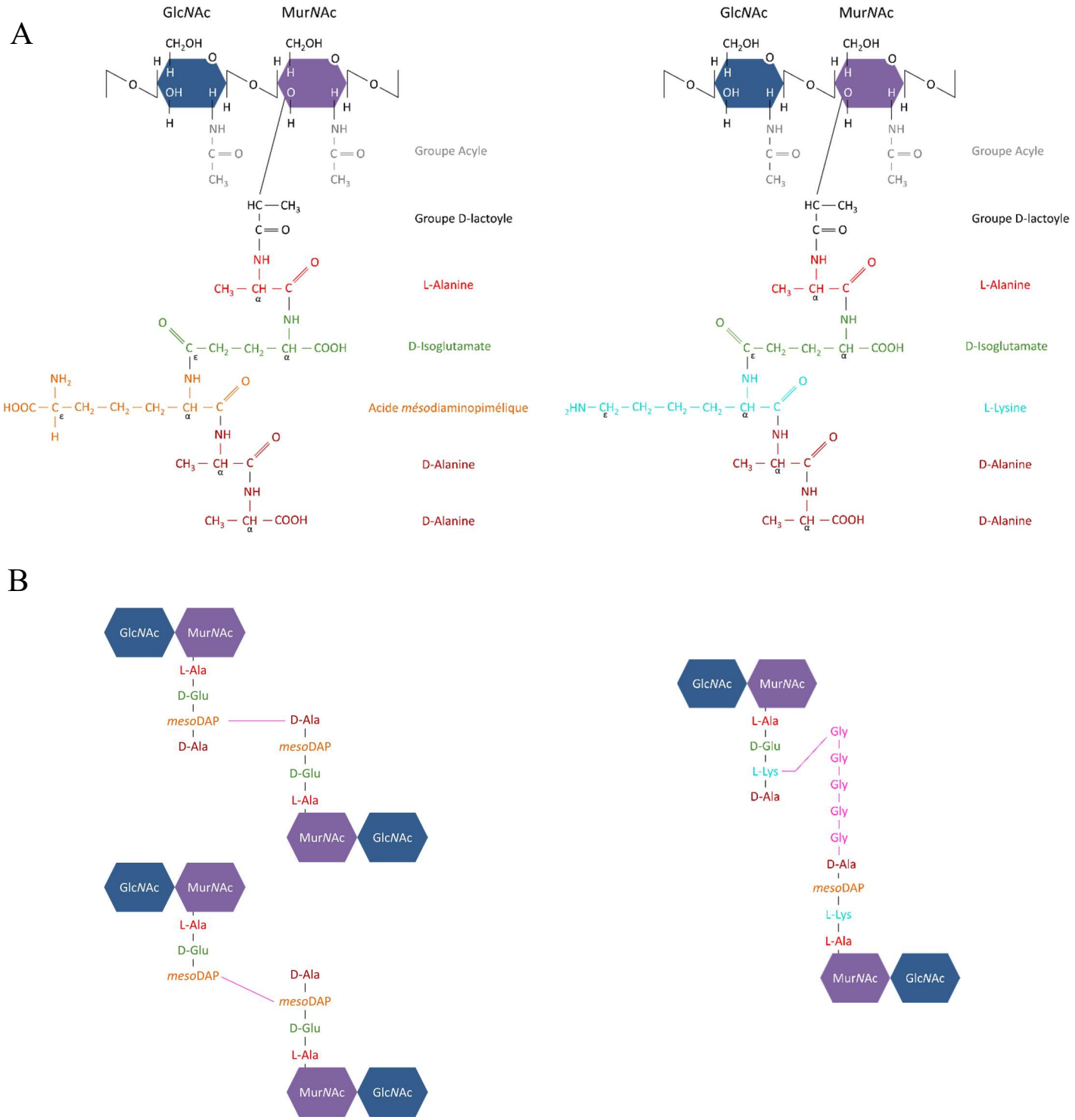


Figure 2 | Structure d'un résidu de peptidoglycane et réticulation des tiges peptidiques. (A) Structure du peptidoglycane (PG) des bactéries à Gram négatif à gauche et à Gram positif à droite. Le PG est un polymère rigide composé de répétitions alternées de deux résidus saccharidiques ; le N-acétyl-glucosamine (Glc*N*Ac) et l'acide N-acétyl-muramique (Mur*N*Ac) liés entre eux par des liaisons osidiques de type β(1→4). Le groupe D-lactoyle de chaque résidu MurNAc est substitué par un pentapeptide. L'acide *méso*diaminopimélique (*meso*DAP) est un acide aminé non conventionnel dérivant de la Lysine. (B) Réticulation des tiges peptidiques du peptidoglycane. A gauche, au-dessus réticulation de type 4, 3 et en-dessous réticulation de type 3, 3 d'*E. coli* une bactérie à Gram négatif. A droite, réticulation avec un pont de cinq glycine de *S. aureus* une bactérie à Gram positif.

La ME est imperméable aux protéines et aux grandes molécules. Elle agit comme une barrière efficace régulant l'entrée et la sortie de diverses molécules, telles que les antibiotiques lipophiles et les nutriments. La ME empêche également la diffusion dans l'environnement des protéines périplasmiques. À l'instar de la MC, la ME comprend aussi des protéines. Certaines sont des porines ; des protéines transmembranaires en forme de tonneau β, pouvant être trimériques (composées de trois polypeptides identiques). Les porines permettent l'entrée de petites molécules. Les porines non spécifiques forment des canaux par lesquels peuvent passer pratiquement toutes les petites molécules hydrophiles. En revanche, les porines spécifiques contiennent un site de liaison pour une substance ou un groupe de substances structurellement apparentées. Elles permettent le transport de molécules spécifiques. C'est par exemple le cas de LamB, qui est spécifique pour le transport du maltose et d'autres disaccharides semblables (Wang et al. 1997). Enfin, la ME comprend aussi des transporteurs Ton-B dépendants. Ces transporteurs ont aussi une structure en tonneau β, mais un bouchon permet d'ouvrir le canal pour un ligand spécifique grâce à l'énergie transmise par la protéine TonB depuis la MC (Yamashita and Buchanan 2010). Ces récepteurs TonB-dépendants permettent un transport contre le gradient de concentration ; par exemple pour le Fe^{3+} ou la vitamine B_{12}.

3. Le peptidoglycane

Le PG, situé entre les deux membranes des bactéries à Gram négatif, est un composant essentiel de la paroi de la plupart des bactéries. Ces fonctions principales sont le maintien de l'intégrité de la paroi, de la forme cellulaire et de protéger les bactéries de la lyse osmotique.

Certains composants de la paroi bactérienne utilisent le PG comme support d'ancrage, tels que la lipoprotéine de Braun (Lpp) présente dans la ME d'*Escherichia coli* ou les acides teichoïques chez les bactéries à Gram positifs. La Lpp est une protéine trimérique constituée d'hélices α enroulées (forme de *coiled coils*). Lpp est ancré dans le feuillet interne de la ME grâce à trois chaînes acyles attachées au résidu cystéine N-terminal de ces hélices (Braun and Bosch 1972). Le résidu de lysine en C-terminal de Lpp, est lié de façon covalente au PG (Magnet et al. 2007).

Les acides téichoïques sont incrustés dans le PG et certains sont liés de façon covalente aux lipides membranaires en plus du PG. Ces molécules complexe sont appelés acides lipotéichoïques (figure 1B). Le PG est également impliqué dans les processus de croissance et de division cellulaire (Vollmer, Blanot, and de Pedro 2008).

3.1. Structure du peptidoglycane

Le PG est un grand polymère rigide composé de répétition alternée de deux résidus saccharidiques ; le N-acétyl-glucosamine (Glc*N*Ac) et l'acide N-acétyl-muramique (Mur*N*Ac) liés entre eux par des liaisons osidiques de type β(1→4). Ces liaisons sont réalisées par des enzymes appelées transglycosylases. Le groupe D-lactoyle de chaque résidu Mur*N*Ac est substitué par un pentapeptide, appelé tige peptidique (figure 2A). Chez la plupart des bactéries à Gram négatif, la tige peptidique est constituée de L-Alanine[1], D-isoGlutamate[2], acide mésodiaminopimélique[3], D-Alanine[4], D-Alanine[5]. L'acide *méso*diaminopimélique (*meso*DAP) est un acide aminé non conventionnel dérivant de la Lysine : le carbone ε possède un groupe carboxyle supplémentaire. Chez les bactéries à Gram positif la séquence peptidique est similaire, cependant le *meso*DAP est substitué par une Lysine (tableau 1) (Vollmer, Blanot, and de Pedro 2008).

Les tiges peptidiques présentes dans le PG mature varient par leurs tailles ou par le type de réticulation. Les réticulations formées au sein de différentes chaînes de glycane induisent une résistance accrue du PG (Vollmer, Blanot, and de Pedro 2008).

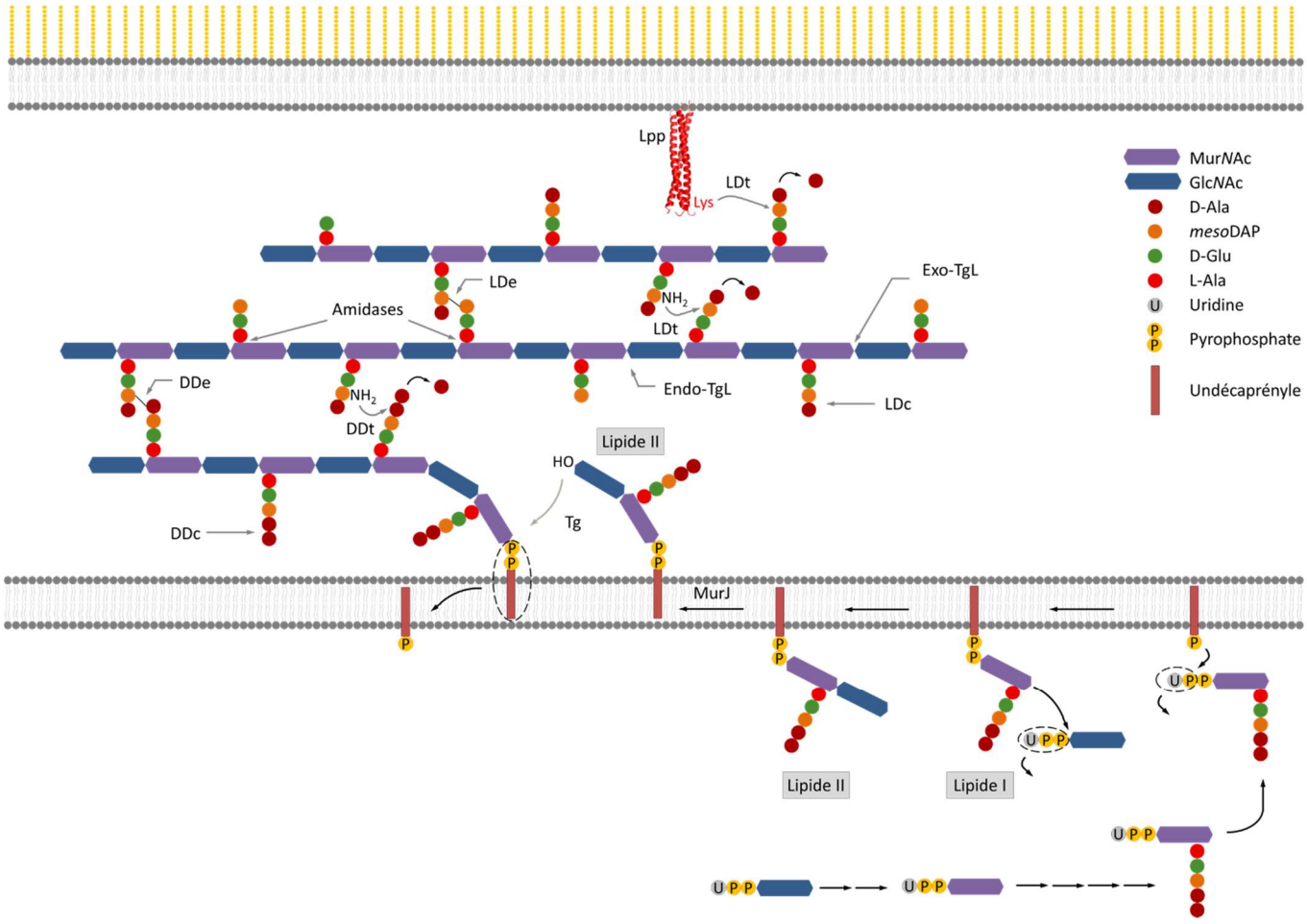


Figure 3 | Synthèse et clivage du peptidoglycane chez *E. coli* une bactérie Gram négatif. Les monomères Glc*N*Ac et Mur*N*Ac sont synthétisés dans le cytoplasme à partir de l'uridine diphosphoglucose. Les acides aminés sont ajoutés séquentiellement sur le monomère UDP-Mur*N*Ac ; L-Ala, D-Glu, *meso*DAP et pour finir les deux derniers acides aminés sont ajoutés sous forme d'un dipeptide (D-Ala – D-Ala). L'UDP-Mur*N*Ac-pentapeptide se lie à l'undécaprényle pyrophosphate formant un complexe appelé lipide I. L'UDP-Glc*N*Ac se lie au résidu Mur*N*Ac formant ainsi le complexe lipide II. Celui-ci traverse la membrane cytoplasmique suite à l'action des protéines de la famille MurJ. Le disaccharide précurseur se situant dans le périplasme est facilement disponible pour les transglycosylases (Tg) qui permettent de former les liaisons glycosidiques entre le lipide II et les chaines de glycanes. Les tiges peptidiques sont ensuite réticulées par des D,D-transpeptidases (DDts, formant les réticulations 4, 3) ou des L,D-transpeptidases (LDts, formant les réticulations 3, 3). La formation de la liaison covalente entre le PG et la Lpp (ancrée en ME) est catalysée par une LDt. Le clivage dans les tiges peptidiques est réalisé par les D,D- et L,D-carboxypeptidases (DDc et LDc). Les D,D- et L,D-endopeptidases (DDe et LDe) permettent de cliver les réticulations entre les tiges peptidiques de différents résidus de PG. Les tiges peptidiques des chaînes glycaniques sont éliminées par les amidases, telle que l'amidase N-acétylmuramyl-L-alanine. Les transglycosylases lytiques exo- ou endo- spécifiques (exo-TgL ou endo-TgL) clivent les liaisons glycosidiques dans le saccule du PG préexistant.

Inspirée de Typas et al. (2012).

Chez les bactéries à Gram négatif, il existe deux types de réticulations au sein des tiges peptidiques. Les réticulations 4, 3 se forment entre le résidu D-Ala en quatrième position, et le *meso*DAP en troisième position, de deux tiges peptidiques. Les réticulations 3, 3 s'effectuent entre deux résidus *meso*DAP en troisième position de deux tiges peptidiques(figure 2B, à gauche) (Vollmer, Blanot, and de Pedro 2008). Ces deux types de réticulations sont formées par des transpeptidases, détaillées au point 4.

Les réticulations des tiges peptidiques chez les bactéries à Gram positif contiennent souvent un pont peptidique entre les tiges peptidiques du PG. Les types de ponts, le nombre ainsi que la nature des acides aminés les constituants, varie selon les espèces. Par exemple, chez *Staphylococcus aureus* ce pont est constitué de cinq glycines (figure 2B, à droite).

3.2. Synthèse du peptidoglycane

La synthèse et la fixation d'un nouveau résidu de PG sur le saccule de PG préexistant, sont des processus dynamiques hautement coordonnés (figure 3). Les monomères Glc*N*Ac et Mur*N*Ac sont synthétisés dans le cytoplasme à partir de l'uridine diphosphoglucose. Les cinq acides aminés qui composent la tige peptidique sont ajoutés séquentiellement sur le monomère UDP-Mur*N*Ac. L'UDP-Mur*N*Ac avec la tige peptidique se lie ensuite à une molécule lipidique phosphorylée appelée undécaprényle pyrophosphate qui se situe dans le feuillet interne de la MC. L'UDP-Mur*N*Ac-pentapeptide et l'undécaprényle pyrophosphate forment un complexe appelé lipide I. Ensuite, l'UDP-Glc*N*Ac se lie au résidu Mur*N*Ac formant ainsi le complexe lipide II. Celui-ci traverse la MC grâce à l'action des protéines de la famille MurJ, permettant ainsi au disaccharide de se situer dans le périplasme (Sham et al. 2015). Ces précurseurs disaccharidiques présents dans le périplasme sont facilement disponibles pour la polymérisation du PG. Les transglycosylases permettent de former les liaisons glycosidiques entre un précurseur, appelé lipide II et les chanines de glycane du PG, libérant l'undécaprényle pyrophosphate. Différentes transglycosylases sont mentionnées ci-dessous. La maturation du PG est réalisée par la formation des réticulations entre les tiges peptidiques catalysées par les transpeptidases, décris plus bas dans ce travail. Les synthases périplasmiques peuvent être mono- ou bifonctionnelle présentant une activité transglycosylases et/ou une activité transpeptidase.

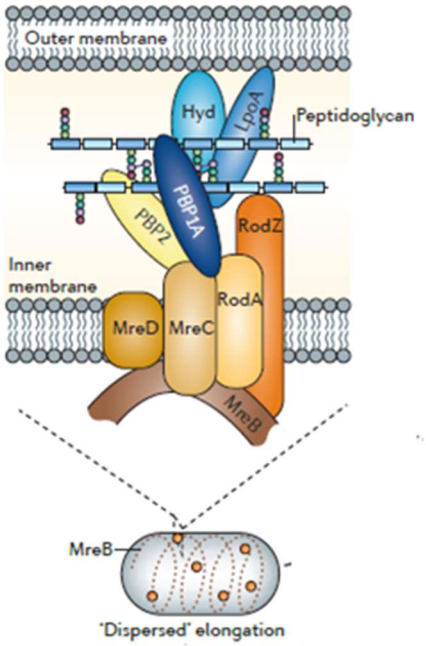
La dégradation du PG est importante pour permettre l'insertion des précurseurs, le renouvèlement et la formation du saccule de PG sans augmentation de son épaisseur. Les transglycosylases lytiques sont nécessaires pour rompre les liaisons glycosidiques dans le saccule de PG préexistant. Les amidases permettent d'éliminer les tiges peptidiques tandis que les endopeptidases clivent les réticulations entre les tiges peptidiques (figure 3). Ces hydrolases jouent également un rôle important dans le clivage du septum et la séparation des cellules filles lors de la division (Typas et al. 2012).

3.3. Le PG dans la division bactérienne

Une cellule bactérienne en croissance doit à la fois synthétiser le nouveau peptidoglycane et l'exporter dans le périplasme. Le remodelage et la dynamique de la biosynthèse du PG sont essentiels à la croissance et à la division bactérienne. Différents éléments du cytosquelette bactérien permettent de guider la synthèse et l'insertion du PG dans les différentes phases du cycle cellulaire (Typas et al. 2012; Cameron et al. 2014).

La protéine MreB, semblable aux filaments d'actine, délimite la forme en bâtonnet des bactéries. MreB forme un simple cytosquelette composé de filaments situés à la surface interne de la MC et permet le recrutement d'autres protéines impliquées dans la croissance de la paroi cellulaire. Les structures filamenteuses formées par MreB ne sont pas statiques, mais peuvent se déplacer d'un côté à l'autre de la bactérie. Les filaments MreB entrent en contact avec la MC

A



B

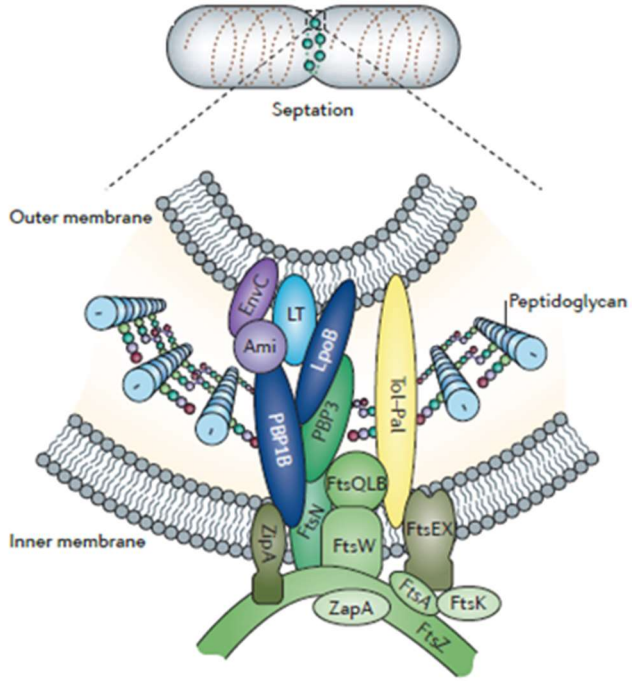


Figure 4 | Complexes de synthèse du peptidoglycane à différents stades du cycle cellulaire d'*Escherichia coli*. (A) Le schéma représente l'élongasome. MreB et les protéines membranaires associées permettent l'insertion latérale par dispersion des résidus nouvellement synthétisés de PG. La transpeptidase PBP2 et la glycosyltransférase-transpeptidase PBP1a ou RodA permettent l'insertion des résidus de PG. Les protéines secondaires telles que MreCD, permettent la localisation du complexe. (B) Le schéma représente le divisome. Le divisome est un site d'insertion septale des résidus de PG afin d'induire la division cellulaire et la séparation des cellules filles. Le complexe de division cellulaire se localise grâce à FtsZ et d'autres protéines de division cellulaire, FtsA, ZipA, FtsQLB et FtsN. L'insertion est induite par la transpeptidase PBP3, la glycosyltransférase-transpeptidase PBP1b ou FtsW. Les protéines du complexe Tol-Pal, les amidases (Ami) et leurs activateurs (EnvC), permettent la constriction de la membrane externe. L'activité des PBP est régulée en partie par les lipoprotéines ancrées dans la membrane externe telles que LpoA et LpoB. LT est un transglycosylase lytique qui permet l'ouverture du saccule de PG afin de permettre l'insertion de nouveaux résidus de PG (Typas et al. 2012).

permettant l'insertion latérale par dispersion du PG. Cela induit l'allongement de la bactérie et permet la formation d'une nouvelle paroi cellulaire à plusieurs endroits le long (Vollmer and Bertsche 2008; Cameron et al. 2014).

Chez *E. coli* un complexe d'élongation, l'élongasome, permet l'insertion par dispersion latérale, de résidus nouvellement synthétisés de PG dans les parois latérales de l'enveloppe. L'élongasome est composé de la transpeptidase PBP2 (*Penicillin-Binding Proteins*), de la glycosyltransférase-transpeptidase PBP1a ou RodA et d'autres protéines secondaires telles que MreCD. (figure 4A) (Vollmer and Bertsche 2008; Meeske et al. 2016).

Dans les bactéries plusieurs protéines sont essentielles dans la division septale. Ces protéines sont appelées Fts. La plus importante pour la fission binaire est FtsZ, une protéine homologue à la tubuline. Les protéines Fts interagissent dans la cellule pour former un complexe de division, appelé le divisome. La formation du divisome commence par la fixation des molécules de FtsZ en anneau autour du centre de la cellule. L'anneau FtsZ, une fois formé, attire les autres protéines du divisome telles que FtsA et ZipA, qui favorisent l'ancrage et la stabilisation de l'anneau à la MC (Vollmer and Bertsche 2008).

Le divisome est un site d'insertion septale du PG afin d'induire la division cellulaire et la séparation des cellules filles. Chez *E. coli*, l'insertion septale du PG est induite par la transpeptidase PBP3, la glycosyltransférase-transpeptidase PBP1b ou FtsW et des enzymes de remodelage du PG (figure 4B) (Vollmer and Bertsche 2008; Taguchi et al. 2019).

Dans les bactéries sphériques ou cocci, la nouvelle paroi cellulaire se construit dans des directions opposées de l'anneau FtsZ. Tandis que dans les bactéries en forme de bâtonnets ou bacilles, la nouvelle paroi cellulaire se développe à plusieurs endroits. Les disaccharides de PG nouvellement synthétisés peuvent s'insérer latéralement de manière dispersée dans la longueur de la cellule ou à un point précis de la paroi bactérienne, comme le pôle de croissance ou le septum (figure 5) (Vollmer and Bertsche 2008; Cameron et al. 2014). La croissance polaire par exemple a été mise en évidence pour une série de bactéries à Gram positif, telles que *Corynebacterium glutamicum* (Letek et al. 2008), *Streptomyces coelicor* (Thanky, Young, and Robertson 2007) et *Mycobacterium tumefaciens* (Flärdh 2003).

La croissance polaire est une stratégie utilisée notamment par l'ensemble des Rhizobiales un ordre d'α-protéobactéries (Brown et al. 2012). Leur croissance unipolaire forme une ancienne et nouvelle cellule de taille similaire. Cependant, certains facteurs d'asymétries sont présents dans l'enveloppe bactérienne, tels que la production de polysaccharide, qui joue le rôle d'adhésine permettant l'attachement unipolaire au vieux pôle de *Agrobacterium tumefaciens*. (Cameron et al. 2014).

4. Transpeptidation lors de la biosynthèse du peptidoglycane

La maturation du PG est entre autre réalisée par la transpeptidation qui forme les réticulations des tiges peptidiques entre les Mur*N*Ac de chaînes glycaniques adjacentes. Ces liens assurent la résistance structurale du PG.

Chez les bactéries à Gram négatif, les réticulations de types 4, 3 se forment entre le groupe carboxyle du résidu D-Ala en quatrième position, et l'amine secondaire ε du *meso*DAP en troisième position de la tige peptidique (figure 6). Cette réaction est catalysée par des D,D-transpeptidases (DDts). La réaction de réticulation 4, 3 commence par une attaque nucléophile du groupe carboxyle (-COOH) de la D-Ala (4), par l'oxygène du groupe hydroxyle (-OH) de la sérine catalytique de la DDt. Cette réaction conduit à la libération du dernier résidu, D-Ala de la tige peptidique. Ensuite, le groupement carbonyle (-C=O) de la D-Ala (4) est attaqué par

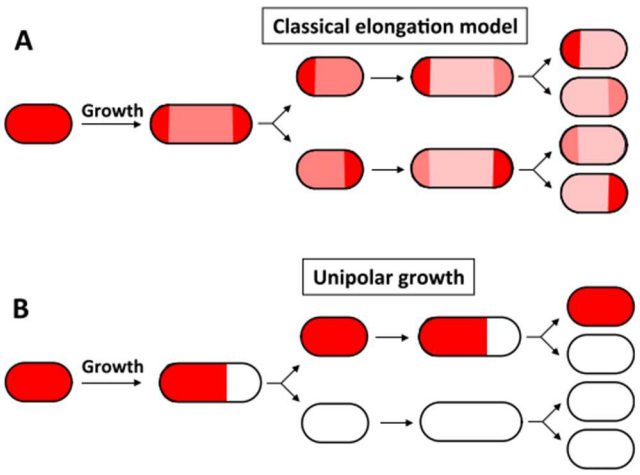


Figure 5 | Comparaison entre la croissance non polaire et unipolaire des bactéries. (A) Dans le cas de l'allongement classique, l'enveloppe nouvellement synthétisée s'insère latéralement de manière dispersée dans la longueur de la cellule. (B) La croissance unipolaire des α-protéobactéries de l'ordre des Rhizobiales forme une ancienne et une nouvelle cellule de taille similaire présentant certains facteurs asymétriques. Rouge foncé, matériau de l'enveloppe précédente ; blanc, matériau de l'enveloppe nouvellement incorporé et rouge clair, vieux et nouveaux matériaux de l'enveloppe avec une distribution homogène (Van Der Henst et al. 2013).

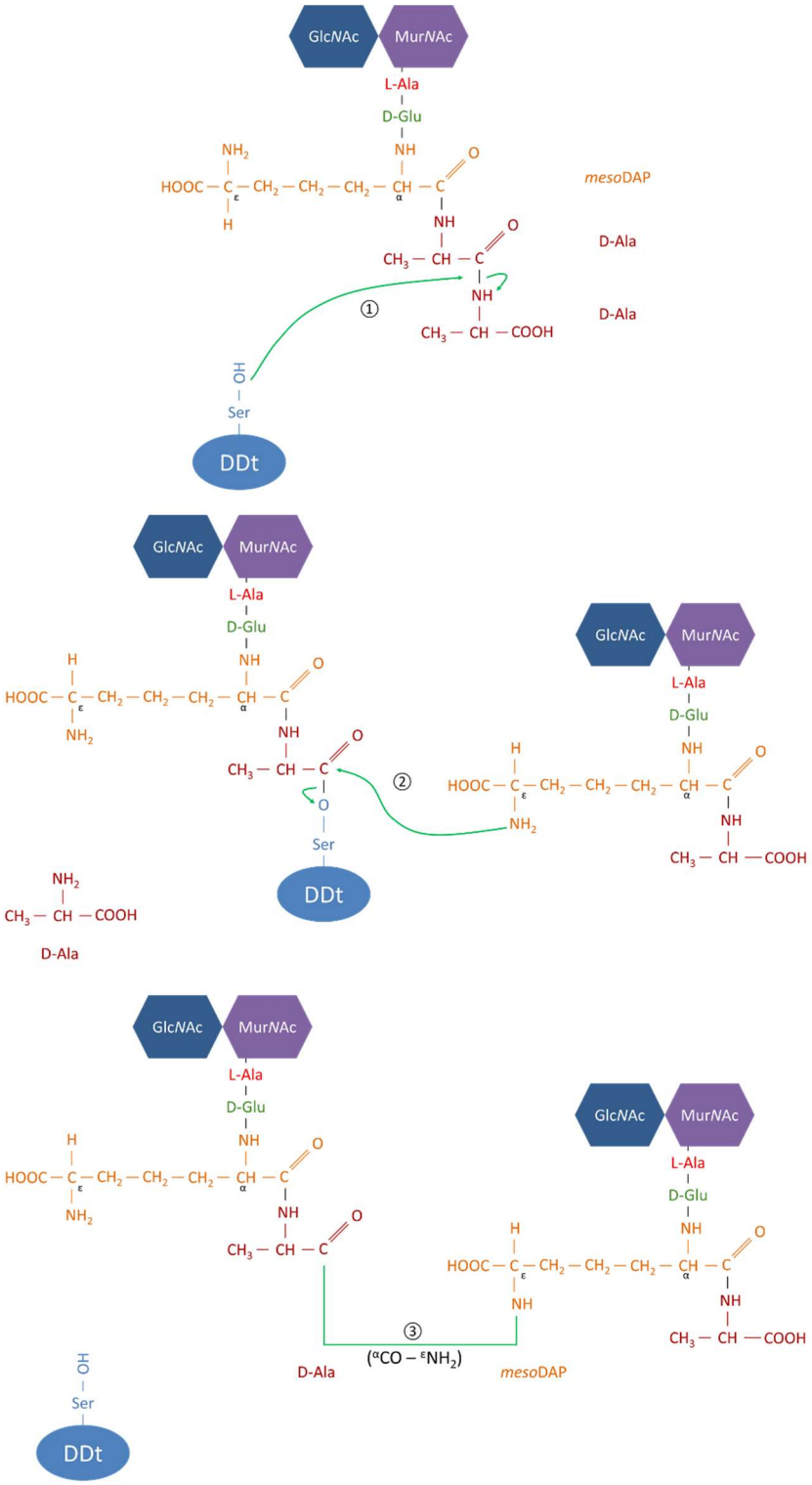


Figure 6 | Réactions de réticulations de type 4, 3 dans les bactéries à Gram négatif. Réaction de la D,D-transpeptidase formant une réticulation de type 4, 3. La réaction débute par l'attaque nucléophile ① du groupement carbonyle de D-Ala du substrat donneur par l'oxygène du groupement hydroxyle de la serine catalytique conduisant à la libération de la D-Ala et à la formation d'une molécule intermédiaire. Le groupement carbonyle de D-Ala ou de *meso*DAP est ensuite attaqué ② par le groupement amine ε du *meso*DAP du substrat accepteur menant à la formation d'une liaison covalente ③ et à la libération de la transpeptidase (Mainardi et al. 2007).

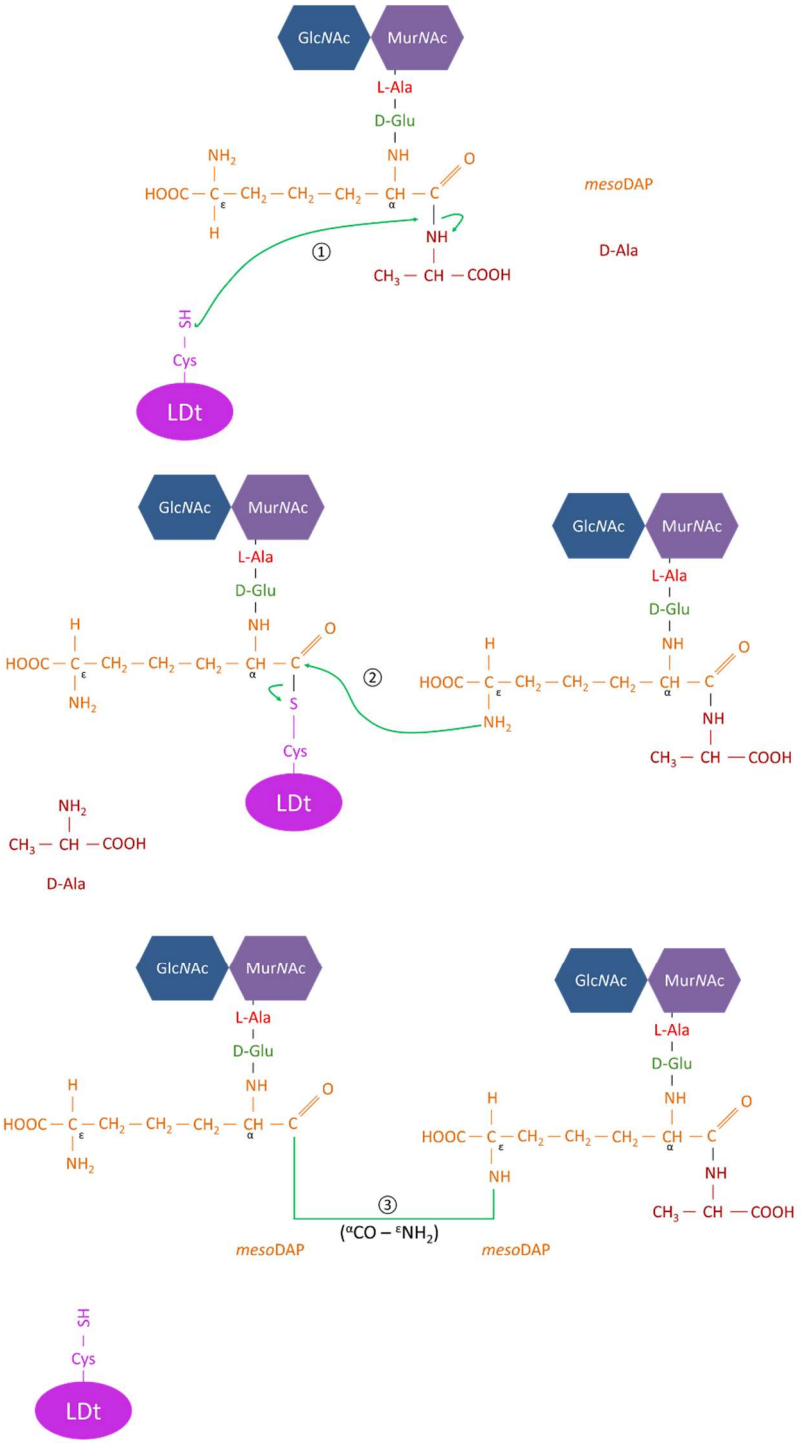


Figure 7 | Réactions de réticulations de type 3, 3 dans les bactéries à Gram négatif. Réaction de la L,D-transpeptidase formant une réticulation de type 3, 3. La réaction débute par l'attaque nucléophile ① du groupement carbonyle de D-Ala du substrat donneur par le soufre du groupement sulfhydryle de la cystéine catalytique conduisant à la libération de la D-Ala et à la formation d'une molécule intermédiaire. Le groupement carbonyle de D-Ala ou de *meso*DAP est ensuite attaqué ② par le groupement amine ε du *meso*DAP du substrat accepteur menant à la formation d'une liaison covalente ③ et à la libération de la transpeptidase (Mainardi et al. 2007).

l'amine ε (-NH_2) du résidu *meso*DAP (3), menant à la formation d'une liaison covalente de type 4, 3 (J.-L. Mainardi et al. 2007; Vollmer, Blanot, and de Pedro 2008).

Les DDts, aussi appelées *Penicillin-Binding Proteins* (PBPs) ont été initialement identifiées par leur capacité à lier la pénicilline de façon covalente. Les antibiotiques β-lactames sont des analogues structuraux de l'extrémité D-Ala (4), D-Ala (5) du pentapeptide du PG reconnu par les DDts. Une molécule β-lactame se liant à une DDt agit comme un substrat suicide : il occupe le site catalytique en s'y liant de façon covalente et empêche donc la DDt de catalyser d'autres réactions (J.-L. Mainardi et al. 2007). La diminution de réticulations au sein du PG engendrée par l'inactivation des DDts affaiblit l'intégrité de la paroi bactérienne. Les hydrolases étant toujours actives, un déséquilibre est créé et mène à une fragilisation structurale de la paroi pouvant conduire à la lyse bactérienne (J.-L. Mainardi et al. 2007).

Au cours des dernières décennies, de nombreuses bactéries ont acquis des résistances aux antibiotiques. Les infections de ces bactéries résistantes deviennent difficiles à traiter. Il est donc primordial de les étudier afin de comprendre leurs mécanismes de résistance. Certaines bactéries à Gram négatifs présentent une résistance aux antibiotiques β-lactames. Des analyses structurales du PG de certaines de ces bactéries indiquent une augmentation des réticulations de type 3, 3 (J. Mainardi et al. 2000). Ces liens sont formés par des L,D-transpeptidases (LDts) (J. Mainardi et al. 2005) entre le groupe carboxyle α et l'amine ε de deux *meso*DAP (3) de tiges peptidiques différentes (figure 7). Les LDts reconnaissent exclusivement les tiges peptidiques du PG sous forme de tétrapeptide. Ce tétrapeptide est généré via l'action de D,D-carboxypeptidases telles que PBP5, PBP6a et PBP6b, clivant la tige peptidique entre les deux résidus D-Ala (Cremniter et al. 2006; Morè et al. 2019). La réaction de réticulation 3, 3, s'effectue comme celle de type 4, 3. Elles commencent par une attaque nucléophile. Toutefois, le groupement catalytique des LDts est une cystéine et non une sérine comme les DDts. Ce sera donc le groupement sulfhydryle (-SH) qui induira l'attaque du carboxyle. En raison de leur différence de site catalytique et de substrat, les LDts sont résistantes aux antibiotiques β-lactame (J. Mainardi et al. 2005). Cependant, l'imipénème, une carbapénème, une classe spécifique des β-lactames, peut inactiver les LDts par acylation de la cystéine catalytique. L'imipénème, comme les autres antibiotiques β-lactame, est aussi capable de se lier au site catalytique conservé des DDts, (J.-L. Mainardi et al. 2007).
Les réticulations de type 4, 3 et de type 3, 3 sont présentes dans le PG des bactéries à Gram négatif. La proportion de chaque type de réticulation varie en fonction de l'espèce. Par exemple, les réticulations de types 3, 3 représentent plus de 50% des réticulations dans le PG de *Agrobacterium tumefaciens* et de *Sinorhizobium meliloti*, toutes deux, des α-protéobactéries Rhizobiales (Cameron et al. 2014). Chez *Escherichia coli*, une γ-protéobactérie, les réticulations 3, 3 représentent seulement 3 % de toutes les réticulations lors de la phase exponentielle, et 10 % en phase stationnaire de culture (Pisabarro, De Pedro, and Vazquez 1985). Plus la proportion de réticulation de type 3, 3 dans le PG est grande, plus la bactérie sera résistante aux β-lactames (Cameron et al. 2014).

Chez *E. coli*, certaines LDts catalysent l'ancrage de la lipoprotéine de Braun (Lpp) au PG plutôt que les réticulations de type 3, 3. La liaison se forme entre l'amine ε de la lysine C-terminale de la Lpp et le groupe carbonyle α du *meso*DAP[3]

5. Le modèle *Escherichia coli*

Escherichia coli fait partie des γ-protéobactéries. Par son étude approfondie, elle représente un des modèles de bactéries à Gram négatif de par son étude approfondie. C'est un bacille aérobique facultatif.

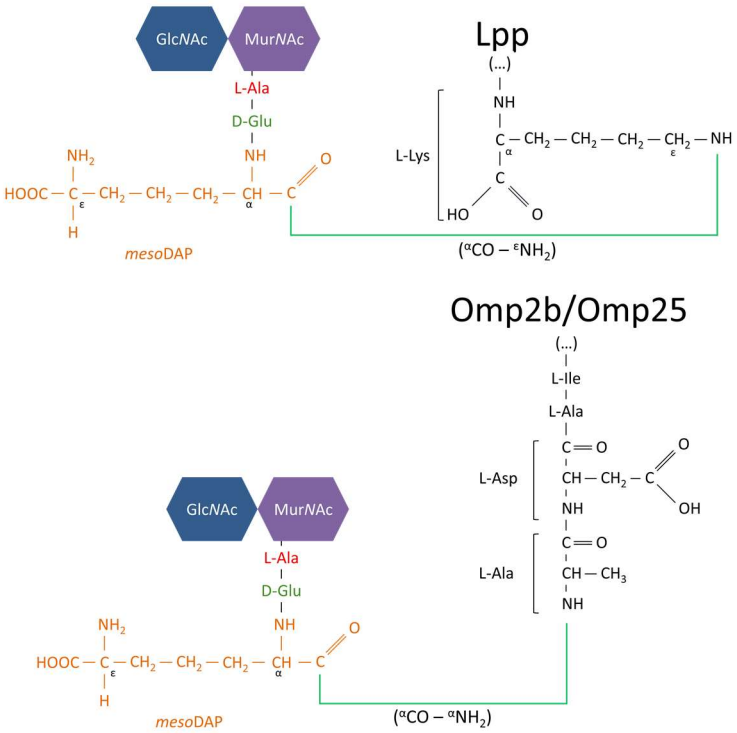


Figure 8 | Modèle des liaisons covalentes entre le PG et les protéines. Au-dessus, modèle de la liaison covalente (en vert) entre le PG et la lipoprotéine de Braun (Lpp) chez *Escherichia coli*. Cette liaison est formée par des L,D-transpeptidases : LDtA, LDtB et LDtC (Magnet et al. 2007). En-dessous, modèle hypothétique de la liaison (en vert) entre le PG et les OMPs de *Brucella abortus*. Cette liaison serait formée par des L,D-transpeptidases : $LDt_{Ba}1$, $LDt_{Ba}2$ et $LDt_{Ba}4$ (P. Godessart, manuscrit en préparation).

Sa croissance est longitudinale induite par l'élongasome et sa division septale induite par le divisome (de Pedro et al. 1997).

Chez *E. coli*, six LDts ont été identifiées. LDtD (YcbB), LDtE (YnhG) et LDtF permettent la formation des réticulations 3, 3 entre deux résidus *meso*DAP (3) dans le PG (Morè et al. 2019). Les trois autres LDts identifiées, à savoir LDtA (ErfK), LDtB (YbiS) et LDtC (YcfS), sont des enzymes induisant l'attachement de la Lipoprotéine de Braun (Lpp) au PG. La liaison covalente de Lpp au PG a été identifiée pour la première fois en 1969 et sa séquence a été obtenue en 1972 (Braun et Rehn 1969 ; Braun et Bosch 1972). L'amine ε du résidu lysine en C-terminal de Lpp forme une liaison covalente avec le groupe carboxyle α du résidu *meso*DAP du PG (figure 8) (Magnet et al. 2007). Ces liaisons permettent un lien solide entre la ME et le PG, favorisant de manière importante l'intégrité de la paroi cellulaire. Il a également été montré que Lpp permet une taille homogène du périplasme d'environ 25 nm (Asmar et al. 2017).

Lorsque Lpp est délétée, la taille du périplasme devient irrégulière. Ces mutants forment de *blebs*; des vésicules de ME apparaissant sur le périmètre des bactéries (Asmar et al. 2017). Lorsque la taille de Lpp est augmentée, par ajout d'acides aminés, la taille du périplasme est augmentée uniformément. Ces derniers mutants ne présentent aucun défaut de croissance dans les conditions de laboratoire (Asmar et al. 2017).

Il a été démontré que la distance entre la MC et le ME est cruciale pour la fonction et la régulation du système de réponse aux stress Rcs. La lipoprotéine RcsF, ancrée au feuillet interne de la ME, est un senseur de stress pouvant transférer des signaux à IgaA, située dans la MC. Cette communication est uniquement possible lorsque la taille du périplasme permet l'interaction RcsF-IgaA. Ainsi, la taille du périplasme a une importance physiologique pour l'architecture cellulaire et l'efficience des complexes protéiques transmembranaires (Asmar et al. 2017).

6. Les α-protéobactéries

Les Rhizobiales font partie des α-protéobactéries, un autre phylum des Protéobactéries au même titre que les γ-protéobactéries (figure 9). Les Rhizobiales sont des bactéries à Gram négatif que l'on retrouve dans diverses niches écologiques. Ces bactéries peuvent être en symbiose ou être pathogènes, extra- ou intracellulaires, facultatives ou obligatoires. Par exemple, les Brucellaceae, une famille des Rhizobiales, sont des bactéries pathogènes intracellulaires facultatives pour de nombreuses espèces animales et pour l'homme. Plus particulièrement, *Brucella abortus* est responsable de la brucellose bovine (Cloeckaert et al., 1996). Néanmoins, les Brucellaceae comprennent *Ochrobactrum*, un genre de bactéries du sol, résistantes à de nombreux antibiotiques. Les Rhizobiacae, une autre famille des Rhizobiales, sont des bactéries qui influencent le développement des plantes. *Agrobacterium tumefaciens*, un modèle de l'ordre des Rhizobiales, est un pathogène extracellulaire capable de transférer un segment défini d'ADN, l'ADN-T, induisant la galle du collet lors d'infection des tissus végétaux blessés (Holsters et al., 1980).

La division asymétrique et la croissance unipolaire sont des caractéristiques communes à l'ordre des Rhizobiales (Brown et al. 2012). Pendant l'allongement cellulaire, la synthèse du PG se produit au pôle de croissance et est redirigée vers le centre de la cellule durant la phase prédivisionnelle afin de permettre la formation du septum. Cela conduit à une distribution asymétrique des composants de l'enveloppe (Grangeon et al. 2015). En effet, certains composants de l'enveloppe de *B. abortus*, tels que le LPS et deux protéines de la membrane externe (Omp2b et Omp25) ont une distribution asymétrique dans l'enveloppe. Leurs insertions sont majoritairement (~80%) polaire (Vassen et al. 2019). Après la division, une des cellules filles est composée principalement de nouveaux composants tandis que l'autre conserve les

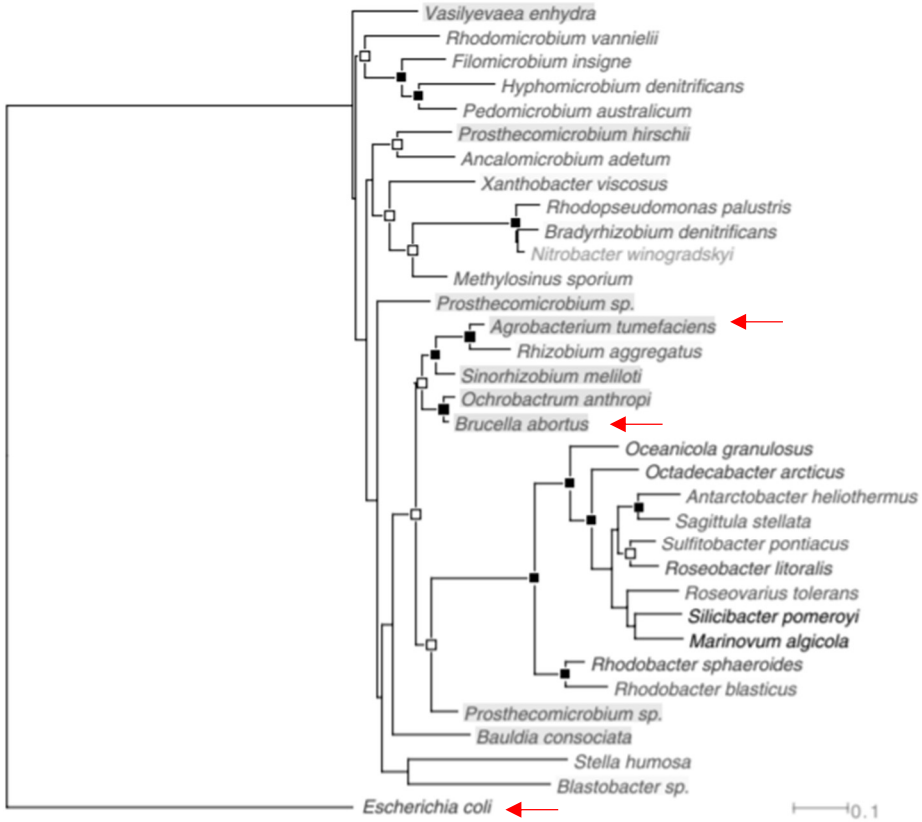


Figure 9 | Phylogénie des séquences d'ARNr 16S. Les flèches rouges indiquent *Brucella abortus*, *Agrobacterium tumefaciens* et *Escherichia coli*. Cet arbre phylogénétique indique la distance des différentes α-protéobactéries par rapport à *E. coli* une γ-protéobactérie. La barre d'échelle indique le nombre estimé de substitutions par site (Brown et al. 2012).

anciens composants. Dans ces cellules filles, la synthèse du PG se poursuit au nouveau pôle pour permettre l'allongement cellulaire. Les protéines FtsZ et FtsA suivent le même schéma de localisation durant le cycle cellulaire (Grangeon et al. 2015).

De précédentes études indiquent qu'aucune protéine homologue à la Lpp n'est exprimée chez *A. tumefaciens* (Brown et al. 2012) ainsi que chez *Caulobacter crescentus* (Takacs et al. 2010). Cela suggère qu'il s'agit d'une caractéristique commune des α-proteobactéries. Brown et al ont aussi proposé qu'aucune lipoprotéine n'est liée de façon covalente au PG de *A. tumefaciens*. Étant donné que chez *E. coli* la Lpp joue un rôle important dans la physiologie de la bactérie et l'intégrité de l'enveloppe, une question se pose sur les structures qui peuvent garantir l'intégrité de l'enveloppe des α-proteobactéries.

6.1. L'enveloppe de *Brucella abortus*

La ME de *B. abortus* contient des lipopolysaccharides (dans le feuillet externe), des phospholipides (dans le feuillet interne) et des protéines. Les protéines majeures de la membrane externe (*Outer Membrane Protein*, OMPs) ont d'abord été identifiées par extraction au détergent (SDS) et organisées en trois groupes. Les OMPs ont été classées en fonction de leur poids moléculaire (PM) apparent. Les OMPs du groupe 1 ont un PM avoisinant les 88 - 94 kilos Dalton (kDa). Les porines Omp2a et Omp2b constituent le groupe 2 et ont un PM d'environ 36 - 38 kDa par monomère. L'Omp31-like et l'Omp25 appartiennent au groupe 3 avec un PM d'environ 31 - 34 kDa et 25 - 27 kDa respectivement (Cloeckaert et al.,1996). Une étude a indiqué que l'Omp25 et l'Omp2b de *B. abortus* sont les deux OMPs majeures de la ME (Dubray and Charriaut 1983). L'Omp2b est essentielle et les analyses d'homologie prédisent qu'il s'agit d'une porine en tonneau β de 16 feuillets, trimérique dans la ME (Laloux et al. 2010). Cette porine est impliquée dans l'absorption des nutriments (Paquet et al. 2001). La fonction de l'Omp25, protéine non essentielle, n'est pas encore connue, mais il a été rapporté qu'elle permet la génération de vésicules de membrane externe en conditions acides chez *Brucella suis* (Boigegrain et al. 2004). Cette protéine à une prédiction structurelle de tonneau β de 8 feuillets (Moreno and Moriyón 2006).

Au sein du laboratoire, *B. abortus* a été étudiée afin de comprendre la nature des interactions entre le PG et la ME en absence de Lpp. Le PG de *B. abortus* a été purifié sans traitement protéolytique afin de conserver les protéines étroitement liées au PG. Des analyses de spectrométrie de masse (MS) ont permis d'identifier différentes OMPs liées au PG. L'Omp2b, l'Omp25, l'Omp25c, l'Omp31-like et l'OmpW-like ont été identifiées avec un nombre élevé de spectres. Il est intéressant de noter que les séquences peptidiques analysées à partir des spectres de MS montrent que ces protéines ont une bonne couverture de séquence. La séquence N-terminale de ces OMPs est identifiée comme des peptide hybrides liés de façon covalente au *meso*Dap du PG (P. Godessart, manuscrit en préparation).

La prédiction de structure de ces cinq OMPs est en tonneau β avec une extension N-terminale du côté périplasmique de 17 à 32 acides aminés. Chez *B. abortus*, les OMPs matures liées au PG commencent par un tétrapeptide conservé (ADAI), se localisant juste après leur peptide signal. La première alanine de ce tétrapeptide semble former une liaison covalente avec un résidu *meso*DAP du PG, semblable aux réticulations de types 4, 3 présentes dans le PG. Lors de la mutation de l'aspartate du tétrapeptide dans l'Omp25. Cette OMP n'est plus attachée au PG, bien que l'exportation soit conservée (figure 8). L'aspartate est donc crucial pour l'ancrage de cette OMP au PG. Ce tétrapeptide est conservé dans plusieurs autres Rhizobiales, suggérant des interactions similaires entre les OMPs et le PG (P. Godessart, manuscrit en préparation).

Parallèlement, 8 LDts de *B. abortus* ($LDts_{Ba}$) ont été identifiés par homologies avec les 5 LDts d'*E. coli*. Ces LDts ont été étudiées afin de déterminer celles capables de catalyser la réaction

de liaison entre les OMPs et le PG. Trois de ces huit $LDts_{Ba}$ ($LDt_{Ba}1$, $LDt_{Ba}2$ et $LDt_{Ba}4$) ont été identifiés comme favorisant la liaison covalente de l'Omp25 de *B. abortus* au PG dans le modèle *E. coli.* La $LDt_{Ba}4$ semble active dans la formation de la liaison covalente entre l'Omp25 ou l'Omp2b sur le PG de *B. abortus* tandis que les $LDt_{Ba}1$ et $LDt_{Ba}2$ ne semblent pas jouer un rôle majeur sur les OMPs dans les conditions testées (P. Godessart, manuscrit en préparation).

6.2. L'enveloppe d'*Agrobacterium tumefaciens*

Le PG d'*A. tumefaciens* a une composition plus complexe que le PG d'*E. coli*. Il contient une plus grande proportion de réticulations 3, 3 représentant environ 64 % des réticulations du PG (Brown et al. 2012). La biosynthèse du PG s'effectue par une croissance polaire à partir de son pôle de croissance, dans lequel se situe les protéines FtsZ, FtsA et PopZ (Grangeon et al. 2015; Zupan et al. 2019). Cameron et al. ont identifié par homologie, avec le génome d'*E. coli* et de *Caulobacter crescentus*, 14 LDts distinctes. Celles-ci pourraient par exemple expliquer la grande proportion de réticulations de types 3, 3 dans le PG d'*A. tumefaciens*.

OBJECTIFS

L'objectif principal de ce mémoire est de déterminer si les interactions OMP-PG, identifiées chez *B. abortus* ainsi que les protéines formant ces interactions, sont conservées dans les autres Rhizobiales. Pour ce faire nous avons étudié un organisme modèle de la famille des Rhizobiaceae, *Agrobacterium tumefaciens*.

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, plusieurs protéines de la ME de *B. abortus*, présentant une prédiction de structure en tonneau β, sont liés au *meso*DAP du PG par leur extrémité N-terminale. Ces protéines sont-elles conservées chez *A. tumefaciens* ? Ces protéines sont-elles liées au PG ? Si tel est le cas, ces protéines sont-elles liées de la même manière au PG ? La $Ldt_{Ba}4$ dont on a prouvé son rôle dans cette liaison chez *B. abortus*, présente-elle un ou plusieurs homologues chez *A. tumefaciens*?

La conservation éventuelle des découvertes réalisées chez *B. abortus* à un organisme homologue, *A. tumefaciens* en l'occurrence, pourrait montrer que le système d'interaction entre la ME et le PG est conservé au sein des Rhizobiales, tel que, suggéré par la conservation partielle de la séquence ADAI chez une grande variété de Rhizobiales.

Strains	Plasmid	Resistance	Outer marker
A. tumefaciens C58 GV3101	/	Rif - Genta	/
E. coli DH10B	pNPTs138	Kan	*sacB, lacZ*
E. coli DH10B	pBBR1	Cm	/
E. coli DH10B	pNPTs138::$ldt_{At}1$	Kan	*sacB, lacZ*
E. coli DH10B	pNPTs138::$ldt_{At}2$	Kan	*sacB, lacZ*
E. coli DH10B	pNPTs138::$ldt_{At}3$	Kan	*sacB, lacZ*
E. coli DH10B	pNPTs138::$ldt_{At}4$	Kan	*sacB, lacZ*
E. coli DH10B	pNPTs138::$ldt_{At}5$	Kan	*sacB, lacZ*
E. coli DH10B	pNPTs138::$ldt_{At}6$	Kan	*sacB, lacZ*
E. coli DH10B	pNPTs138::$ldt_{Ba}9$	Kan	*sacB, lacZ*
E. coli DH10B	pNPTs138::$ldt_{Ba}10$	Kan	*sacB, lacZ*
E. coli DH10B	pNPTs138::$ldt_{Ba}11$	Kan	*sacB, lacZ*
E. coli S17	pNPTs138::Δ$ldt_{Ba}9$	Kan	*sacB, lacZ*
E. coli S17	pNPTs138::Δ$ldt_{Ba}10$	Kan	*sacB, lacZ*
E. coli S17	pNPTs138::Δ$ldt_{Ba}11$	Kan	*sacB, lacZ*
E. coli DH10B	pNPTs138::$ldt_{At}1$_ pBBR1::*omp25*	Kan - Cm	*sacB, lacZ*
E. coli DH10B	pNPTs138::$ldt_{At}2$_ pBBR1::*omp25*	Kan - Cm	*sacB, lacZ*
E. coli DH10B	pNPTs138::$ldt_{At}3$_ pBBR1::*omp25*	Kan - Cm	*sacB, lacZ*
E. coli DH10B	pNPTs138::$ldt_{At}4$_ pBBR1::*omp25*	Kan - Cm	*sacB, lacZ*
E. coli DH10B	pNPTs138::$ldt_{At}5$_ pBBR1::*omp25*	Kan - Cm	*sacB, lacZ*
E. coli DH10B	pNPTs138::$ldt_{At}6$_ pBBR1::*omp25*	Kan - Cm	*sacB, lacZ*
E. coli DH10B	pNPTs138::$ldt_{Ba}9$_ pBBR1::*omp25*	Kan - Cm	*sacB, lacZ*
E. coli DH10B	pNPTs138::$ldt_{Ba}10$_ pBBR1::*omp25*	Kan - Cm	*sacB, lacZ*
E. coli DH10B	pNPTs138::$ldt_{Ba}11$_ pBBR1::*omp25*	Kan - Cm	*sacB, lacZ*
E. coli DH10B	pBBR1::*omp25*	Cm	/
E. coli DH10B	pNPTs138_ pBBR1::*omp25*	Kan - Cm	*sacB, lacZ*
E. coli DH10B	pNPTs138::$ldt_{Ba}4$_pBBR1::*omp25*	Kan - Cm	*sacB, lacZ*
E. coli DH10B	pBBR2	Kan	/
E. coli DH10B	pBBR2::*omp25*	Kan	/
A. tumefaciens C58 GV3101	pBBR2::*omp25*	Kan	/
E. coli DH10B	pNPTs138::*ropA2-3flag*	Kan	*sacB, lacZ*
B. abortus 544	Δ$ldt_{Ba}11$	/	/
B. abortus 544	Δ$ldt_{Ba}4$	/	/
B. abortus 544	Δ$ldt_{Ba}11$_pBBR1:: $ldt_{Ba}11$	/	/
B. abortus 544	Δ$ldt_{Ba}4$_pBBR1:: $ldt_{Ba}4$	/	/

Tableau 2 | Plasmides et souches

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Plasmides et souches

Les plasmides et les souches utilisés dans ce travail sont listés dans le tableau 2. *A. tumefaciens* C58 GV3101, et dérivés ont été cultivés dans un milieu riche 2YT (*Yeast Extract and Tryptone*) à 30°C sous agitation constante. *B. abortus* 544 et ses dérivés ont été cultivés dans du milieu TSB (*Tryptic soy broth*) à 37°C sous agitation constante. *E. coli* DH10B, S17-1 et dérivés ont été cultivés dans du milieu LB (Luria-Bertani) à 37°C sous agitation constante. Lorsque nécessaire, des antibiotiques ont été ajoutés aux milieux de culture aux concentrations suivantes : kanamycin, 10 ou 50 µg/mL pour la résistance génomique ou plasmidique respectivement ; chloramphenicole, 20 µg/mL et acide nalidixique, 25 µg/mL.

2. Extraction ADN

2.1. Génomique

10 mL de culture en phase stationnaire (DO_{600}~1,5) de *B. abortus* ou de *A. tumefaciens* ont été centrifugées à 19 000 x g pendant 1 minute. Le culot a été resuspendu dans 567 µL de TENa (Tris 50 mM pH 8, EDTA 50 mM, NaCl 0.1 M), 30 µL de SDS 10 % et 3 µL de protéinase K (20 mg/mL) et incubé durant la nuit à 37°C sous agitation constante. L'échantillon a été centrifugé à 15 850 x g pendant 10 minutes. Le surnageant a été récupéré et 100 µL d'isopropanol ont été ajouté. L'échantillon a été vortexé et centrifugé comme précédement indiqué. Le surnageant a été délicatement éliminé et 50 µL d'éthanol (-20°C) ont été ajoutés délicatement sur le culot. L'échantillon a été centrifugé toujours aux mêmes paramètres. Le culot a été ensuite séché à 65°C et resuspendu dans 20 µL d'eau stérile.

2.2. Plasmidiques

L'extraction d'ADN plasmidique s'est faite à l'aide du kit NucleoSpin® Plasmid EasyPure selon le protocole du fabricant au départ de 10 mL de culture en phase stationnaire (DO600~1,5) de *E. coli* DH10B.

3. PCR

Les amorces utilisées sont listées dans le tableau 3.

3.1. PCR préparatrice

Le mix PCR contient la polymérase Q5 Phusion® haute-fidélité (100X, New England Biolabs), du tampon de réaction Q5 5X et un tampon pour régions riche en GC 5X (New England Biolabs), des amorces sens et anti-sens (50X, 20 mM, Integrative DNA technology), de la solution de dNTP (12,5X, 5 mM chaque), ADN modèle (50X, ADN génomique de *B. abortus* ou d'*A. tumefaciens*) et d'eau pour obtenir un volume final de 50 µL. La Betaïne (1M, Merck) peut être utilisée pour l'amplification d'une séquence contenant une grande proportion de GC. Le programme PCR a été réalisé suivant les instructions du fabricant (New England Biolabs).

3.2. PCR jointive

La PCR jointive a été utilisée pour concaténer deux produits PCR par complémentarité de séquence. Le mix PCR est identique au mix de la PCR préparatrice. Cependant les amorces n'ont été ajoutée qu'après les 5 premiers cycles permettant l'hybridation des deux séquences. Ensuite, les amorces sens amont et anti-sens aval ont été ajoutées. 30 cycles ont été réalisés pour amplifier le produit PCR complémenté.

3.3. PCR de diagnostic

Ce mix PCR contient la polymérase GoTaq (150X, Promega), du tampon de réaction GoTa (5X, Promega), des amorces sens et anti-sens (30X, 20 mM de chaque, Integrative DNA

Name	Gene	F/R	Sequences (5'-3')	Length
$Ldt_{At}1$	Atu0048	F	ATAGCCATCCGAGAGGATCAGC	22
		R	TGGTATTTCCAGTAAAAGTGCGTAGC	26
$Ldt_{At}2$	Atu0669	F	CGTGGTCGATACCAGACAGCA	21
		R	GCGATCAGGTGAATGCGCTGA	21
$Ldt_{At}3$	Atu0844	F	CATGGTGATGACCGCCGCA	19
		R	CGCTGTACATCGTTTGTTCCACG	23
$Ldt_{At}4$	Atu0845	F	ATGATGCCCTTGTCGGCAAG	20
		R	CGAAAAACGGGCGGTCAGC	19
$Ldt_{At}9$	Atu2336	F	GATGAAGCAGAACAGGATGGCAG	23
		R	GGTGCGATTTCCATCGGTGC	20
$Ldt_{At}11$	Atu3331	F	AGGATCGCTTTCAGGTCCA	19
		R	TGTGGCGTAGCCGAAACATCA	21
$Ldt_{At}14$	Atu5196	F	TAGGGCAGATCAACGATACGGG	22
		R	GTTTCCCCATGTGTGGCTCTCT	22
$Ldt_{Ba}9$	BAB1_0979	F	ATTCGTATTTCGTTCGATGGCGTCA	25
		R	CTTGTGATTATTCGGTGCCTTGGC	24
$Ldt_{Ba}10$	BAB1_2007	F	TGGCCGGTCAGCATGATGATT	21
		R	TCATCGCAGGACACGAATGACGG	23
$Ldt_{Ba}11$	BAB1_2034	F	GGAACATTCGATCTATTCGGTCATCTCA	28
		R	AGAGGGTCGGTCGCCTCTA	19
$\Delta Ldt_{Ba}9$	BAB1_0979	AM_F	CGCCCTTGCCGATACGGA	18
		AM_R	TAAAGCCGTTACCCCAGGACGGGTTGAAT	29
		AV_F	GTCCTGGGGTAACGGCTTTAACTAAAACCATCAAAGCG	38
		AV_R	ATCACCACGCCATCAAAACCTTG	23
$\Delta Ldt_{Ba}10$	BAB1_2007	AM_F	GATTCGAGGCCGAGAATCGTGTC	23
		AM_R	TCCACTGGAGGGATGATGCCGATCTCCCGG	30
		AV_F	TCGGCATCATCTCCAGTGGATCGTAACGAGCCA	33
		AV_R	CTGTAAGTTCCAACGGAGCACAGAATAG	28
$\Delta Ldt_{Ba}11$	BAB1_2034	AM_F	CGGTGGCAAACCGCGTCTATAT	22
		AM_R	CCTGATCGGAGTCGCATCAAGTCTGTTAGAGCCA	34
		AV_F	TTGATGCGACCCGATCAGGAAAACACACCTGTTTAC	36
		AV_R	TCCCGGTTTCGACCTTCGAGAT	22
RopA2-3Flag	Atu1020	AM_F	AAGCTTTATAATGGAGGTCAACCATGAACATCAAGA	36
		AM_R	TCCTTGTAATCGATGTCATGATCTTTATAATCACCGTC ATGGTCTTTGTAGTCGGTGATGATTGCAGACGCACC	74
		AV_F	CATGACATCGATTACAAGGATGACGATGA CAAGGCAATCATCACCAACGACTGGTC	56
		AV_R	GGATCCTTAGAACGAGCGCTGAAGGCG	27

Tableau 3 | Amorces PCR. F et R représentent respectivement les amorces sens et anti-sens. AM représente les amorces en amont du gène et AV représente les amorces en aval.

technology), de la solution de dNTP (12,5X, 5 mM chaque), des bactéries provenant d'une colonie ou un échantillon d'ADN et de l'eau pour atteindre un volume de 30 µL. Du diméthylsulfoxyde (DMSO) ou du Glycerol (5%) peuvent être ajoutés au mix pour favoriser l'amplification. Le programme PCR a été réalisé suivant les instructions du fabricant (Promega).

4. Restriction enzymatique

Les produits PCR ou plasmides ont été digérés à l'aide des enzymes de restriction appropriées. Chaque mix de restriction est composé de 2 µg d'ADN, de tampon *FastDigest* (10X, ThermoFisher), d'enzyme de restriction (1 µL si une enzyme, 0,7 µL si deux enzymes) et de l'eau pour atteindre un volume de 25 µL. La restriction s'est effectuée durant 30 minutes à 37°C et les enzymes ont ensuite été inactivées 20 minutes à 80°C.

5. Ligation

Les ligations des inserts dans les plasmides ont été réalisées par la ligase T4 à ADN (1 µL, New England Biolabs) dans du tampon de ligation (5X, New England Biolabs) et de l'eau pour atteindre un volume de 20 µL. Le mix de ligation a été incubé à 18°C durant la nuit.

6. Construction des souches

6.1. Transformation

Une fois les *E. coli* DH10B thermo-compétentes dégelées sur glace, l'ADN plasmidique (1/10 max du volume en bactérie) a été ajouté et incubés glace pendant 30 minutes. Ensuite, le choc thermique a été réalisé à 42°C pendant 1 minute. Les échantillons ont été déposés sur glace quelques minutes et 700 µL de milieu LB ont été ajoutés. Les bactéries ont été incubées sous agitation à 37°C pendant 45 minutes. Les bactéries ont ensuite été isolées par centrifugation de 3 minutes à 5000 x g. Le culot a été resuspendu dans 100 µL de milieu LB frais et étalé sur du milieu LB-agar contenant du X-Gal (0,0002% p/v), de l'IPTG (1mM) et l'antibiotique adéquat au plasmide.

6.2. Conjugaison

50 µL de pré-culture d'*E. coli* S17-1 contenant le plasmide d'intérêt ont été ajouté à 1 mL de pré-culture de *B. abortus* 544 NAl^R. Le mélange de bactéries a été lavé (7000 x g, 2 minutes) resuspendu dans 1 mL de TSB puis lavé à nouveau. Le culot a ensuite été resuspendu dans 100 µL de TSB et la suspension bactérienne a été déposée sur du milieu TSB-agar. Lors d'une conjugaison avec un plasmide réplicatif, l'incubation a été faite à 37°C pendant 4h contrairement à température ambiante sur la nuit pour un plasmide intégratif.

Une partie de la goutte a été récoltée avec une anse. Les bactéries avec un plasmide réplicatif ont été striées sur TSB-agar avec de l'acide Nalidixique et l'antibiotique adéquat (1/1000). Les bactéries avec un plasmide intégratif ont été resuspendues dans 400 µL de TSB et 100 µL ont été étalées sur boite de pétri TSB-agar avec de l'acide Nalidixique et l'antibiotique adéquat (1/5000).

6.3. Électroporation

Une pré-culture de *A. tumefaciens* a été diluée dans du milieu 2YT et incubée jusqu'à DO_{600}~0,6. 50 mL de la culture ont été centrifugés pendant 10 min à 3000 x g à 4°C. Les bactéries ont été lavées 3 fois à l'eau désionisée froide. Le culot bactérien a été ensuite resuspendues dans 1 mL d'eau désionisée froide. Ces bactéries électrocompétentes peuvent être conservées à - 80°C dans du glycérol (10%).

A 20 µL de solution de bactéries électrocompétentes ont été ajoutés 4 µL de plasmide purifié et incubées 30 minutes sur glace. Les bactéries ont ensuite été placées dans une cuvette

d'électroporation de 0,1 mm. Le choc électrique de 25 µF, 200 ohms et 2400 volts a été réalisé avec le GenPulser Xcell (Bio-Rad). Les 20 µL de bactéries ont été suspendues dans 1 mL de 2YT préchauffé dans un falcon de 15 mL et incubé 2h à 30°C sous agitation. Ensuite 100 µL de culture ont été étalés sur du 2YT-agar contenant de la kanamycine (50 µg/mL).

6.4. Sélection des souches de délétion

Les souches de délétion ont été construites par échange allélique avec le plasmide intégratif pNPTS138. Celui-ci contient une cassette de résistance à la kanamycine et une cassette de sensibilité au sucrose.

Afin de sélectionner les souches qui ont acquis le plasmide, trois clones ont été striées sur du milieu adéquat solide (TSB-agar ou 2YT-agar) contenant de la kanamycine (10 µg/mL). Une culture liquide a été réalisée sans pression de sélection afin d'induire la perte du plasmide. Ensuite 100 µL de cette culture ont été ensemencés sur du milieu solide enrichi en sucrose (5%), permettant la croissance des clones ayant perdus le plasmide. Les colonies ont été sélectionnées et striées en parallèle sur du milieu solide contenant de la kanamycine (10 µg/mL) et sur du milieu solide enrichi en sucrose (5%). Les clones se développant uniquement sur le milieu supplémenté en sucrose (5%) sont sélectionnés une vérification de la délétion via PCR diagnostic.

7. Extraction du peptidoglycane

7.1. Extraction PG pour un analyse protéomique

Une culture bactérienne en phase exponentielle (DO_{600}~0,6) a été centrifugée à 4000 x g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot a été resuspendu dans 1 mL de PBS froid et centrifugé avec dans les mêmes conditions.

Le surnageant a été éliminer et le culot a été resuspendu dans 1 mL de tampon de lyse (Tris HCl 10mM pH 7,5, NaCl 100mM, DNase 100µg/mL plus un cocktail d'inhibiteur de protéase (Roche, REF 10104159001)). L'équivalent de 100 µL de billes de rupture en Zircon/Silice (0,1 mm de diamètre) ont été ajoutées aux échantillons qui ont été ensuite placés sur le Digital Disruptor Genie (Scientific Industries) à une amplitude maximale (2800) pendant 1 heure à 4°C. Les lysats et les billes ont été séparés à l'aide d'un tamis cellulaire (maillage de 70 µm). Les lysats ont été centrifugés à 10 000 x g pendant 10 minutes à température ambiante. Le culot composé des membranes a été resuspendu dans 1 mL de SDS 5% et bouilli à 95°C à 500 rpm jusqu'à ce que la solution devienne translucide. L'échantillon a été centrifugé à 100.000 x g pendant 36 minutes. Le surnageant a été resuspendu dans 3 mL d'eau milliQ puis centrifugé à nouveau. Le lavage a été répété jusqu'à ce que les échantillons soient exempts de SDS. Le culot final a été resuspendu dans 100 µL de PBS et stocké à -20°C.

7.2. Extractions de PG pour les westerns blot et autres analyses protéomiques

Une pré-culture a été diluée dans du milieu adéquat et incubée jusqu'à DO_{600} ~ 0,6. L'échantillon a été centrifugé à 4000 x g pendant 5 minutes. Le culot bactérien a été lavé dans de l'eau et centrifugé à 3500 x g pendant 3 minutes. Le culot a été suspendu dans 1 mL de SDS 5% et bouilli à 95°C pendant 30 min. L'échantillon a été centrifugé à 14 000 x g pendant 30 min à 14°C. Le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé 3 fois avec 1 mL d'eau désionisée. Le culot de PG a été resuspendu dans 100 µL de PBS et stocké à -20°C.

Certains échantillons ont été resuspendus à nouveau deux fois dans 5 mL de SDS 5% et bouilli à 95°C pendant 15 min. Les lavages après, les traitements de SDS ont été répétés 3 fois. Le culot de PG a été suspendu dans 100 µL de PBS et stocké à -20°C.

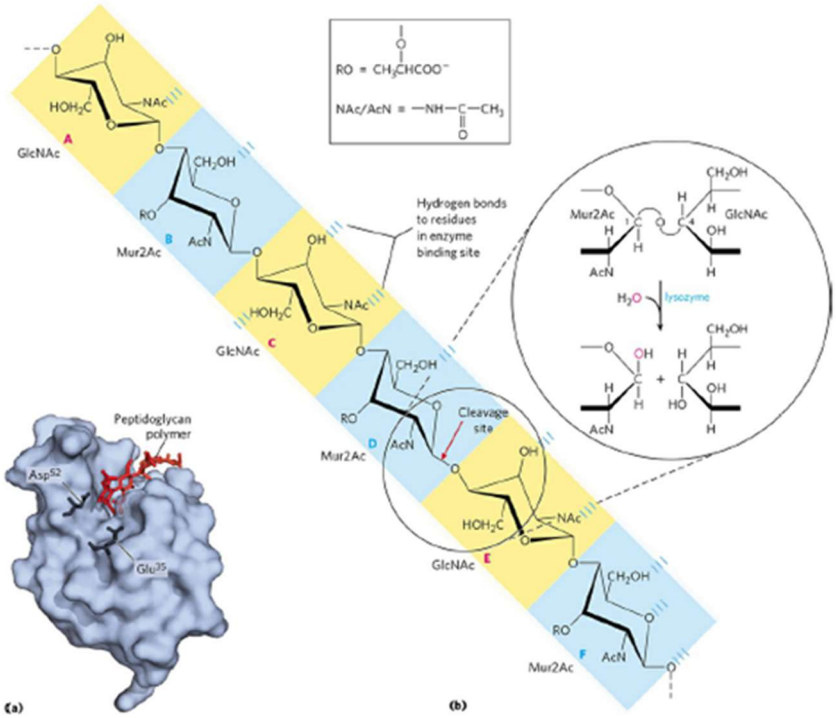


Figure 10 | Digestion du peptidoglycane par le lysozyme. Le lysozyme reconnait six résidus saccharidiques du PG. La liaison glycosidique β(1→4) (indiqué par la fléche rouge) entre le résidu Mur*N*Ac en quatrième position et le résidu Glc*N*Ac en cinquième position, est clivée par les résidus catalytiques ; Glu^{35} et Asp^{54}. La réaction hydrolytique est représentée dans l'encadré (Fig. 6-28 Lehninger, Principles of Biochemistry, seventh Edition).

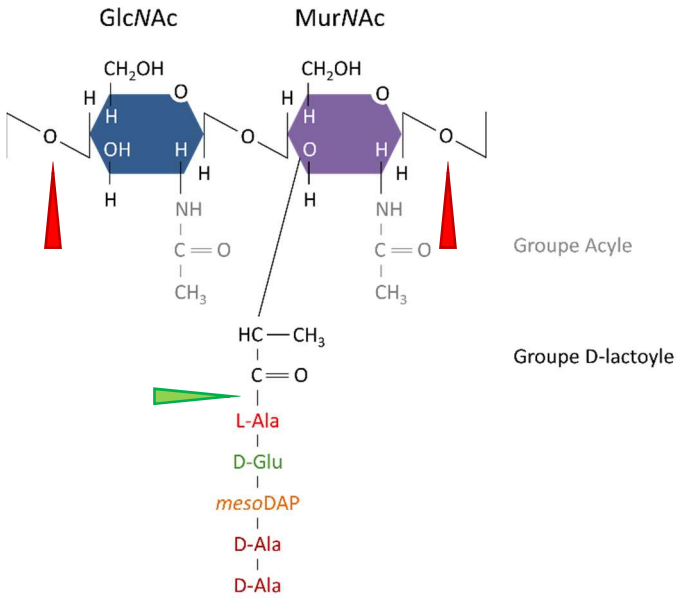


Figure 11 | Digestion du peptidoglycane par la mutanolysine. La mutanolysine est un mélange d'enzymes obtenu à partir de *S. globisporus*, contenant deux N-acétylmuramidases qui clivent entre les résidus de glycanes (flèches rouges) et une amidase N-acétylmuramyl-L-alanine qui clive au niveau de la liaison lactyle-amide (flèche verte).

7.3. Digestion du PG

Le peptidoglycane a été digéré à l'aide de lysozyme (2 mg/mL, Roche REF 10006829) ou par de la mutanolysine de *Streptomyces globisporus* (1000U/mL, Sigma-Aldrich, REF M9901) à 37°C durant la nuit. Le lysozyme reconnait six résidus saccharidiques du PG. La liaison glycosidique β(1→4) entre le résidu Mur*N*Ac en quatrième position et le résidu Glc*N*Ac en cinquième position, est clivée par les résidus catalytiques ; Glu^{35} et Asp^{54} du lysozyme (Figure 10). La mutanolysine est un mélange d'enzymes obtenu à partir de *S. globisporus*, contenant deux N-acétylmuramidases qui clivent entre les résidus de glycanes et une amidase N-acétylmuramyl-L-alanine qui clive au niveau de la liaison lactyle-amide. Ainsi, dans les échantillons digérés avec la mutanolysine, il ne devrait pas y avoir de peptide glycosylé (figure 11).

Le peptidoglycane a également été digéré par de la mutanolysine et par l'amidase N-acétylmuramyl-L-alanine de *Staphylocoque aureus* (±50 mg/mL), purifiée et utilisée tel que décrit au point 11.

La pronase a été utilisée sur certains échantillons de PG, afin de digérer l'ensemble des protéines de l'échantillon. Il s'agit d'un mélange protéolytique obtenu à partir de *Streptomyces griseus*.

8. Spectrométrie de masse

Les échantillons de PG digérée ont été réduits au dithiothréitol (1 mM) à 37°C pendant 45 minutes et ensuite alkylés avec de l'iodoacétamide (40 mM) à 37 °C pendant 45 minutes. Les protéines de l'échantillon ont été digérées à la trypsine (0,5 µg, Promega) durant la nuit. L'échantillon traité à l'amidase de *S. aureus* est, en plus de la trypsine, digéré par la chymotrypsine (à 0,25 µg, Promega) pendant 2h.

Les peptides ont été séparés par chromatographie liquide en phase inverse en utilisant une colonne 75 µm x 250 mm (Acclaim PepMap 100 C18). La colonne a été équilibrée à l'aide de la phase mobile A (95 % H_2O, 5 % acétonitrile (ACN), 0,1 % acide formique). Après injection des peptides, le gradient linéaire de la phase mobile B (80 % d'ACN, 20 % d'H_2O et 0,1 % d'acide formique) a commence à 5 % jusqu'à 40 % en 220 minutes et ensuite de 40 % à 90 % de la phase B en 10 minutes. La colonne est reliée à une source de pulvérisation nano-électrique (Bruker). Les fragments peptidiques ont été analysés par une spectrométrie de masse en tandem (maXis Impact UHR-TOF, Bruker). Les spectres de spectrométrie de masse ont été acquis à 0,5 s dans un intervalle de masse sur charge (m/z) compris entre 400 et 2200. L'énergie de dissociation induite durant la collision (CID) a été automatiquement réglée en fonction du rapport m/z et de l'état de charge de l'ion précurseur. Pour améliorer la détection des ions oxonium et le séquençage des glycopeptides, une deuxième analyse nanoLC-MS/MS a été effectuée avec un mode pas à pas de base en MS/MS pour lequel l'énergie de collision a été augmentée de 30% pendant la moitié du temps de séquençage. Les systèmes MaXis et Ultimate ont été pilotés par le logiciel Compass HyStar 3.2 (Bruker).

Les listes de pics pour les échantillons ont été créées à l'aide de DataAnalysis 4.0 (Bruker) et ont été sauvegardées sous forme de fichiers mgf. Mascot 2.4 (Matrix Science). X! Tandem (The GPM, thegpm.org ; version CYCLONE 2010.12.01.1) a été utilisé comme moteur de recherche pour l'identification des protéines. La spécificité enzymatique a été fixée à la trypsine ou à la trypsine combinée à la chymotrypsine. Le nombre maximal de clivages manqués par peptide a été fixé à un pour la trypsine seule ou à deux lorsque la trypsine a été utilisée en association avec la chymotrypsine. L'acide aminé non conventionnel *meso*DAP (172,085 Da) a été ajouté au fichier de configuration des acides aminés de Mascot (Matrix Science). La tolérance de

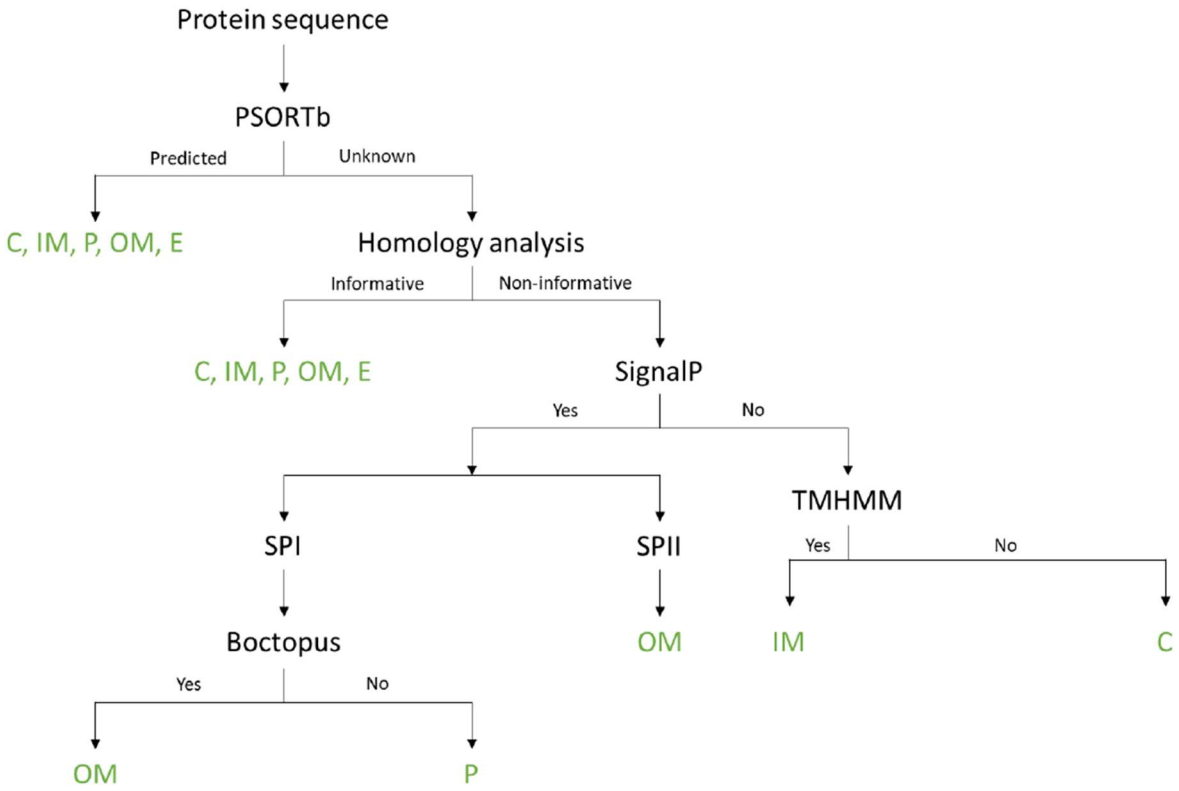


Figure 12 | Arbre décisionnel pour la localisation subcellulaire des protéines.
La localisation subcellulaires des protéines identifiées par les analyses protéiniques a été déterminée suivant cet arbre décisionnel, établit par P. Godessart. C, cytoplasmique ; IM, membrane cytoplasmique ; P, périplasmique ; OM, membrane externe ; E, extracellulaire.

Anticorps primaires

Réference	Cible	Type	Espèce	Application
A76/3D6/A9	Peptidoglycan	Monoclonale	Mouse (IgG3)	WB
A59/5F1/C5	Omp25	Monoclonale	Mouse	WB
A68/4B10/F5	Omp25	Monoclonale	Mouse (IgG2a)	IF
A63/3H2/H9	Omp2b	Monoclonale	Mouse (IgG1)	WB
290.S3	GcrA	Polyclonale	Rabbit	WB
N/A	Lpp	Monoclonale	Lapin	WB

Anticorps secondaires

Reference (#)	Cible	Conjugué	Application
Dako (P0217)	Rabbit Ig	HRP	WB
Dako (P0260)	Mouse Ig	HRP	WB
Life technologies (A11001)	Mouse IgG (H+L)	Alexa Fluor 488	IF

Tableau 4 | Listes des Anticorps utilisés

masse pour le peptide monoisotopique était de 10 ppm et la fenêtre de tolérance MS/MS de 0,05 Da. La carbamidométhyle (C) a été activée comme modification fixe. L'oxydation (M) et la désamination (N,Q) ont été activées comme des modifications variables pour l'ensemble des échantillons traités. La modification GlcNAc(1)MurNAc(1) (478,179 Da) a été activée comme modification variable sur les alanines dans certains échantillons.

Pour l'identification des protéines, une banque de données modifiés a été constituée à partir du protéome Uniprot d'*Agrobacterium tumefaciens* C58 téléchargé en juin 2019. Les séquences protéiques possédant un peptide signal et le tétrapeptide conservé (ADAI) ont été dupliquées. Le peptide signal a été remplacé par les peptides du PG, alanine, glutamate et acide *méso*diaminopimélique (AE*m*D,) afin de correspondre aux protéines matures liées au PG.

Scaffold 4.8 (Proteome Software) a été utilisé pour valider les identifications de peptides et de protéines basées sur MS/MS. La détermination de la localisation subcellulaire des protéines identifiées a été effectuée à l'aide d'un arbre décisionnel représenté sur la figure 12.

9. Détection des protéines

Un tampon de charge de SDS-β-mercaptoéthanol (4X, SDS 8%, β-mercaptoéthanol 20%, Glycérol 40%, Tris HCl 0,12 M pH 6.8, bleu de bromophénol) a été ajouté aux échantillons de lysats bactériens ou d'extraction de PG. Les échantillons ont été bouillis à 95°C pendant 10 minutes et chargés sur le gel SDS-PAGE 12 % (BioRad). Une électrophorèse de 200V pendant 45 minutes, a été appliquée (BioRad).

9.1. Western Blot

Les protéines ont été transférées par Trans-Blot turbo (BioRad) sur une membrane en nitrocellulose (GE Healthcare Amersham Protan 0,45 NC). Les membranes ont été bloquées dans 5 % (p/v) de lait (Nestlé, Foam Topping) et 0,05 % de PBS-Tween 20 (VWR) sous agitation minimum 1 heure. Avant l'incubation des anticorps, les membranes ont été lavées 3 fois avec du PBS-Tween 0,05 %. Les membranes ont été incubées avec les anticorps primaires (tableau 4) pendant 1 heure à température ambiante. L'anticorps secondaire correspondant HRP (Dako Danemark, 1: 5000, REF P0217 et P0260 pour α-Rabbit et α-Mouse respectivement), a été incubé pendant 45 minutes à température ambiante. Les anticorps ont été dilués dans 0,5 % de lait et du PBS-Tween 0,05 %. Les membranes ont été lavées 3 fois avec du PBS-Tween 0,05 %, après les deux incubations. Les membranes ont été révélées avec les solutions The Clarity Western ECL Substrate (BioRad) et un Amersham Image 600 de GE Healthcare. Les images ont été acquises avec un Image Quant LAS 4000 (General Electric).

9.2. Coloration à l'argent

Les gels ont été colorés à l'argent suivant les instructions du kit The Pierce® silver stain (Thermo Scientific).

10. Purification de l'amidase de *Staphylococcus aureus*

Pré-culture à 37°C de *E. coli* BL21 DE3 pET21a::*atl*, dans un milieu auto-induction NYZ-5052 (900 mL de NZY [NZ amines AS 10 g (p/v) et yeast extract 5 g (p/v)] ; 20 mL de 50X5052 [5 g glycérol, 0,5 g glucose et 2 g lactose monohydraté] ; 50 mL de 20XNPS [0,5 M de $(NH_4)_2SO_4$, 1M de KH_2PO_4 et 1M de Na_2HPO_4] ; 1 mL de $MgSO_4$ (1 M) ; 1 mL de 1000X mix de métaux [25 mL de $FeCl_3$ (0,1M, dans HCl 0,1M), 2 mL de $CaCl_2$ (1M), 2 mL de $MnCl_2$ (1M), 1 mL de $ZnSO_4$ (1M), 1 mL $CoCl_2$ (0,2M), 2 mL $CuCl_2$ (0,1M), 1 mL de $NiCl_2$ (0,2M), 2 mL de Na_2MoO_4 (0,1M), 2 mL de Na_2SeO_3 (0,1M), 2 mL de H_3BO_3 (0,1M) dans un volume final de 50 mL]). La culture est centrifugée à 4000 x g pendant 15 minutes. Le culot est resuspendu dans un tampon de lyse (50 mM phosphate [$Na_2HPO_4.7H_2O$: 1,73g ; NaH_2PO_4 : 0,123g], 500

mM NaCl [4,38g], 5 mM imidazole [0,05g] dans 150 mL). L'échantillon a été lysé par 6 cycles de sonication à 30 Watt pendant 10 secondes, entre chaque sonication laissée 50 secondes sur glace.

Lors de la purification par I-MAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*), la protéine étant His-taggée sera immobilisée dans la colonne contenant du nickel (Ni-NTA Agarose). La colonne a été conditionnée par le tampon I-MAC A (50 mM phosphate [$Na_2HPO_4.7H_2O$: 5,77g ; NaH_2PO_4 : 0,41g], 50 mM NaCl [14,66g], 20 mM imidazole [0,68g] dans 500 mL) ensuite l'échantillon est placé sur la colonne à vitesse de 1 mL/min. Le gradient d'élution s'effectue de 0 à 100% de tampon I-MAC B (50 mM phosphate [$Na_2HPO_4.7H_2O$: 5,77g ; NaH_2PO_4 : 0,41g], 50 mM NaCl [14,66g], 500 mM imidazole [14,66g] dans 500 mL) pendant 50 minutes à une vitesse de 1 mL/min réalisé par l'AKTA FPLC (GE, Amersham). L'ensemble des fractions a été placés dans un boudin de Dialyse (pore: 0,8 kDa) qui est plongé durant la nuit à 4°C dans un tampon de Dialyse (50 mM phosphate [$Na_2HPO_4.7H_2O$: 11,54g ; NaH_2PO_4 : 0,82g], 20 mM NaCl [1,17g] dans 1000 mL). Ensuite, une échangeuse ions cationique est réalisée sur l'échantillon. L'amidase Atl présente un point isoélectrique de pH 9. Les tampons sont ajustés à pH 8, permettant à la protéine d'être positivement chargée. La colonne chargée négativement va permettre d'immobilisé la protéine. Cette colonne a été conditionnée par le tampon échangeuse A (50 mM phosphate [$Na_2HPO_4.7H_2O$: 5,77g ; NaH_2PO_4 : 0,41g], 20 mM NaCl [0,58g] dans 500mL). Ensuite l'échantillon est placé sur la colonne cationique à vitesse de 1 mL/min. Le gradient d'élution s'effectue de 0 à 100% de tampon échangeuse B (50 mM phosphate [$Na_2HPO_4.7H_2O$: 5,77g ; NaH_2PO_4 : 0,41g], 1 M NaCl [29,22g] 500 mL) pendant 50 minutes à une vitesse de 1 mL/min réalisé par l'AKTA FPLC (GE, Amersham). Les fractions obtenues subissent une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide de 12%. Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomasie. Les fractions contenant une bande correspondant à un poids moléculaire de 59,9 kDa sont sélectionnées et filtrées sur une membrane de 0,2µm. Ensuite, elles ont été passées sur un amicon 10 kDa (Millipore) et ensuite sur un amicon 30 kDa (Millipore) afin d'éliminer un maximum de protéines contaminantes.

11. Immunomarquage de l'Omp25

5 mL de culture bactérienne en phase exponentielle (DO_{600}~0,3) ont été centrifugé à 8 000 x g pendant 2,5 minutes. Le culot a été lavé deux fois dans du PBS et ensuite mis en suspension dans 50 µL d'anticorps anti-Omp25 non dilué (A68 / 4B10 / F5) et incubé à température ambiante pendant 40 minutes sur une roue. Les cellules ont été lavées deux fois dans du PBS. Les bactéries ont été mises en suspension dans l'anticorps Alexa 488 secondaire anti-souris (Life Technologies, REF A11001) dilué 500X dans du PBS. Les échantillons ont été incubés à température ambiante pendant 40 minutes sur une roue à l'abri de la lumière. Les cellules ont ensuite été lavées comme ci-dessus et remises en suspension dans 50 µL de PBS.

12. Microscopie à fluorescence

2 µL de suspension bactérienne ont été déposés sur un tampon de PBS à 1% d'agarose pour imagerie. Les images ont été obtenues avec un Nikon Eclipse Ti2 équipé d'un objectif à contraste de phase Plan Apo λ DM100XK 1,45 / 0,13 PH3 et d'un Hamamatsu C13440-20CU ORCA-FLASH 4.0. Les images ont été traitées avec FIJI 2.0.014, une distribution de ImageJ 1.52r.

13. Analyses bioinformatiques

Les homologues ont été recherchés à l'aide des alignements de séquence BLAST des protéines de *B. abortus* 544 dans le génome d'*A. tumefaciens* C58 avec l'algorithme blastp (Ncbi Resource Coordinators 2016).

La localisation du peptide signal et du site de clivage a été prédite par le serveur SignalP-5.0 (Nielsen et al. 2019). Le serveur LipoP 1.0 (Rahman et al. 2008) permet de prédire les lipoprotéines et de distinguer le peptidique signal des lipoprotéines et des autres protéines dans les bactéries à Gram négatif. Les séquences peptides ont été soumises à ProtParam tool ExPASy (Gasteiger et al., n.d.) qui permet de calculer le poids moléculaire et la longueur pour une protéine sur base de sa séquence.

Les séquences ont ensuite été alignées par Muscle avec deux itérations (comparaison de séquences multiples par Log-Expectation) (Edgar 2004), pour déterminer les séquences consensus. La construction de l'arbre phylogénétique est réalisée par Jalview (2.10.5) (Waterhouse et al. 2009) avec *neighbour-joining using PID*, l'identité en pourcentage entre les séquences pour chaque alignement.

La prédiction 3D des protéines a été réalisée par le logiciel I-Tasser (Iterative Threading Assembly Refinement) (Roy, Kucukural, and Zhang 2010). La bibliothèque de modèles a été mise à jour le 2019/05/03.

La détermination de la localisation subcellulaire des différentes protéines identifiées par les analyses protéomiques, a été effectuée selon un arbre décisionnel (figure 12). La prédiction à partir des séquences sur le serveur PSORTb version 3.0.2 (Yu et al. 2010) ; le serveur SignalP-5.0 ; le serveur TMHMM version 2.0 (*Trans-membrane helix prediction*, http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/) ; le serveur BOCTOPUS 2 (*transmembrane β-barrel topologyprediction*) (Hayat et al. 2016). Les graphes de classifications des protéines identifiées par LC-MS/MS ont été réalisés sur le logiciel Prisme 8.

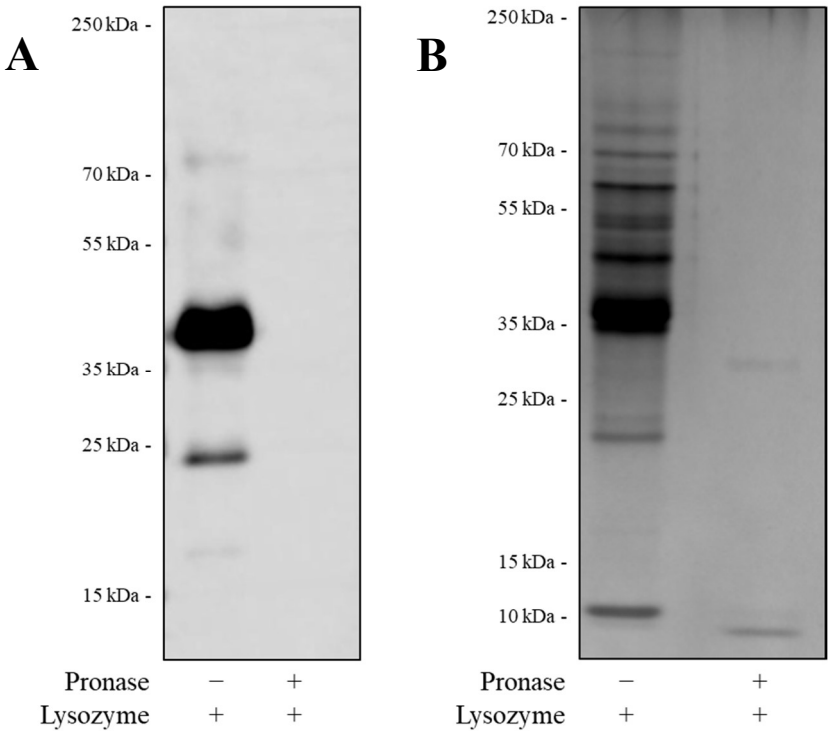


Figure 13 | Détection de protéines attachées au PG d'*A. tumefaciens.* Le PG d'*A. tumefaciens* est digéré au lysozyme, les muropeptides résultant de cette digestion ont un poids moléculaire maximal ~2,7 kDa. (A) L'analyse par western blot, utilisant un anticorps monoclonal anti-peptidoglycane (A76 3D6 A9), révèle des muropeptides avec des poids apparemment beaucoup plus élevés. Les molécules de poids moléculaire ~37 kDa et ~22 kDa, qui retiennent les muropeptides ne sont plus détecté après la digestion par la pronase, une protéase très efficace (B) La coloration à l'argent du PG digéré, avant et après la digestion par la pronase a été réalisée. Seules deux fines bandes sont détectées à ~30 kDa et en dessous de 10 kDa, après la digestion par la pronase.

RÉSULTATS

1. Détection du PG d'*A. tumefaciens*

Avant de déterminer la conservation ou non du modèle d'interaction des Omps au PG de *B. abortus* chez *A. tumefaciens*, le PG est extrait et un western blot a été réalisé pour tenter de déterminer si des protéines sont attachées ou non à ce polymère.

L'extraction de PG s'effectue à partir d'un lysat bactérien bouilli au SDS. Le SDS est un détergent fort qui solubilise les membranes et dénature les protéines, tout en les solubilisant. Des centrifugations permettent de récupérer le PG et les protéines qui y sont fortement attachées par des liaisons covalentes telles que les liaisons peptidiques. L'extraction de PG d'*A. tumefaciens* a été réalisée avec et sans traitement de protéinases. Les protéinases permettent d'éliminer toutes les protéines fortement liées au PG. Ensuite les échantillons de PG sont digérés au lysozyme. Celui-ci clive les liaisons glycosidique β(1→4) du PG permettant de libérer les protéines qui seront alors attachées aux muropeptides de PG.

Un western blot est donc réalisé sur les échantillons de PG d'*A. tumefaciens* digérés afin de détecter ou non la présence de protéines et de valider la détection du PG d'*A. tumefaciens* par l'anticorps anti-peptidoglycane. Le résultat du western blot révèle plusieurs bandes dans l'extrait de PG uniquement digéré par le lysozyme (figure 13A). Les bandes principales ont un poids moléculaire de ~40 kDa et ~25 kDa. Les muropeptides obtenus par la digestion du PG au lysozyme chez *A. tumefaciens* ont un poids moléculaire maximal ~2,7 kDa (Brown et al. 2012). Les muropeptides semblent donc liés à des molécules de poids moléculaire beaucoup plus élevé. Dans l'échantillon de PG digéré à la pronase et au lysozyme, ces bandes ne sont plus observées. Ce résultat indique que les muropeptides sont attachés à des protéines de poids moléculaire aux alentours de 37 kDa et de 22 kDa.

Afin de confirmer la présence de protéines dans le PG d'*A. tumefaciens*, une coloration à l'argent est réalisée sur ces mêmes échantillons (figure 13B). Plusieurs bandes apparaissent dans l'échantillon digéré uniquement par le lysozyme. Ces bandes représentent l'ensemble des protéines présentes dans l'échantillon de PG. Certaines bandes correspondent aux bandes qui apparaissent sur le western blot. Les bandes de poids moléculaire similaires au western blot et à la coloration à l'argent représenteraient les protéines attachées au PG. Dans l'échantillon de PG digéré à la pronase et au lysozyme, deux fines bandes apparaissent ; une aux alentours de 30 kDa et une en-dessous de 10 kDa. La bande aux alentours de 30 kDa peut représenter la pronase, dont les poids moléculaire des différents composants se situent entre 20 et 60 kDa. La bande en-dessous de 10 kDa peut représenter les acides aminés du PG, dont les muropeptides obtenus par la digestion du PG au lysozyme ont un poids moléculaire maximal ~2,7 kDa. Cela indique l'efficacité de la pronase pour digérer les protéines et que celle-ci ne clive pas la tige peptidique du PG.

Il est intéressant de noter que chez *B. abortus*, deux protéines abondantes liées de manière covalente au PG, Omp2b et Omp25 ont respectivement un poids moléculaire de 36 kDa et 25 kDa. Si le système d'interaction des Omps au PG de *B. abortus* venait à être conservé dans les Rhizobiales, alors il est possible que les protéines détectées comme attachées au PG d'*A. tumefaciens* soient des homologues à celles de *B. abortus*.

2. Homologie des protéines de la membrane externe (OMPs)

Le génome d'*A. tumefaciens* C58 a été analysé bioinformatiquement, afin de déterminer les protéines homologues aux OMPs de *B. abortus* 544.

	Omp	*Brucella abortus* 544											
		Omp2b BAB1_0660		Omp25 BAB1_0722		Omp25d BAB1_0115		Omp25c BAB1_0116		OmpW-like BAB1_1579		$Omp_{Ba}1$ BAB1_1302	
		e value	%id	e value	%id	e value	%id	e value	%id	e value	%id	e value	%id
Agrobacterium tumefaciens C58	$Omp_{At}1$/Atu1020 (ropA2)	4,00e-25	34,41										
	$Omp_{At}2$/Atu1021	2,00e-25	52,24										
	$Omp_{At}3$/Atu1131 (ropB)			2,00e-34	39,72	1,00e-19	36,64	6,00e-21	37				
	$Omp_{At}4$/Atu2159 (Omp)			**7,00e-40**	**38,6**	**4,00e-30**	**39,39**	**1,00e-33**	**39,39**				
	$Omp_{At}5$/Atu2534											**2,00e-20**	**39,53**
	$Omp_{At}6$/Atu3191									**3,00e-62**	**60,53**		
	$Omp_{At}7$/Atu4693	**8,00e-91**	**29,71**										

Circular chromosome NC_003062.2
Linear chromosome NC_003063.2
Plasmid NC_003064.2

Tableau 5 | Analyse des alignements de séquences des OMPs. Les alignements de séquences des différentes OMPs ont été réalisés avec Blastp. Les valeurs de E (*Expect values*) indiquent le nombre de séquences qui aurraient été trouvées au hasard avec une telle similarité. Au plus la valeur de E est faible au plus la similarité est élevée. Le pourcentage d'identité (%id) mesure le pourcentage de mêmes résidus aux mêmes endroits dans un alignement de deux séquences. Les homologies avec la plus petite valeur de E, représentées en gras, suggèrent que les deux protéines sont des orthologues.

Nom	Gène	Tétrapeptide	Longeur (aa)	Poids moléculaire (kDa)	Organisme
Omp2b	BAB1_0660	ADAI	340	36.7	*B. abortus*
RopA2	Atu1020	ADAI	347	37.0	*A. tumefaciens*
$Omp_{At}2$	Atu1021	ADAI	343	36.9	*A. tumefaciens*
$Omp_{At}7$	Atu4693	ADAI	333	35.8	*A. tumefaciens*
Omp25	BAB1_0722	ADAI	190	20.8	*B. abortus*
RopB	Atu1131	ADAV	195	20.5	*A. tumefaciens*
$Omp_{At}4$	Atu2159	ADAV	190	20.5	*A. tumefaciens*
$Omp_{At}5$	Atu2534	ADLT	186	19.4	*A. tumefaciens*
OmpW-like	BAB1_1579	ADAI	204	22.2	*B. abortus*
$Omp_{At}6$	Atu3191	ADLA	203	21.8	*A. tumefaciens*

Tableau 6 | Caractéristiques des OMPs. Les séquences peptides des OMPs ont été soumises à ProtParam (ExPASy). Ce serveur permet de calculer divers paramètres physiques et chimiques pour une protéine sur base de sa séquence. Les paramètres calculés sont le poids moléculaire et la longueur de la séquence. Le tétrapeptide est déterminé par les quatre premiers acides aminés présents justes après le peptide signal, prédit par le serveur SignalP-5.0.

Les alignements de séquences des OMPs (Omp2b, Omp25, Omp25c, Omp31-like et OmpW-like) de *B. abortus* réalisés sur le génome d'*A. tumefaciens* ont mis en évidence six OMPs homologues. Les protéines RopA2 (Atu1020), $Omp_{At}2$ (Atu1021) et $Omp_{At}7$ (Atu4693) d'*A. tumefaciens* sont considérées comme homologues à l'Omp2b de *B. abortus*. Tandis que les homologues de l'Omp25 de *B. abortus* sont les protéines RopB (Atu1131) et l'$Omp_{At}4$ (Atu2159). L'$Omp_{At}6$ (Atu3191) semble être l'homologue de l'OmpW. Enfin, les alignements de séquences ont mis en évidence l'$Omp_{At}5$ (Atu2534) comme homologue à l'$Omp_{Ba}1$ (BAB1_1302) (tableau 5).

Les différentes OMPs homologues d'*A. tumefaciens* ont été soumises au serveur I-Tasser afin de prédire leurs structures tridimensionnelles. Tous comme les OMPs de *B. abortus*, les sept OMPs d'*A. tumefaciens* ont une prédiction de structure en tonneau β (figure 14). La protéine RopA2, l'$Omp_{At}2$ et l'$Omp_{At}7$ ont une structure proche de la porine Omp2b de *B. abortus*. Tandis que les protéines structurellement proches de l'Omp25 de *B. abortus* sont RopB, l'$Omp_{At}4$ et l'$Omp_{At}5$. L'$Omp_{At}6$ semble avoir une structure semblable à l'OmpW. La structure en tonneau β suggère fortement que les sept protéines homologues déterminées chez *A. tumefaciens* sont intégrées dans la ME.

Les OMPs d'*A. tumefaciens* possèdent aussi une extension N-terminale sans prédiction de structure de 21 à 33 acides aminés. L'extension est située juste après le peptide signal et avant la structure en tonneau β. Elle commence par un tétrapeptide conservé, semblable aux OMPs de *B. abortus*. L'alanine et l'aspartate (en première et deuxième position après le site de clivage du peptide signal) sont parfaitement conservés dans toutes les OMPs (tableau 6). Les deux derniers acides aminés du tétrapeptide sont variables d'une OMP à l'autre. Ces deux derniers acides aminés sont de nature hydrophobique. L'alanine et l'aspartate auraient un rôle crucial dans l'attachement des OMPs au PG chez *B. abortus*. La conservation du tétrapeptide, et plus précisément de ces deux acides aminés, indique la possibilité d'attachement de ces OMPs au PG.

Des protéines de poids moléculaire de ~40 kDa et ~25 kDa ont été détectées dans le PG de *A. tumefaciens*. Les protéines homologues RopA2, $Omp_{At}2$ et $Omp_{At}7$ ont un poids moléculaire estimé aux alentours de 40 kDa. Tandis que RopB, $Omp_{At}4$, $Omp_{At}5$ et $Omp_{At}6$ ont un poids moléculaire estimé aux alentours de 20 kDa (tableau 6). Ces résultats indiquent que les différents OMPs homologues pourraient être attachés au PG de *A. tumefaciens*.

3. Etude des protéines du PG d'*A. tumefaciens*

Les protéines présentes dans l'extraction du PG d'*A. tumefaciens*, sans traitement protéolytique à la pronase, ont été identifiées par spectrométrie de masse (MS).

Le PG a été digéré soit par le lysozyme soit par la mutanolysine, tandis que les protéines sont digérées par la trypsine. La trypsine est une enzyme spécifique qui clive après la lysine et l'arginine. Les fragments protéiques résultants ont été soumis à une analyse LC-MS/MS (voir Matériel et méthodes). La banque de données Uniprot de séquences protéiques d'*A. tumefaciens* C58 a été utilisée pour identifier la nature des fragments peptidiques. Au total 381 et 302 protéines ont été identifiées pour les échantillons digérés respectivement par le lysozyme (figure 15A) et la mutanolysine (figure 15B). La localisation subcellulaire des protéines identifiées a été prédite à l'aide d'un arbre décisionnel (figure 12). Dans l'échantillon digéré par le lysozyme, 80,3 % des protéines ont une localisation cytoplasmique. Cette proportion est de 79,5 % pour l'échantillon digéré par la mutanolysine. Ces protéines cytoplasmiques semblent être des contaminants dans l'extraction de PG. Lors de l'extraction, le PG serait en forme de saccule. Il est donc possible que des protéines sans interaction pour le PG soient emportées avec celui-ci, un peu à la manière d'un filet de pêche, lors des centrifugations.

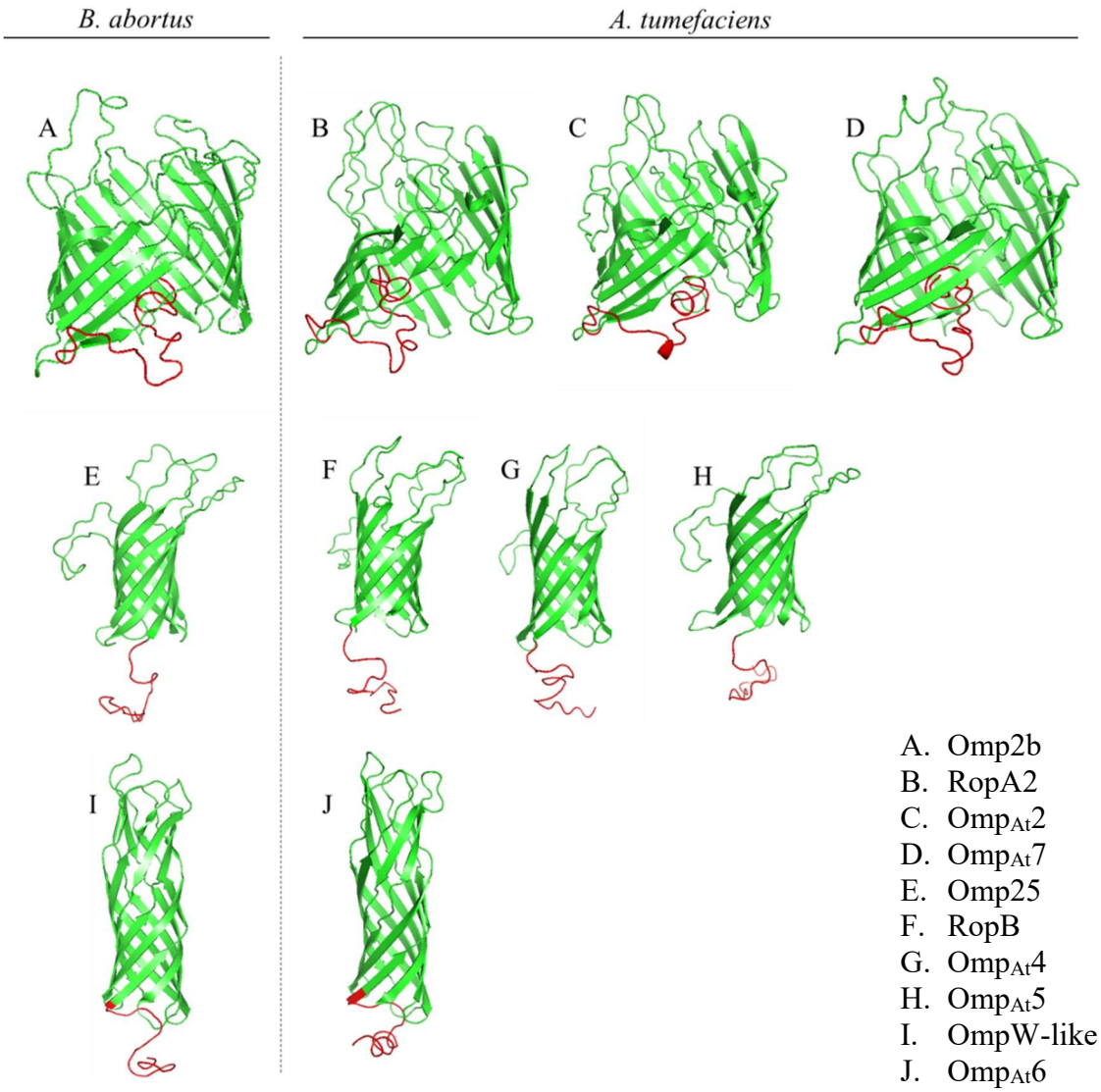


Figure 14 | Prédiction de structure tridimensionnelle des OMPs. Les séquences des OMPs ont été soumises sur le serveur I-Tasseur, sans leur peptide signal. La protéine DcaP d'*Acinetobacter baumannii* (6EUSA) est la protéine modèle pour la prédiction de structure de l'Omp2b et de ses homologues. L'Omp25 et ses homologues ont pour modèle de prédiction de structure, la protéine OMP de *Klebsiella pneumonia* (2K0L). La protéine OprG de *Pseudomonas aeruginosa* (2X27) est le modèle pour la prédiction de structure de l'OmpW-like et de ses homologues.

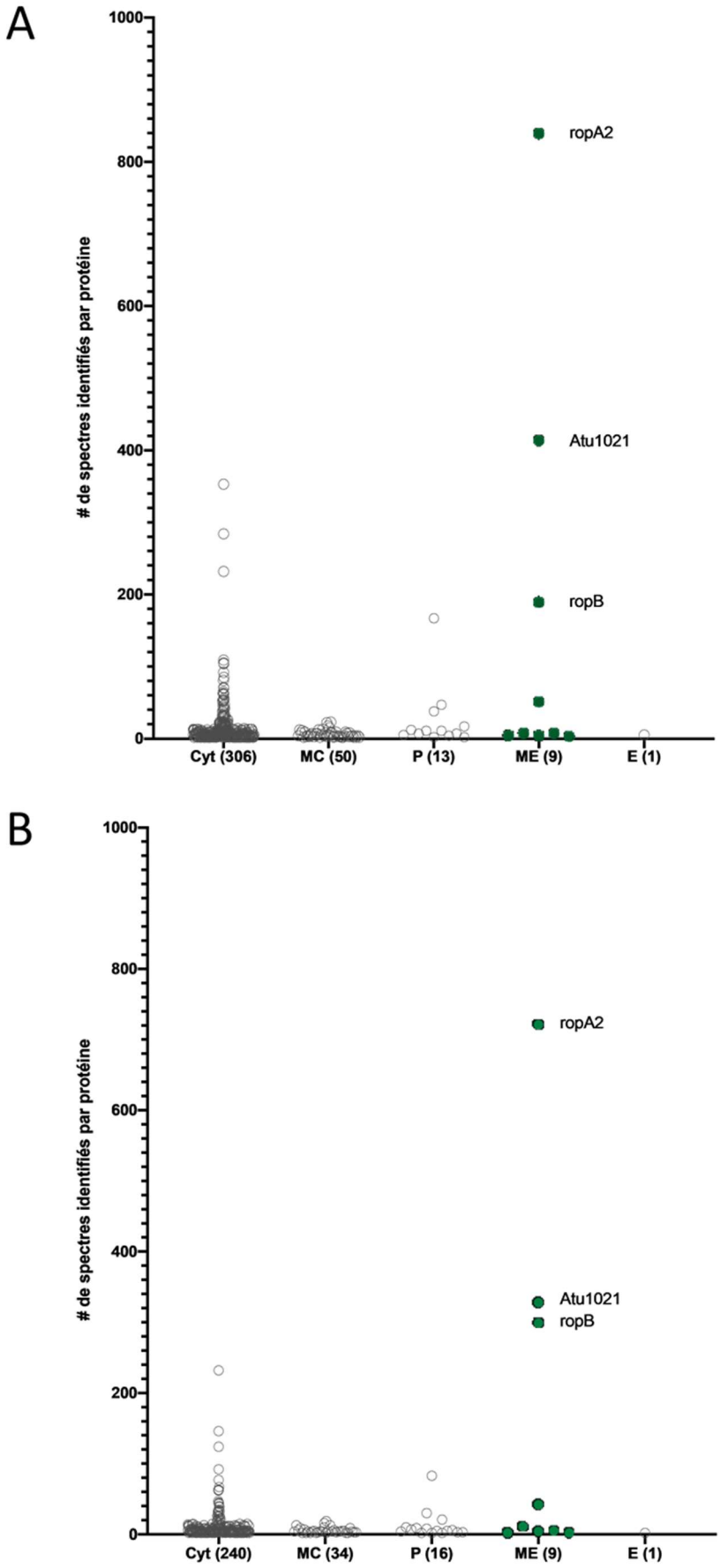


Figure 15 | Classification des protéines identifiées par LS-MS/MS. La classification des protéines identifiées est réalisée en fonction du nombre de spectres par protéine et de leur prédiction de localisation subcellulaire. 381 protéines ont été identifiées dans l'échantillon de PG digéré par le lysozyme. Deux protéines avec une prédiction de structure en tonneau β sont identifiées comme prédominantes avec un nombre de spectres de 839 pour RopA2 et 413 pour Atu1021. Certaines protéines cytoplasmiques ont été identifiées avec un nombre de spectres prédominants, de 353 pour GroL, de 284 pour TufA et de 232 pour GapA. RopB, une troisième protéine de prédiction de structure en tonneau β, a été identifiée avec un nombre de spectres de 189. (B) 302 protéines ont été identifiées dans l'échantillon de PG digéré par la mutanolysine. Trois protéines sont identifiées comme prédominantes avec un nombre de spectres de 721 pour la protéine RopA2, 328 pour Atu1021 et 299 spectres identifiés pour RopB. Ces trois protéines ont une prédiction de structure en tonneau β. La protéine cytoplasmique GroL à été identifiée avec un nombre de spectres de 323 et la protéine TufA été identifiée avec un nombre de spectres de 124. Les nombres entre parenthèses correspondent au nombre de protéines prédites par localisation subcellulaire. Cyt, cytoplasmique ; MC, membrane cytoplasmique ; P, périplasmique ; ME, membrane externe ; E, extracellulaire.

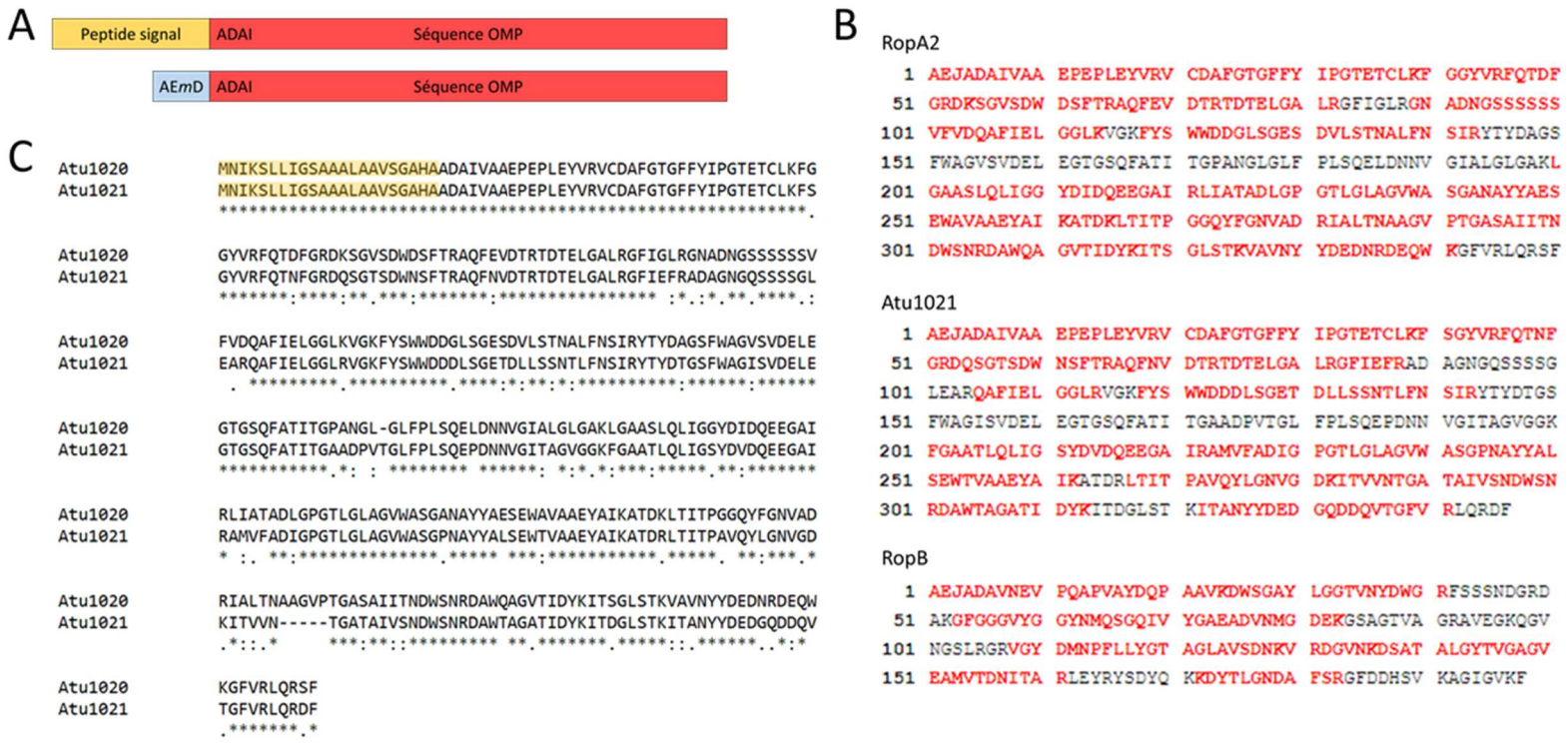


Figure 16 | Identification des séquences hybrides liées à la tige peptidique du PG. (A) Modification de la banque de données de séquences protéiques d'*A. tumefaciens* C58, les séquences possédant un peptide signal et le tétrapeptide (ADAI) conservé sont dupliquées et modifiées afin d'obtenir des protéines hybrides dont la séquence N-terminale est liée à la tige peptidique du PG (AE*m*D). (B) Séquences de RopA2 (Atu1020), $Omp_{At}2$ (Atu1021) et RopB (Atu1131) présentent une couverture de séquences respectivement de 78 %, 73 % et 69 %, dans l'échantillon de PG digéré par la mutanolysine. Les peptides identifiés pour les séquences sont en rouge. Les séquences N-terminales sont identifiées comme hybrides avec la tige peptidique du PG. (C) Alignements des séquences Atu1020 et Atu1021, par MUSCLE, indiquant une forte similarité de séquences. Les cadres jaunes représentent le peptide signal des séquences. « * » : conservation d'un résidu à la même position dans les deux séquences ; « : » : conservation entre des groupes de propriétés fortement similaires (score > 0,5 dans la matrice Gonnet PAM 250) ; « . » conservation entre des groupes de propriétés faiblement similaires (score ≤ 0,5 et > 0 dans la matrice Gonnet PAM 250).

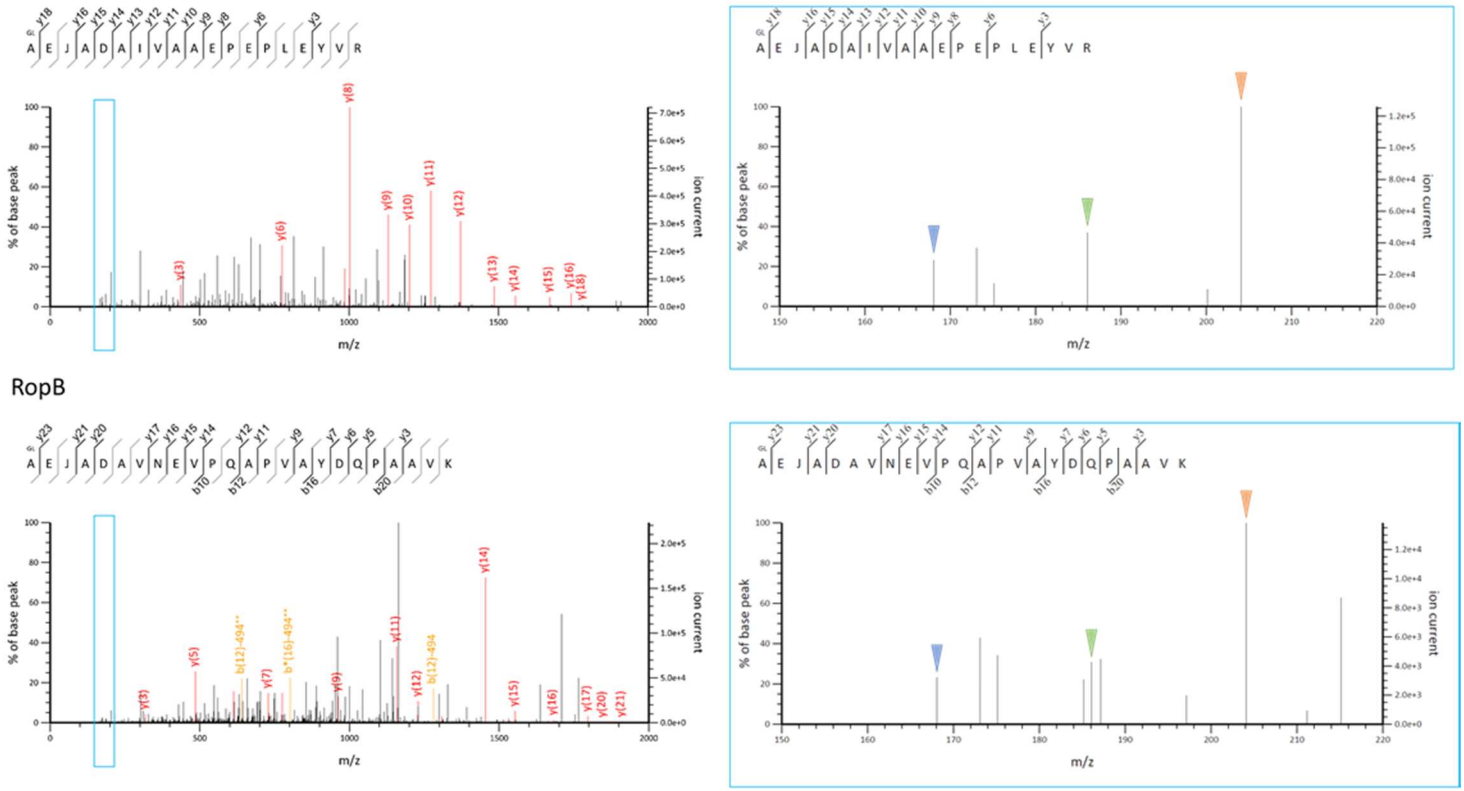
L'identification des protéines par MS est une donnée non quantitative. Cependant au plus le nombre de spectres identifiés est élevé, au plus la protéine est probablement présente en grande quantité dans l'échantillon. Dans les deux conditions de digestion citées ci-dessus, trois OMPs ont été identifiées comme prédominantes : RopA2 (Atu1020), $Omp_{At}2$ (Atu1021) et RopB (Atu1131). L'analyse des séquences peptidiques à partir des données de la MS, montre que les protéines RopA2, $Omp_{At}2$ et RopB présentes une bonne couverture de séquence. Les fragments sans couverture à l'intérieur de la séquence de ces protéines sont probablement trop longs pour être identifiés. La protéine possède en effet des régions plus pauvres en lysine ou en arginine dans sa séquence peptidique. Il est intéressant de noter que la partie N-terminale de ces protéines n'a pas été identifiée. Des modifications covalentes pourraient empêcher l'identification des fragments peptidiques N-terminaux. Une modification possible serait la liaison entre la première alanine du tétrapeptide et le résidu *meso*DAP du peptidoglycane.

Afin de tester cette hypothèse, selon laquelle les protéines RopA2, $Omp_{At}2$ et RopB seraient liées au PG, les fragments protéiques ont été identifiés sur base d'une banque de données de séquences protéiques d'*A. tumefaciens* C58 modifiée. Dans la banque de données, les séquences protéiques possédant un peptide signal et le tétrapeptide conservé (ADAI), sont dupliquées. Le peptide signal est ensuite remplacé par les peptides du PG (l'alanine, le glutamate et l'acide *méso*diaminopimélique, symbolisés par AE*m*D) afin de représenter les protéines liées au PG dans la banque de données (figure 16A). Dans cette analyse, une modification correspondant à la masse de la partie glycosidique GlcNAc – MurNAc (478,18 Da) a été activée de façon variable sur l'alanine. Cela a permis d'identifier les séquences N-terminales des protéines RopA2, $Omp_{At}2$ et RopB dans l'échantillon digéré par la mutanolysine. Ces séquences ont été identifiées avec les peptides AE*m*D (figure 16B). Ce résultat montre que ces trois protéines sont fixées au PG. Il faut noter que RopA2 et l'$Omp_{At}2$ ont des séquences très similaires et surtout leurs parties N-terminale sont parfaitement identiques (figure 16C). Dans les conditions d'analyse, les spectres des fragments correspondant à la séquence N-terminale sont associés aux deux protéines, sans qu'on puisse être sûr que les deux protéines présentent la liaison covalente au *meso*DAP (figure 17A). La glycosylation des fragments N-terminales est confirmée par la présence de pics dans le spectre à un rapport m/z de 204 Da, 186 Da et 168 Da correspondant aux ions oxoniums (figure 17B). Les ions oxoniums sont obtenus lors de la dissociation du Glc*N*Ac durant l'étape de collision entre les deux MS (voir Matériel et méthodes).

Afin de diminuer la présence de contaminants, l'extraction du PG a été traitée plusieurs fois au SDS permettant la dénaturation d'un plus grand nombre de protéines. Nous avons été informés par Stephane Mesnage (Sheffield University, UK) de l'inactivité de l'amidase N-acétylmuramyl-L-alanine de *Streptomyces globisporus*, présente dans la mutanolysine. Afin de cliver la liaison lactyle-amide et d'obtenir les protéines du PG exempt de saccharide, l'amidase N-acetylmuramoyl-L-alanine de *Staphylococcus aureus* a été purifiée (voir Matériel et méthodes). L'extrait de PG sans traitement protéolytique est digéré par cette amidase et par la mutanolysine. Les fragments protéiques de cette digestion ont été soumis à une analyse LC-MS/MS. La banque de données de séquences protéiques d'*A. tumefaciens* C58 modifiée a été utilisée pour identifier la nature des fragments peptidiques. Au total 9 protéines ont été identifiées dont quatre OMPs (tableau S1). RopA2, $Omp_{At}2$, RopB et $Omp_{At}4$ ont respectivement 497, 191, 57 et 15 spectres identifiés. Seules les séquences N-terminales de RopA2 et de l'$Omp_{At}2$ ont été identifiées avec les peptides AE*m*D en amont de la première alanine du tétrapeptide.

Cet échantillon a ensuite été analysé sur base de la banque de données SwissProt des séquences protéiques. Une grande quantité de protéines provenant d'*E. coli* ont été identifiées. Ces

A RopA2 – Atu1021



B

Type	Composition	Masse
Hex*N*Ac	$[C_8H_{14}NO_5]^+$	204,087
Hex*N*Ac – H_2O	$[C_8H_{12}NO_4]^+$	186,076
Hex*N*Ax – $2H_2O$	$[C_8H_{10}NO_3]^+$	168,066

Figure 17 | Spectres des fragments N-terminales associée aux séquences RopA2, $Omp_{At}2$ et RopB. (A) Les spectres à gauche, obtenus pour la protéine RopA2 et $Omp_{At}2$, au-dessus, et pour la protéine RopB, en dessous, après analyse de l'échantillon de PG digéré à la mutanolysine. Les spectres à droite, représentent l'élargissement des cadres bleu, les pics avec un rapport m/z correspondant aux ions oxoniums, marqués avec les flèches, confirment la glycolisation des peptides. (B) Tableau des différents ions oxonium saccharidiques (Halim et al. 2014) , dont le code couleur correspond aux flèches, correspondant à la fragmentation du GlcNAc.

protéines proviennent très probablement de la purification de l'amidase. En effet, l'amidase recombinante a été surproduite chez *E. coli*. Le protocole n'est visiblement pas optimal. Concernant le faible nombre de protéines d'*A. tumefaciens* identifiées, la présence d'une aussi grande quantité de contaminants d'*E. coli* pourrait masquer l'identification des protéines d'*A. tumefaciens*.

Les premières études du PG par LC-MS/MS ont identifié de nombreuses protéines ayant une localisation cytoplasmique prédite. Afin de déterminer un éventuel enrichissement des OMPs dans le PG, un échantillon de lysats d'*A. tumefaciens* a été soumis à une analyse LC-MS/MS. Les fragments protéiques ont été identifiés ensuite sur base de la banque de données de séquences protéiques d'*A. tumefaciens* C58 modifiée. 1146 protéines ont été identifiées dans le lysat d'*A. tumefaciens* (figure S1). Les protéines GroL et TufA ont respectivement 1088 et 894 spectres identifiés. L'identification de ces protéines dans les échantillons de PG s'explique par leur présence en grande proportion dans *A. tumefaciens*. Les protéines cytoplasmiques identifiées dans les échantillons de PG sont donc vraisemblablement des contaminants. Les OMPs ont également été identifiées comme prédominantes (par rapport au nombre de spectres identifié par protéines) dans le lysat d'*A. tumefaciens*. L'enrichissement des OMPs dans les purifications de PG n'est donc pas déterminé.

Les différentes analyses LC-MS/MS ont permis d'identifier deux OMPs liées par un lien peptidique aux acides aminés du PG.

4. Expression de l'Omp25 dans *A. tumefaciens*

A ce jour, nous ne disposons pas d'anticorps reconnaissant les OMPs d'*A. tumefaciens* et nous n'avons pas de souche exprimant des OMPs marquées. Par conséquent, nous avons intégré l'Omp25 de *B. abortus* dans le plasmide pBBR2 (Kan^R) afin de l'exprimer dans *A. tumefaciens*. Cela permettra de déterminer la présence ou non d'OMP sur le PG d'*A. tumefaciens*.

Un western blot anti-Omp25 a été réalisé sur des lysats bactériens et du PG, digéré ou non au lysozyme (figure 18). Des bandes aux alentours de 25 kDa sont détectées dans les lysats bactériens exprimant le pBBR2::*omp25*. Dans les lysats d'*E. coli* digéré ou non au lysozyme, des bandes apparaissent de même taille. Cela pourrait indiquer que l'Omp25 n'est pas lié au PG ou que l'Omp25 a une localisation cytoplasmique et n'est pas exporté en membrane dans *E. coli*. Dans le lysat de *A. tumefaciens* non digéré, une seule bande est détectée. Tandis que dans le lysat digéré, deux bandes apparaissent, dont une avec un poids moléculaire plus élevé. L'Omp25 avec un poids moléculaire plus élevé est détecté uniquement dans les échantillons digérés par le lysozyme. Cela semble indiquer que l'Omp25 est attachée à un composé qui augmente son poids moléculaire. Dans l'échantillon de PG non digéré, aucune bande n'est révélée. Dans la condition où le PG est digéré, une seule bande est détectée au poids moléculaire plus élevé. Cela indique que l'Omp25 est détectée dans le PG seulement lorsque celui-ci est digéré. L'ensemble de ces résultats pourrait indiquer qu'une partie de l'Omp25 exprimée dans *A. tumefaciens*, est liée au PG. Il faut noter que les réplicats de western blot sont hétérogènes. En effet, l'Omp25 n'est pas détectée dans tous les lysats d'*A. tumefaciens* (figure S2). Cela pourrait être dû à un problème d'expression de l'Omp25 chez *A. tumefaciens*.

Le marquage spécifique de l'Omp25 permet de détecter son expression par microscopie à fluorescence. Dans *E. coli* le marquage de l'Omp25 se localise en périphérie de la bactérie (figure 19). L'Omp25 semble être exportée correctement dans la ME. Chez *A. tumefaciens*, très peu de bactéries sont marquées. Le marquage est diffus dans les bactéries et est présent dans la souche sauvage et la souche exprimant l'Omp25 (figure 19). Ces résultats peuvent indiquer un problème dans l'expression de l'Omp25 chez *A. tumefaciens*. Il serait également possible que les exo-polysaccharides de surface masquent l'Omp25 chez *A. tumefaciens*. L'anticorps anti-

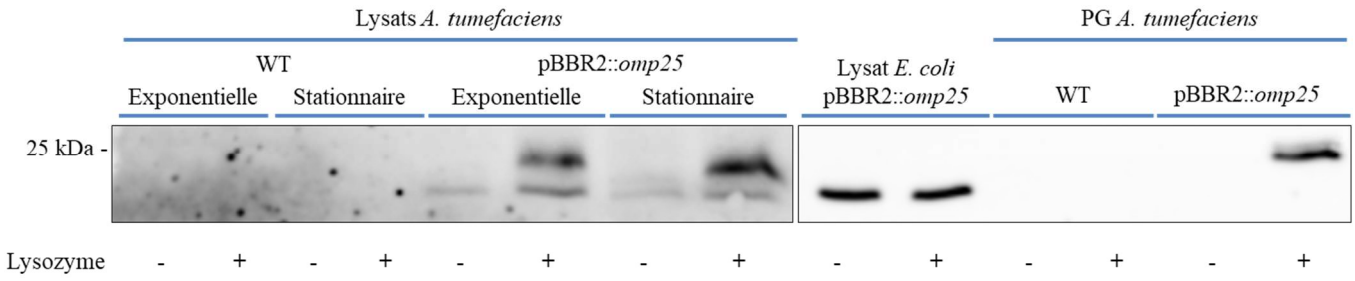


Figure 18 | Expression de l'Omp25 dans *A. tumefaciens*. L'Omp25 est détectable par western blot dans les lysats d'*E. coli* et d'*A. tumefaciens* possédant le plasmide pBBR2::*omp25*. L'Omp25 est observé sous forme libre dans le lysat d'*E. coli* et les lysats d'*A. tumefaciens* non digérés par le lysozyme. Lorsque les lysats d'*A. tumefaciens* sont digérés, l'Omp25 est observé sous forme libre et sous forme attachée. Lorsque le PG est isolé, l'Omp25 n'est détecté que dans le PG digéré d'*A. tumefaciens* possédant le plasmide pBBR2::*omp25*. Dans cette condition, l'Omp25 est observée principalement sous forme attachée.

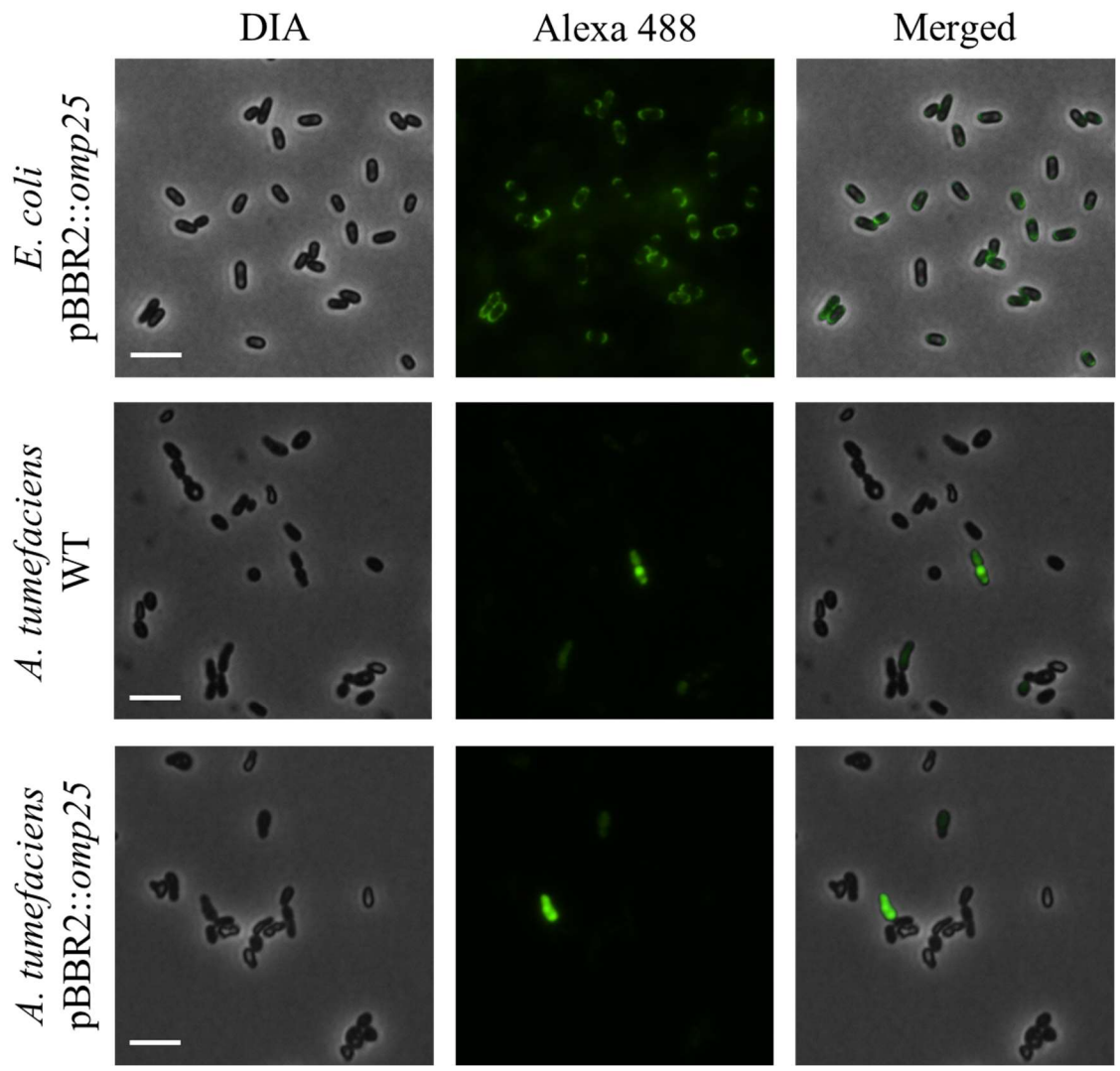


Figure 19 | Immunomarquage de l'Omp25. Dans *E. coli*, l'immunomarquage indique que l'Omp25 est exporté dans la ME et est détectable en surface. L'immunomarquage a été réalisé sur les souches *A. tumefaciens* WT et pBBR2::*omp25*. Un signal similaire est observé dans ces deux souches, indiquant un problème d'expression de l'Omp25 ou d'immunomarquage. La barre d'échelle correspond à 2 µm.

Agrobacterium tumefaciens C58		*Brucella abortus* 544																			
	Ldts	$Ldt_{Ba}1$ BAB1_0047		$Ldt_{Ba}2$ BAB1_0138		$Ldt_{Ba}3$ BAB2_0178		$Ldt_{Ba}4$ BAB1_0589		$Ldt_{Ba}5$ BAB1_0785		$Ldt_{Ba}6$ BAB1_0978		$Ldt_{Ba}7$ BAB1_1159		$Ldt_{Ba}8$ BAB1_1867		$Ldt_{Ba}9$ BAB1_0979		$Ldt_{Ba}10$ BAB1_2007		$Ldt_{Ba}11$ BAB1_2034	
		e value	%id	e value	%id	e value	%id	e value	%id	e value	%id	e value	%id	e value	%id	e value	%id	e value	%id	e value	%id	e value	%id
	$Ldt_{At}1$/Atu0048	2,00e-52	45,16	3,00e-52	59.89	1,00e-30	32.14	2,00e-52	44.29					2,00e-44	36.87								
	$Ldt_{At}2$/Atu0669	9,00e-51	41,03	3,00e-52	47.19	**4,00e-42**	**51.67**	1,00e-48	40.91					3,00e-50	40.76								
	$Ldt_{At}3$/Atu0844	3,00e-58	44,5	7,00e-57	55.25	2,00e-32	44.90	6,00e-62	66.29					7,00e-51	34.10								
	$Ldt_{At}4$/Atu0845	**4,00e-68**	**47,74**	1,00e-58	59.44	2,00e-38	29.87	**6,00e-71**	**61.28**					**8,00e-53**	**31.90**								
	$Ldt_{At}5$/Atu1164									**1,00e-148**	**63.43**							4,00e-72	32.98				
	$Ldt_{At}6$/Atu1293																						
	$Ldt_{At}7$/Atu1615									1,00e-137	25.83	**4,00e-71**	**32.07**					**3,00e-77**	**62.30**				
	$Ldt_{At}8$/Atu2133																7,00e-66	52.80					
	$Ldt_{At}9$/Atu2336	1,00e-56	43,85	**8,00e-59**	**49.74**	5,00e-32	42.66	1,00e-56	44.50					2,00e-50	41.92								
	$Ldt_{At}10$/Atu2764																			**4,00e-63**	**51.49**		
	$Ldt_{At}11$/Atu3331	4,00e-58	55,56	1,00e-57	53.48	7,00e-30	34.27	1,00e-63	59.32					1,00e-45	37.88								
	$Ldt_{At}12$/Atu3332																					7,00e-105	42.73
	$Ldt_{At}13$/Atu3631																					**2,00e-105**	**46.05**
	$Ldt_{At}14$/Atu5196	2,00e-62	45,68	7,00e-55	55.43	9,00e-35	31.28	2,00e-61	53.88					6,00e-51	32.48								

Circular chromosome NC_003062.2
Linear chromosome NC_003063.2
Plasmid NC_003064.2

Tableau 7 | Analyse des alignements de séquences des LDts. Les alignements de séquences des différentes LDts ont été réalisés avec Blastp. Les valeurs de E (*Expect value*) indiquent la similarité entre les séquences, au plus la valeur de E est faible au plus la correspondance est élevée. Le pourcentage d'identité (%id) mesure le pourcentage de mêmes résidus aux mêmes endroits dans un alignement de deux séquences. Les homologies avec la plus petite valeur de E, représentées en gras, suggèrent que les deux protéines sont des orthologues.

Omp25 pourrait interagir avec un composant d'*A. tumefaciens* présent dans certains clones. Ces résultats de microscopie sont très hétérogènes.

5. Homologie des L,D-transpeptidases (LDts)

Chez *E. coli* la formation des liaisons des Lpp au PG est réalisée par l'activité catalytique des LDts. Chez *B. abortus*, les $LDt_{Ba}1$ (BAB1_0047), $LDt_{Ba}2$ (BAB1_0138) et $LDt_{Ba}4$ (BAB1_0589) sont des enzymes qui favorisent la liaison de l'Omp25 au PG dans un système hétérologue. La $LDt_{Ba}4$, plus particulièrement, catalyse la formation de la liaison covalente entre l'Omp25 ou l'Omp2b sur le PG de *B. abortus*. Les précédents résultats indiquent que les protéines RopA et l'$Omp_{At}2$ d'*A. tumefaciens* sont attachées de manière covalente au PG. Il est intéressant de déterminer la conservation ou non des LDts capables de former cette interaction.

Le génome de *A. tumefaciens* C58 a été analysé afin de déterminer les protéines homologues aux LDts de *B. abortus* 544. Des alignements de séquences ont été réalisés entre les huit LDts de *B. abortus* et les quatorze LDts d'*A. tumefaciens*. Ces alignements de séquences ont permis de définir sept LDts de *A. tumefaciens* homologues aux $LDt_{Ba}1$, $LDt_{Ba}2$ et $LDt_{Ba}4$ (tableau 7). Ces trois LDts de *B. abortus* sont des lipoprotéines. Elles favorisent la liaison covalente de l'Omp25 de *B. abortus* au PG d'*E. coli*. Étonnamment, les analyses de séquences ont également mis en évidence trois nouvelles LDts chez *B. abortus* homologues à celles de *A. tumefaciens* : $LDt_{Ba}9$ (BAB1_0979), $LDt_{Ba}10$ (BAB1_2007) et $LDt_{Ba}11$ (BAB1_2034).

La nature protéique des différentes LDts a été prédite (tableau 8). $LDt_{Ba}2$, $LDt_{Ba}11$, $LDt_{At}1$, $LDt_{At}3$, $LDt_{At}9$ et $LDt_{At}12$ ont une prédiction de peptide signal SpII/Sec, désignant des protéines de nature lipoprotéique. $LDt_{Ba}1$, $LDt_{Ba}4$, $LDt_{At}4$, $LDt_{At}11$ et $LDt_{At}14$ ont une prédiction de peptide signal contradictoire entre les serveurs SignalP et LipoP. Les séquences des LDts ont été consultées afin de déterminer la présence ou non d'une lipobox. Une lipobox est une caractéristique commune de la séquence de lipoprotéines, située à l'extrémité C-terminale du peptide signal. Les cinq LDts, avec une prédiction contradictoire du peptide signal, ont été définies comme étant des lipoprotéines suite à l'identification d'une lipobox. Au total, quatre LDts de nature lipoprotéique ont été prédites chez *B. abortus* et sept chez *A. tumefaciens*.

Afin comparer les différentes LDts des deux espèces bactériennes, un arbre phylogénétique a été établi sur base du pourcentage d'identité des séquences alignées. L'alignement multiple de séquences des quatorze LDts de *A. tumefaciens* et des onze LDts de *B. abortus* a été réalisé par le serveur MUSCLE (figure 20). Dans un même cluster sont regroupées les $LDt_{Ba}1$, $LDt_{Ba}2$ et $LDt_{Ba}4$ ainsi que $LDt_{At}3$, $LDt_{At}4$, $LDt_{At}11$ et $LDt_{At}14$. Toutes ces LDts sont évolutivement proches. Les quatre LDts de *A. tumefaciens* dans ce cluster pourraient permettre l'attachement des OMPs au le PG. Ce cluster est uniquement composé de LDts de nature lipoprotéique. Les autres LDts lipoprotéiques ($LDt_{At}1$, $LDt_{At}9$ et $LDt_{Ba}11$) ont une localisation plus disparate dans l'arbre phylogénétique.

6. Co-expression dans *E. coli*

Précédemment, la co-expression dans *E. coli* des différentes $LDts_{Ba}$ et de l'Omp25 de *B. abortus* a permis de déterminer les enzymes ($LDt_{Ba}1$, $LDt_{Ba}2$ et $LDt_{Ba}4$) capables de lier l'Omp25 au PG d'*E. coli*.

Afin de déterminer les enzymes d'*A. tumefaciens* capables de former les liaisons entre les OMPs au PG, plusieurs LDts ($LDt_{At}1$, $LDt_{At}2$, $LDt_{At}4$, $LDt_{At}9$, $LDt_{At}11$ et $LDt_{At}14$) ont été co-exprimées dans *E. coli* avec l'Omp25 de *B. abortus*. Nous ne disposons pas d'anticorps dirigés contre les OMPs de *A. tumefaciens*, ce qui explique ce choix de modèle hétérologue. Les trois nouvelles LDts de *B. abortus* ont également été co-exprimées afin de déterminer de nouvelles enzymes d'attachement des OMPs.

Nom	Gène	Prédiction (SignalP-5.0)	Probabilité (%)	Prédiction (lipoP)	Score	Lipobox
$LDt_{Ba}1$*	BAB1_0047	SpI (Tat)	91,6	SpII	9,78	LTGAAGC
$LDt_{Ba}2$	BAB1_0138	SpII (Sec)	99,27	SpII	21,46	LAGC
$LDt_{Ba}3$	BAB2_0178	SpI (Sec)	98,82	SpI	14,47	/
$LDt_{Ba}4$*	BAB1_0589	SpI (Tat)	60,87	SpII	15,89	LAGC
$LDt_{Ba}5$	BAB1_0785	SpI (Tat)	99,84	SpI	16,04	/
$LDt_{Ba}6$	BAB1_0978	SpI (Tat)	55,05	SpI	16,59	/
$LDt_{Ba}7$	BAB1_1159	SpI (Tat)	79,8	SpI	20,68	/
$LDt_{Ba}8$	BAB1_1867	SpI (Sec)	97,45	SpI	9,46	/
$LDt_{Ba}9$	BAB1_0979	other	98,5	CYT	-0,2	/
$LDt_{Ba}10$	BAB1_2007	other	65,7	CYT	-0,2	/
$LDt_{Ba}11$	BAB1_2034	SpII (Sec)	99,85	SpII	18,38	LAGC
$LDt_{At}1$	Atu0048	SpII (Sec)	99,77	SpII	24,59	LAGC
$LDt_{At}2$	Atu0669	SpI (Sec)	98,77	SpI	14,73	/
$LDt_{At}3$	Atu0844	SpII (Sec)	99,01	SpII	9,42	LMSGC
$LDt_{At}4$*	Atu0845	SpI (Tat)	86,5	CYT	-0,2	LAGC
$LDt_{At}5$	Atu1164	SpI (Tat)	97,82	SpI	16,89	/
$LDt_{At}6$	Atu1293	SpI (Sec)	99,25	SpI	18,03	/
$LDt_{At}7$	Atu1615	SpI (Sec)	75,21	SpI	9,89	/
$LDt_{At}8$	Atu2133	SpI (Sec)	98,29	SpI	13,93	/
$LDt_{At}9$	Atu2336	SpII (Sec)	99,74	SpII	10,10	LAGC
$LDt_{At}10$	Atu2764	other	90,34	CYT	-0,2	/
$LDt_{At}11$*	Atu3331	SpI (Tat)	87,87	SpII	11,40	LAGC
$LDt_{At}12$	Atu3332	SpII (Sec)	92,06	SpII	5,40	LVAC
$LDt_{At}13$	Atu3631	other	97,83	CYT	-0,2	/
$LDt_{At}14$*	Atu5196	SpI (Tat)	54,42	SpII	10,28	LGGC

Tableau 8 | Prédiction du peptide signal. Le serveur SignalP 5.0 permet de prédire la présence de peptide signal et l'emplacement du site de clivage des protéines des bactéries. Le serveur LipoP permet de prédire les lipoprotéines et permet la distinction entre le peptidique signal des lipoprotéines et des autres protéines dans les bactéries à Gram négatif. Une lipobox est une caractéristique commune des lipoprotéines, se situant dans l'extrémité N-terminale du peptide signal. La distribution des acides aminés dans une lipobox est [LVI][ASTVI][GAS][C], dont la dernière cystéine est invariable et commençant principalement par la leucine. * Prédiction non-conclusive. SpI (Sec) : Peptide signal de sécrétion dit standard, protéine transportée par le système de sécrétion Sec et clivé par la Signal Peptidase I (Lep) ; SpII (Sec) : peptide signal d'une lipoprotéine, protéine transportée par le système de sécrétion Sec et clivé par la Signal Peptidase II (Lsp) ; SpI (Tat) : Peptides signal dit Tat, protéine transportée par le système de sécrétion Tat et clivé par la Signal Peptidase I (Lep) ; CYT et other : sans prédiction de peptide signal.

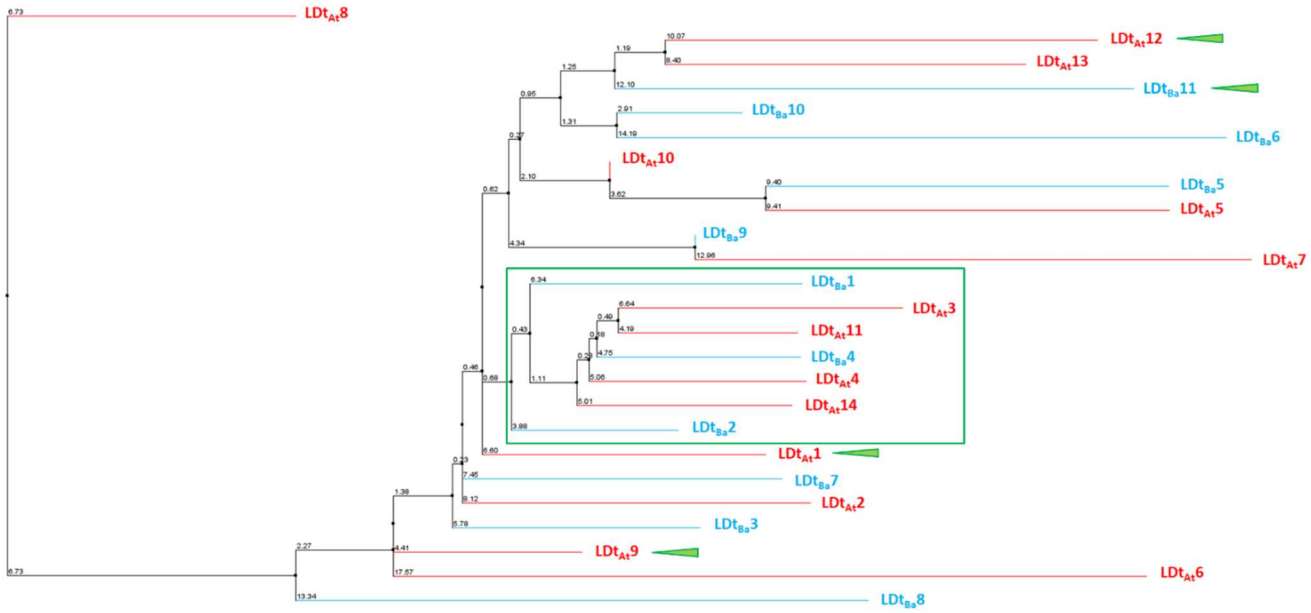


Figure 20 | Arbre phylogénétique des L,D-transpeptidases prédites de *B. abortus* et *A. tumefaciens*. L'arbre phylogénétique a été construit à partir des alignements de séquence multiples réalisées par Muscle avec deux itérations. Jalview a été utilisé pour calculer le PID, l'identité en pourcentage entre les séquences pour chaque alignement. Les LDts de *B. abortus* sont représentées en bleu, tandis que celles de *A. tumefaciens* sont en rouge. L'encadré vert, indique les LDts regroupées dans le même cluster que les $LDt_{Ba}1$, $LDt_{Ba}2$ et $LDt_{Ba}4$. Les LDts de ce cluster sont évolutivement proches et sont de nature lipoprotéique. Les flèches vertes indiquent les LDts de nature lipoprotéiques externes au cluster ci-dessus.

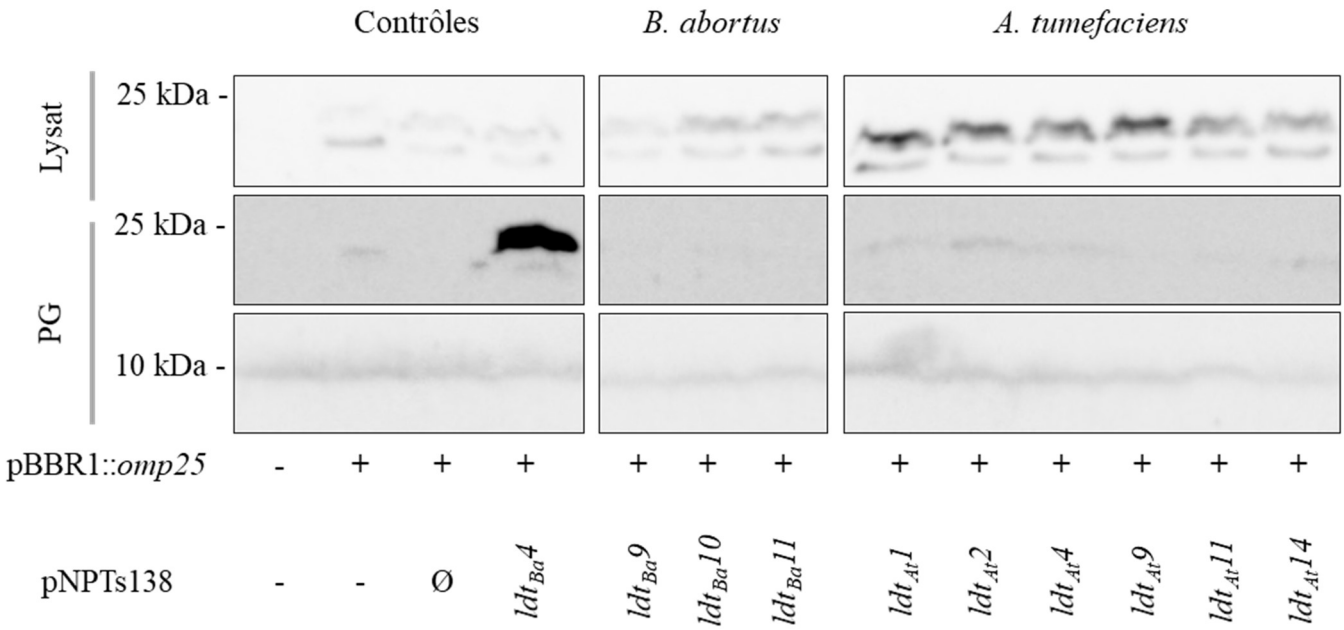


Figure 21 | Co-expression de l'Omp25 et des LDts dans *E. coli*. L'Omp25 est détectable par western blot dans les lysats cellulaires des souches possédant le plasmide pBBR1::*omp25* (encadré supérieur). Lorsque le PG est isolé, l'Omp25 n'est détecté que lorsqu'il est co-exprimé avec la $LDt_{Ba}4$, qui est utilisée comme contrôle positif (encadré central). Lpp est utilisé comme contrôle de charge des échantillons de PG (encadré inférieur).

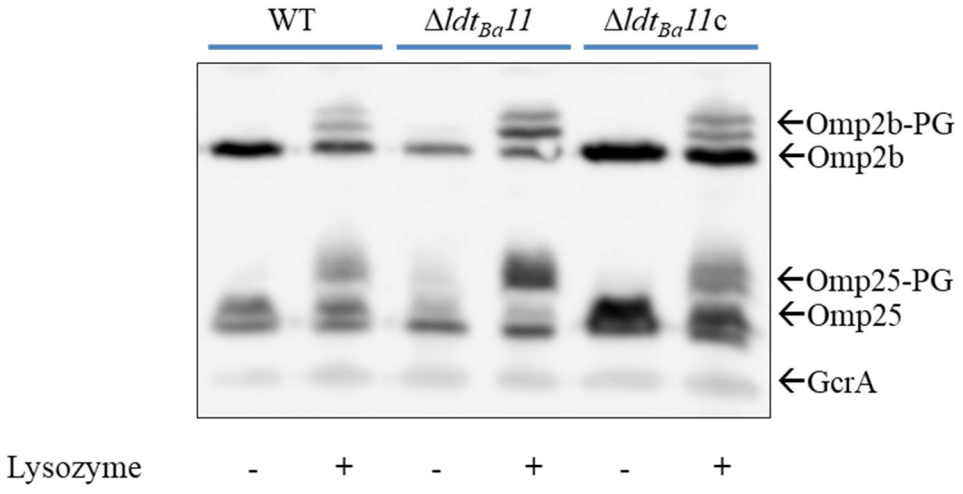


Figure 22 | Impact de la $LDt_{Ba}11$ sur la liaison de l'Omp2b et l'Omp25. Nous avons testé l'effet de la délétion et de la complémentation du mutant $LDt_{Ba}11$ chez *B. abortus*. Dans la souche de délétion, une augmentation des formes liées au PG et une diminution des formes libres de l'Omp25 et l'Omp2b sont observées. La souche de complémentation présente une forte augmentation de la forme libre des deux OMPs. La protéine GcrA a été utilisée comme contrôle de charge.

Le lysat bactérien et le PG digéré par la mutanolysine des souches co-exprimées, ont été analysés par western blot anti-Omp25 (figure 21). Dans les lysats bactériens, deux bandes aux alentours de 25 kDa sont détectées dans toutes les souches contenant le plasmide pBBR1::*omp25*. Cela indique que l'Omp25 est exprimée dans toutes ces souches. L'Omp25 dans les échantillons de PG digérés, est détectée par une forte bande uniquement présente dans la souche de co-expression avec la $LDt_{Ba}4$. Cela indique que seule la $LDt_{Ba}4$ permet la liaison de l'Omp25 sur le PG d'*E. coli*. Les autres LDts ne semblent pas permettre cette liaison de dans les conditions testées.

De très faibles bandes sont détectées dans les extraits de PG de toutes les autres souches exprimant le plasmide pBBR1::*omp25*. Ces bandes pourraient représenter l'Omp25 non liée au PG.

7. LDts de *B. abortus*

Plusieurs mutants de délétion ont été créés dans *B. abortus*. Il a été démontré que lors de la délétion de la $LDt_{Ba}4$, la proportion de l'Omp2b et de l'Omp25 sous forme libre est plus importante. La $LDt_{Ba}4$ semble jouer un rôle dans la liaison de l'Omp2b et de l'Omp25 sur le PG de *B. abortus.* Le mutant de triple délétion des $LDt_{Ba}1$, $LDt_{Ba}2$ et $LDt_{Ba}4$, présente aussi une augmentation des formes libres de l'Omp2b et de l'Omp25. Ces mutants, Δ$ldt_{Ba}4$ et Δ$ldt_{Ba}1,2,4$, forment des *blebs* (des vésicules de ME en surface des bactéries) lors de stress thermiques. Ce phénotype semble indiquer que l'intégrité de la membrane est diminuée. Cependant aucun mutant de délétion, y compris ceux de multiples délétions, ne présente une différence de taille de l'épaisseur du périplasme, analysée par cryo-microscopie électronique. Les liens entre la ME et le PG semblent être conservés, préservant la structure globale de l'enveloppe (P. Godessart, manuscrit en préparation). Il est donc possible qu'une ou plusieurs protéines non déterminées permettent le maintien de cette liaison dans les différents mutants. Les trois nouvelles LDts de *B. abortus* pourraient jouer un rôle dans le maintien de cette liaison. Seule la $LDt_{Ba}11$, de ces trois nouvelles LDts, est de nature lipoprotéique, tout comme la $LDt_{Ba}4$. L'étude se concentre donc d'abord sur cette $LDt_{Ba}11$.

7.1. Fonction de la $LDt_{Ba}11$

Afin d'analyser la fonction et le rôle de la $LDt_{Ba}11$, des mutants ont été construits ; le mutant de délétion Δ$ldt_{Ba}11$ et un mutant de complémentation Δ$ldt_{Ba}11$c, dans lequel le gène $ldt_{Ba}11$ n'est plus présent dans le génome, mais sur le plasmide pBBR1 (Cm^R).

L'analyse par western blot des OMPs liées au PG (l'Omp25 et l'Omp2b) a été réalisée sur les lysats bactériens de ces mutants (figure 22). Cela permet de déterminer la proportion d'OMP libre et liée au PG et ainsi de déduire la capacité de la LDt à lier les OMPs au PG. Dans le lysat de *B. abortus* sauvage non digéré, des bandes correspondant à l'Omp25 et l'Omp2b sont détectées. Lorsque le lysat est digéré par le lysozyme, des bandes de poids moléculaire plus élevé apparaissent en plus des bandes correspondant à l'Omp25 et l'Omp2b. Ce résultat indique qu'une partie de l'Omp25 et de l'Omp2b est liée au PG. Dans le lysat digéré du mutant Δ$ldt_{Ba}11$, les bandes de l'Omp25 et de l'Omp2b sont décelées avec un poids moléculaire plus élevé, et l'épaisseur des bandes est plus importante. Ce résultat indique une augmentation de la proportion des formes liées de l'Omp25 et de l'Omp2b, donc exactement l'inverse de ce que nous aurions attendu si la $LDt_{Ba}11$ contribuait à la liaison des OMPs au PG. Le mutant complémenté, Δ$ldt_{Ba}11$c, présente les bandes de l'Omp25 et de l'Omp2b dont l'intensité est beaucoup plus élevée par rapport à la souche sauvage. Cela indique donc une forte augmentation des formes libres des deux OMPs.

Figure 23 | Alignement des séquences des LDt$_{Ba}$4 et LDt$_{Ba}$11. Aucune des deux cystéines (en rouge) présentes dans la séquence de LDt$_{Ba}$4, n'est conservée dans la séquence de LDt$_{Ba}$11. Les cadres verts représentent la lipobox des séquences. « * » : conservation d'un résidu à la même position dans les séquences ; « : » : conservation entre des groupes de propriétés fortement similaires (score > 0,5 dans la matrice Gonnet PAM 250) ; « . » conservation entre des groupes de propriétés faiblement similaires (score ≤ 0,5 et > 0 dans la matrice Gonnet PAM 250).

Étrangement la délétion de $LDt_{Ba}11$ présente donc un phénotype opposé à la délétion de la $LDt_{Ba}4$. Ce résultat montre que la supposée $LDt_{Ba}11$ (BAB1_2034) semble favoriser la libération de l'Omp2b et de l'Omp25.

La protéine BAB1_2034 ne semble donc pas présenter un rôle de L,D-transpeptidase. La séquence protéique de BAB1_2034 a donc été étudiée plus en profondeur. Un alignement des séquences de la $LDt_{Ba}4$ et de BAB1_2034 montre qu'aucune des deux cystéines présentes dans la séquence de $LDt_{Ba}4$, n'est conservée (figure 23). Cela suggère que la cystéine catalytique de $LDt_{Ba}4$ n'est pas présente dans la séquence de BAB1_2034. Cependant, l'identité de séquence entre les deux protéines est très faible, cinq autres cystéines sont présentes dans la séquence de $LDt_{Ba}11$. On ne peut donc pas exclure que la $LDt_{Ba}11$ soit dépourvue de cystéine catalytique.

La prédiction de la structure tridimensionnelle de BAB1_2034 a été déterminée (figure S4). La prédiction de structure avec le meilleur score et le meilleur pourcentage d'identité de séquence, se base sur la protéine Csd6 de *Helicobacter pylori*. Cette protéine est une LD-carboxypeptidase qui clive la liaison peptidique entre le *meso*DAP et la D-Ala d'une tige peptidique du PG (Sycuro et al. 2013a).

Malgré nos efforts, la construction d'un double mutant, Δ$ldt_{Ba}4$ - Δ*BAB1_2034*, n'a pas été obtenue. Cela pourrait indiquer une létalité synthétique. La délétion simultanée de $ldt_{Ba}4$ et de *BAB1_2034* pourrait en effet déstabiliser la structure de la membrane. Afin de confirmer la létalité synthétique, nous avons construit des souches complémentées Δ$ldt_{Ba}4$c et Δ*BAB1_2034*c. Les protéines $LDt_{Ba}4$ ou BAB1_2034 sont exprimées sur le plasmide pBBR1 (Cm^R) sous l'influence du promoteur *lac*. Dans les souches complémentées Δ$ldt_{Ba}4$c et Δ*BAB1_2034*c, la délétion respective de *BAB1_2034* ou de $ldt_{Ba}4$, n'a jamais abouti malgré la présence d'un plasmide de complémentation. La construction de ces souches a été testée deux fois, avec une centaine de clones vérifiés par PCR de diagnostic afin de déterminer la délétion dans le génome. Il faut noter que le mutant complémenté Δ$ldt_{Ba}4$c présente une augmentation de l'attachement des OMPs. Tandis que le mutant complémenté Δ*BAB1_2034*c présente une augmentation d'OMPs sous forme libre. Ces phénotypes pourraient être induits par la surexpression de LDtBa4 ou de BAB1_2034 sous l'influence du promoteur *lac*.

Étant donné que ce sont des OMPs qui permettent l'attachement de la ME au PG, l'équilibre entre les formes libres et attachées des OMPs pourrait être crucial pour l'intégrité de l'enveloppe. Comme démontré ci-dessus, l'expression de BAB1_2034 sur le plasmide pBBR1 augmente la quantité des OMPs sous forme attachée. Il est possible que la complémentation de BAB1_2034 et l'absence de la $LDt_{Ba}4$ dans une souche, perturbent fortement l'équilibre des formes libres et liées des OMPs.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au sein du laboratoire, l'enveloppe de *B. abortus* a été étudiée afin de comprendre la nature des interactions entre le PG et la ME. Cinq OMPs (Omp2b, Omp25, Omp25c, Omp31-like et OmpW-like) ont été identifiées comme étant liées de façon covalente au *meso*Dap du PG, par leur extrémité N-terminale. Ces OMPs ont toutes une structure en tonneau β avec une extension N-terminale du côté périplasmique. Les quatre premiers acides aminés (ADAI) de la protéine mature sont conservés en position N-terminale dans les différentes OMPs. La liaison covalente de l'Omp25 sur le PG d'*E. coli* est catalysée par les $LDt_{Ba}1$, $LDt_{Ba}2$ et $LDt_{Ba}4$. La $LDt_{Ba}4$ plus particulièrement, semble active dans la formation de la liaison covalente de l'Omp25 ou l'Omp2b sur le PG de *B. abortus* (P. Godessart, manuscrit en préparation).

L'objectif initial de ce mémoire était de déterminer si les interactions OMP-PG identifiées chez *B. abortus* ainsi que les protéines formant ces interactions sont conservées dans *A. tumefaciens*, un organisme modèle de la famille des Rhizobiaceae. Si la conservation est démontrée dans cet organisme homologue, cela pourrait indiquer que l'interaction entre le PG et la ME est conservée au sein des Rhizobiales, comme le suggère la conservation du motif ADAI dans de nombreuses OMPs des Rhizobiales.

L'étude par western blot du PG purifié d'*A. tumefaciens* a indiqué que des protéines de poids moléculaire aux alentours de 37 kDa et de 22 kDa sont attachées de façon covalente au PG (figure 13). Sept protéines chez *A. tumefaciens* ont été identifiées comme homologues aux cinq OMPs de *B. abortus*. Les protéines d'*A. tumefaciens* RopA2, $Omp_{At}2$ et $Omp_{At}7$ sont considérées comme homologues à l'Omp2b de *B. abortus*, et possèdent un poids moléculaire moyen de 36,5 kDa par monomère. Les homologues de l'Omp25 et de l'Omp25c de *B. abortus* sont les protéines RopB, l'$Omp_{At}4$ et l'$Omp_{At}5$ qui présentent un poids moléculaire moyen de 20 kDa. L'$Omp_{At}6$, de poids moléculaire de 21,8 kDa a été identifiée comme étant l'homologue de l'OmpW-like de *B. abortus*. Aucune protéine homologue à l'Omp31-like n'a été identifiée à partir du génome d'*A. tumefaciens* (tableau 6 et 7). La prédiction de structure de ces protéines homologues montre qu'elles ont toutes une structure tridimensionnelle en tonneau β (figure 14). Elles possèdent également une extension N-terminale sans prédiction de structure régulière. Ces extensions commencent toutes par un tétrapeptide conservé, similaire à ADAI. Les OMPs *d'A. tumefaciens* ont donc des caractéristiques structurales similaires aux OMPs de *B. abortus*.

Une étude protéomique a été réalisée sur le PG purifié d'*A. tumefaciens* afin de détecter la liaison forte des OMPs à ce PG. La liaison des protéines RopA2, $Omp_{At}2$ et RopB a été détectée dans les échantillons de PG préalablement digérés au lysozyme ou à la mutanolysine (figure 15). Dans l'échantillon de PG digéré à la mutanolysine, les protéines RopA2, $Omp_{At}2$ et RopB ont été identifiées avec leurs extrémités N-terminales liées de façon covalente au *meso*DAP du PG (figure 16 et 17). Les ions oxoniums correspondant à la fragmentation du Glc*N*Ac ont été identifiés dans cet échantillon, confirmant la nature glycosylée des peptides. Dans ces deux échantillons environ 80 % des protéines ont une prédiction de localisation cytoplasmique. Ces protéines ne devraient pas se retrouver dans l'extraction de PG. Il est probable que ces protéines aient été emportées avec le PG lors des centrifugations, car les sacculi de PG pourraient former des structures similaires à des filets de pêche.

Afin de diminuer l'abondance des contaminants, le PG a été traité plusieurs fois au SDS. Celui-ci a ensuite été digéré à l'amidase de *S. globisporus* ainsi qu'à la mutanolysine. L'étude protéomique de cet échantillon a permis d'identifier les protéines RopA2 et $Omp_{At}2$ comme prédominantes avec les résidus AE*m*D en amont de la première alanine du fragment N-terminal. Dans ces conditions, la protéine RopB n'est pas identifiée comme étant liée au PG. Cependant, dans cette analyse de nombreuses protéines d'*E. coli* ont également été identifiées. Celles-ci

A

```
WP_037184545.1              GKAGAISYQVTGGYDTDNEEGAIRGMLFADIGPGTLGLAGVWASGPNSYYANSEWTVAAE
WP_064691884.1              GTAGAFSYQVTGGWDFDNEDGAIRAMGTVEIGPGTLGLAAVYSSGPNSYYSAAEWAVAAE
WP_128405671.1              GKAGAFSYQITAGWDVDNEDGAVRAMGTVDIGPGTLGLAAVYSSGPNSYYSTAEWAVAAE
WP_018242347.1              GTAGAFSYQVTGGWDVDNEDGAVRAMGTVDIGPGTLGLAAVYSSGPNSYYSTAEWAVAAE
WP_112903495.1              GTAGAFSYQVTGGWDVDNEDGAVRAMGTVDIGPGTLGLAAVYSSGPNSYYSTAEWAVAAE
WP_111798961.1              VKFGAVTANLLGSYDTDQENGAIRAILYADIGPGTFGLSGVWASGANYYYEESEWAVAAE
WP_003512223.1              GKFGAVSANLIASYDFDAENVAVRGILFADVGPGTFGLAGVWASGDNAYYAKSEWAVAVE
Atu1020_WP_010971337.1      AKLGAASLQLIGGYDIDQEEGAIRLIATADLGPGTLGLAGVWASGANAYYAESEWAVAAE
WP_112157210.1              AKIDSVSLQLIGGYDTDRENGSVRLIATADVGPGTLGLSGVWASGANAYYNASEWAVAAE
WP_107676774.1              AKLDGFAFQLIGGYDTDRENGAVRLIATAGIGPGTLGLAGVWASGANAYYNVSEWAVAAE
WP_127640507.1              ASLGGVTFDLLGSYDTEWEEGAIRALLSADAGPGTFQVAGIWASGSNAYWHDSEWAVATS
WP_097587882.1              ATVGGVSIDLLGGYDTEVEEGAIRALVSAELGPGVFQIAGVWASDPNVYFAASEWTVATS
                             . .. : :: ..:* : *: ::* :  .  ***.: ::.:::*. * *:  :**:**..

WP_037184545.1              YAVKVTDKWTVTPMAQYFGSYVT-----------DMDN-GAIPESFDGLDDAWKVGVTV
WP_064691884.1              YAIKATDKLKITPGVQYYGDY-------------------YVTGDDFSDGDAWKVGLTV
WP_128405671.1              YAIKATDKLKITPGVQYYANYIG-----------GASAFETVPSDYDGAGDAWKVGLTV
WP_018242347.1              YAIKATDKLKITPGVQYYGNYIG-----------GASAFDTVPSDYDGAGDAWKVGLTV
WP_112903495.1              YAIKATDKLKITPGVQYYANYIG-----------GASAFDTVPSDYDGAGDAWKVGLTV
WP_111798961.1              YAIKATDKLTITPGAQYLGTI-------------DIAP----DGDFTGDNDAWRAGLTV
WP_003512223.1              YAVKATDRLTITPGFEYLSKL-------------DVN---PVDGDFVGDRDAWTAGLTV
Atu1020_WP_010971337.1      YAIKATDKLTITPGGQYFGNVADRIALTNAAGVPTGAS---AIITNDWSNRDAWQAGVTI
WP_112157210.1              YAIKATDKLKITPGFQYYSGY-------------GLVSF-----DKFSNNDAWKAGLTV
WP_107676774.1              YAIKATDKLKITPGFQYYGGY-------------GIASW-----DEFSDNDAWKAGLTV
WP_127640507.1              YRFNVSDKLAITPGAQYWG---------------GLNESDKLGGRFDNDADQWRVGLTA
WP_097587882.1              YRYNATEKLAITPGLQYWGDY-------------GFV----------SDADQWRGGLAV
                            *  :.::.  :**  :* .                          .  * *  *::

WP_037184545.1              DYQIVDNLYAKATVDYTDVD---NGDDVTKGFFRLQRAF
WP_064691884.1              DYQIVDNFYAKASVQYLDPE---DADDSTTGYFRLQRSF
WP_128405671.1              DYQIVDNFYAKASVQYLDPE---DADDSTTGYFRLQRSF
WP_018242347.1              DYQIVDNFYAKASVQYLDPD---DGDDSTTGYFRLQRSF
WP_112903495.1              DYQIVDNFYAKASVQYLDPE---DADDSTTGYFRLQRSF
WP_111798961.1              DYKITQGLDAKIAANYQDVD--GPTGDSWTGFVRLQRTF
WP_003512223.1              DYKITEGLSTKVTANYYDED---GADDQVTGFVRLQRSF
Atu1020_WP_010971337.1      DYKITSGLSTKVAVNYYDED---NRDEQWKGFVRLQRSF
WP_112157210.1              DYKITDGLSAKVAANYLDVD---TKPEAWTGFVRLQRAF
WP_107676774.1              DYKITDGLTTKLTANYLDID---NRPEQWTGFLRLQRSF
WP_127640507.1              DYDITEGLATRFAINYTDPS---NAPDSVSGFLRLQRDF
WP_097587882.1              DYKITSGLASRVSVQYTSRDIGADTEDFVSGFVRLQRDF
                            **.*...: :. : :* . .     :  .*:.**** *
```

B

Figure 24 | Alignement des séquences des RopA2. (A) RopA2 a été alignée avec certains homologues des organismes de la famille Rhizobiacea, afin de déterminer les régions présentant une variabilité de séquence. Ici seul l'alignement de la partie C-terminale est représenté. En orange, les acides aminés que l'on duplique de part et d'autre de la séquence 3flag ; en bleu, les acides aminés composant la boucle. « * » : conservation d'un résidu à la même position dans les séquences ; « : » : conservation entre des groupes de propriétés fortement similaires (score > 0,5 dans la matrice Gonnet PAM 250) ; « . » conservation entre des groupes de propriétés faiblement similaires (score ≤ 0,5 et > 0 dans la matrice Gonnet PAM 250). (B) Modification de la séquence RopA2 pour insérer l'étiquette 3flag.

pourraient empêcher l'identification des protéines d'*A. tumefaciens*. Ces protéines proviennent très probablement de la purification de l'amidase.

Étant donné que de nombreuses protéines ont été identifiées dans les analyses protéomiques, le lysat d'*A. tumefaciens* a également été analysé afin de déterminer l'enrichissement des OMPs dans les échantillons de PG. La comparaison du nombre de spectres identifiés pour une même protéine dans les différents échantillons, déterminerait l'éventuel enrichissement des OMPs dans le PG. Cette méthode de quantification reste très imparfaite. Les principaux contaminants, tels que les protéines GroL, TufA qui ont été identifiés dans les échantillons de PG, sont également présents dans le lysat (figure S1). Ces protéines sont prédominantes dans *A. tumefaciens*. Cela expliquerait leurs indentifications dans les échantillons de PG. Les OMPs RopA2 et RopB, probablement très abondantes, ont également été identifiées comme prédominantes dans le lysat bactérien. Cette analyse ne détermine donc pas l'enrichissement des OMPs dans les échantillons de PG. Il faut noter que les échantillons de PG et l'échantillon de lysat bactérien n'ont pas été traités à la trypsine en même temps. Cela induit des variabilités dans la digestion des protéines, même si le protocole suivi est identique. Les échantillons digérés à des moments différents sont donc peu comparables. Pour pallier à ces variabilités, il serait intéressant de réaliser de nouvelles analyses de MS sur un échantillon de lysat bactérien et de PG, dont la présence de contaminants est diminuée par multiples traitements au SDS. Ces échantillons seraient digérés à la trypsine en parallèle et donc seront comparables.

A ce jour, nous ne disposons pas d'anticorps reconnaissant les OMPs d'*A. tumefaciens*. Il est donc essentiel de marquer les OMPs afin de pouvoir les détecter et de déterminer leurs expressions ainsi que leurs liaisons au PG chez *A. tumefaciens*.

L'étiquette 3flag a été insérée dans la protéine RopA2, qui est caractérisée comme étant une protéine essentielle chez *A. tumefaciens* (Curtis and Brun 2014). Pour minimiser la possibilité d'interférer avec la structure de la protéine, l'étiquette est intégrée dans une région de grande variabilité. Afin de déterminer les régions présentant une variabilité de séquence, la séquence de RopA2 a été alignée avec certains homologues des organismes de la famille Rhizobiacea (figure 24). La protéine RopA2 présente une prédiction de structure en tonneau β. Ce type de protéines ont souvent une plus grande variabilité de séquence dans les boucles externes (figure 25). Une boucle externe présentant une grande variabilité de séquence, a été sélectionnée pour insérer l'étiquette 3flag. A ce jour, la construction de ce mutant est toujours en cours. La construction du plasmide pNPTs138::*ropA2-3flag*, permettant un échange allélique menant à l'insertion de l'étiquette, s'est avérée difficile. L'intégration de la séquence codante dans le plasmide pNPTs138 n'a été obtenue qu'après le changement des sites de restriction *Bam*HI et *Hind*III par le site de restriction *Eco*RV qui clive en bout francs. Le clivage plasmidique avec les enzymes de restriction *Bam*HI et *Hind*III, aurait été partiel. Lorsque le plasmide est digéré par *Eco*RV, l'insertion du gène *ropA2-3flag* a été possible. Une électroporation a été réalisée afin d'intégrer le plasmide dans *A. tumefaciens*. Lors de la sélection de la recombinaison secondaire des clones, résistants aux sucroses et sensibles à la kanamycine, aucun clone d'*A. tumefaciens* ne s'est avéré sensible à la kanamycine. Il est fortement possible que la concentration en kanamycine utilisée (10 µg/mL) ne soit pas suffisante pour sélectionner les souches contenant le plasmide. Il est également possible que la recombinaison allélique n'ait pas eu lieu, ou encore que l'intégration d'une étiquette 3flag soit toxique à cet endroit.

L'expression de cette protéine marquée (RopA2-3flag) dans *A. tumefaciens* pourrait être visualisée par western blot, utilisant un anticorps ciblant le 3flag. Cela permettrait de confirmer l'attachement de RopA2 au PG et de visualiser la proportion de forme libre et attachée de RopA2 dans différents mutants d'*A. tumefaciens*. Le tétrapeptide de RopA2 pourrait être

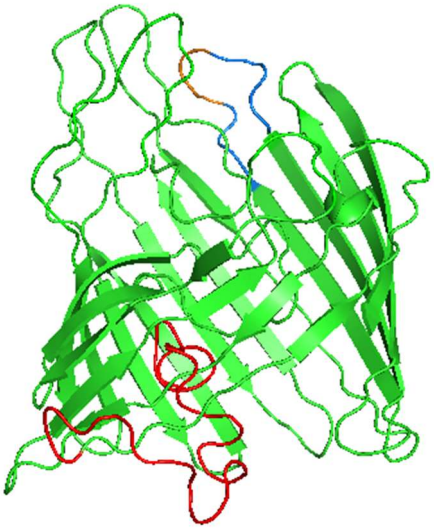


Figure 25 | Prédiction de structure tridimensionnelle des RopA2. La séquence de Rop A2 a été soumise sur le serveur I-Tasseur, sans son peptide signal. En orange, les acides aminés que l'on duplique de part et d'autre de l'étiquette 3flag ; en bleu, les acides aminés composant la boucle. L'étiquette 3flag est insérée dans la septième boucle.

modifié afin de montrer la conservation de son rôle dans la liaison des OMPs au PG dans *A. tumefaciens*.

La microscopie à fluorescence pourrait également être réalisée sur les souches d'*A. tumefaciens* exprimant RopA2-3flag. La détection de RopA2 par microscopie pourrait déterminer si son insertion dans la membrane s'effectue comme l'Omp25 et l'Omp2b chez *B. abortus*. Cela pourrait également de déterminer si RpoA2 forme des *patches* d'enrichissement comme cela a été observé pour son homologue Omp2b chez *B. abortus* (Vassen et al. 2019). L'Omp25 et l'Omp2b ont un site d'insertion principal au pôle de croissance durant la phase exponentielle et au site de constriction durant la division. Ces sites d'insertion correspondent aux sites d'insertion du PG dans les α-protéobactéries (Grangeon et al. 2015). Il serait alors possible que la protéine RopA2 présente un site d'insertion identique à celui du PG.

Comme nous n'avons pas encore obtenu la souche d'*A. tumefaciens* exprimant RopA2-3flag, l'expression de l'Omp25 de *B. abortus* a été tentée dans *A. tumefaciens* afin de détecter son éventuelle attachement au PG. Les résultats de western blot (figure 18) sont hétérogènes, et la microscopie à fluorescence (figure 19) ne détecte pas l'Omp25 sur *A. tumefaciens*. Ces résultats indiquent que l'Omp25 ne semble pas s'exprimer correctement dans *A. tumefaciens.* Il est possible que la concentration en kanamycine utilisée (50 µg/mL) lors de la sélection d'*A. tumefaciens* possédant le plasmide pBBR2::*omp25*, ne soit pas suffisante pour que les souches conservent ce plasmide. Dans la littérature, une concentration plus importante en kanamycine est utilisée afin de sélectionner les clones d'*A. tumefaciens* de délétion. La population d'*A. tumefaciens* serait hétérogène dans ces résultats. Seuls quelques clones auraient acquis le plasmide. Il serait aussi probable que l'expression de l'Omp25 soit toxique chez *A. tumefaciens*. Afin de confirmer ces hypothèses, il est nécessaire de testé la construction d'une souche d'*A. tumefaciens* exprimant l'Omp25 avec une pression de sélection en concentration plus importante. Le western blot et la microscopie à fluorescence permettrait de confirmer l'expression ou non de l'Omp25. Si l'Omp25 s'exprime dans *A. tumefaciens* sa localisation subcellulaire pourrait être détectée par western blot sur les échantillons d'un fractionnement cellulaire.

Chez *B. abortus*, les protéines $LDt_{Ba}1$, $LDt_{Ba}2$ et $LDt_{Ba}4$ sont capables de lier l'Omp25 au PG d'*E. coli*. Sept LDts des quatorze d'*A.* tumefaciens ($LDt_{At}1$, $LDt_{At}2$, $LDt_{At}3$, $LDt_{At}4$, $LDt_{At}9$, $LDt_{At}11$ et $LDt_{At}14$) ont été assignées comme homologues au $LDt_{Ba}1$, $LDt_{Ba}2$ et $LDt_{Ba}4$ par des alignements de séquences (tableau 7). La recherche d'homologie a également permis de mettre en évidence trois « nouvelles » potentielles LDts chez *B. abortus* ; $LDt_{Ba}9$ (BAB1_0979), $LDt_{Ba}10$ (BAB1_2007) et $LDt_{Ba}11$ (BAB1_2034), qui avaient échappé aux analyses d'homologie précédentes, réalisées au sein du laboratoire. Étant donné le nombre important de LDts présentes dans les deux bactéries, un arbre phylogénétique a été établi sur base du pourcentage d'identité des séquences alignées afin de regrouper les différentes LDts en fonction de leurs homologies (figure 20). Les trois LDts de *B. abortus*, $LDt_{Ba}1$, $LDt_{Ba}2$ et $LDt_{Ba}4$, sont regroupées dans un groupe monophylétique avec les $LDt_{At}3$, $LDt_{At}4$, $LDt_{At}11$ et $LDt_{At}14$ d'*A. tumefaciens*. L'hypothèse serait que les LDts de ce groupe pourraient être capables de lier les OMPs au PG. Toutes ces LDts ont été prédites comme étant de nature lipoprotéique.

Des souches d'*E. coli* permettant la co-expression de l'Omp25 et des différentes LDts d'*A. tumefaciens* ainsi que les trois nouvelles LDts de *B. abortus*, ont été générées. Dans ce modèle hétérologue, aucune LDt n'est capable de lier l'Omp25 au PG d'*E. coli* (figure 21). L'absence de liaison de l'Omp25 sur le PG peut être due à un problème d'expression des LDts chez *E. coli* suivant plusieurs hypothèses. Les LDts pourraient être produites mais le repliement des protéines ne serait pas correcte, les LDts seraient donc produites dans un état non-fonctionnel. Il est possible que LDts soient exprimées correctement mais ne sont pas exportées en ME. Donc

elles ne permettraient pas l'attachement de l'Omp25 au PG. Les LDts pourraient simplement ne pas être produites dans *E. coli*, car elles sont toxiques et seuls les clones capables d'éviter de les produire peuvent croître. Il serait également possible que les LDts d'*A. tumefaciens* exprimées individuellement dans *E. coli* ne reconnaissent pas l'Omp25 de *B. abortus*.

Il serait intéressant de tester l'expression et la présence des LDts dans *E. coli*. Un fractionnement d'*E. coli* co-exprimant une LDts pourrait être réalisé. Les différentes fractions seront révélées par bleu de Coomasie, afin d'analyser dans quelles fractions se situe la LDt et de déterminer si elle est exportée correctement. Le rôle des LDts d'*A. tumefaciens* pourrait être identifié pour leurs capacités de lier une OMP d'*A. tumefaciens* au PG. La protéine RopA2 marquée (RopA2-3flag) pourrait être détectée afin de définir ce rôle. Dans un premier temps, la co-expression dans *E. coli* de RopA2-3flag et des différentes LDts pourrait permettre de déterminer les enzymes capables de lier RopA2 au PG d'*E. coli*. Ensuite, des mutants de délétions des LDts pourraient être construits chez *A. tumefaciens* exprimant RopA2-3flag. L'analyse par western blot des lysats de ces mutants révélerait la proportion des formes attachées de RopA2-3flag, et déterminerait ainsi la fonction potentielle prépondérante des LDts d'*A. tumefaciens* pour la liaison de RopA2 au PG. La cryo-microscopie électronique réalisée sur des mutants de délétion d'une ou plusieurs LDts d'*A. tumefaciens* permettrait d'identifier la formation de *blebs*, si l'impact de la délétion est suffisamment importante. L'ajout d'un stress thermique, par exemple pourrait favoriser la formation de *blebs* dans les souches de délétion. Ces souches d'*A. tumefaciens* présenteraient dès lors une déstabilisation de l'enveloppe, indiquant un défaut de liaison entre la ME et le PG.

Etant donné que la triple délétion des LDts de *B. abortus* (Δ*ldt*$_{Ba}$*1,2,4*) ne présente pas de différence de taille périplasmique, les liens entre la ME et le PG semblent donc conservés, préservant la structure globale de l'enveloppe. Il est donc possible qu'une ou plusieurs protéines non déterminées permettent le maintien de cette liaison dans les différents mutants. Les trois nouvelles LDts de *B. abortus* pourraient jouer un rôle dans la liaison de la ME et du PG. Seule la protéine LDt$_{Ba}$11 (BAB1_2034) est identifiée de nature lipoprotéique, tout comme les LDt$_{Ba}$1, LDt$_{Ba}$2 et LDt$_{Ba}$4 (tableau 8). De par cette caractéristique commune, la priorité a été donnée sur l'étude de cette supposée LDt. De façon surprenante, le mutant de délétion de BAB1_2034 présente une augmentation de la proportion des formes liées de l'Omp2b et de l'Omp25, suggérant une libération des OMPs. Ce mutant présente donc un phénotype en opposition à celui attendu, dans le cas d'une délétion de la LDt impliqué dans la formation de lien entre le PG et OMPs.

Le détachement des OMPs pourrait être dû au clivage de la liaison entre le *meso*DAP de la tige peptidique du PG et du résidu L-Ala N-terminale du tétrapeptide des OMPs. Les L,D-carboxypeptidase (LDc) ou les D,D-endopeptidase (DDe) sont des enzymes capables de cliver les liaisons entre le *meso*DAP et la D-Ala. Plus précisément, les LDcs clivent les liaisons peptidiques entre le *meso*DAP et la D-Ala d'une même tige peptidique du PG (Sycuro et al. 2013b). Par contre, les DDe clivent les liaisons peptidiques entre le *meso*DAP et la D-Ala de deux tiges peptidiques (Singh et al. 2012). Ces liaisons entre le *meso*DAP et la D-Ala pourraient être considérées comme semblables à la liaison entre le *meso*DAP de la tige peptidique du PG et la L-Ala du tétrapeptide des OMPs. Dans cette hypothèse, la protéine BAB1_2034 serait capable de cliver la liaison *meso*DAP – L-Ala. Il faut noter que l'alanine du tétrapeptide et des tiges peptidiques sont des énantiomères (L-Ala *vs*. D-Ala). Il est par exemple possible qu'il existe une protéine secondaire permettant de permuter les énantiomères L-Ala en D-Ala. Il serait aussi possible que les LDts catalysant la liaison des OMPs au PG, permutent l'énantiomère L-Ala en D-Ala afin de permettre l'attachement au *meso*DAP. La protéine BAB1_2034 serait alors capable de reconnaitre la liaison et de la cliver.

Chez *B. abortus*, la délétion simultanée des protéines $LDt_{Ba}4$ et BAB1_2034 entraine une létalité synthétique. Les souches complémentées Δ*ldt*$_{Ba}$*4*c et Δ*BAB1_2034*c présentent respectivement une augmentation de l'attachement des OMPs et une augmentation des OMPs sous forme libre. Ces phénotypes pourraient être induits par l'expression de $LDt_{Ba}4$ et de BAB1_2034 sous l'influence du promoteur *lac*. Ces protéines semblent être surexprimées. Leurs actions respectives sur les OMPs seraient donc plus importantes. Ces résultats supposent que lors de la modification de l'expression des protéines BAB1_2034 et $LDt_{Ba}4$ (par délétion ou par expression sous l'influence du promoteur *lac*), l'équilibre entre les formes libres et attachées des OMPs serait fortement perturbé. Cet équilibre pourrait être crucial pour l'intégrité de l'enveloppe.

Dans ces souches complémentées, la délétion de *BAB1_2034* ou de *ldt*$_{Ba}$*4* n'a jamais abouti. Les souches Δ*BAB1_2034*c et Δ*ldt*$_{Ba}$*4* présentent le même phénotype, à savoir, l'augmentation des formes libres des OMPs. La réduction de liaisons entre les OMPs et le PG pourrait induire la perte du lien entre la ME et le PG et donc la diminution de l'intégrité membranaire. A l'inverse, les souches Δ$LDt_{Ba}4$c et ΔBAB1_2034 présentent une augmentation des formes attachées des OMPs. L'augmentation du nombre de liaisons entre la ME et le PG augmenterait la rigidité de la membrane, empêchant par exemple la division cellulaire.

Il serait intéressant d'essayer de construire des souches de déplétion (Δ*BAB1_2034*i ; Δ*ldt*$_{Ba}$*4*i), dont le promoteur plasmidique serait inductible. La délétion des protéines BAB1_2034 ou $LDt_{Ba}4$ dans ces souches de déplétion permettrait d'étudier le phénotype des doubles mutants lors de l'arrêt de l'induction. L'analyse des courbes de croissance de ces souches pourrait aussi étudier la co-létalité proposée plus haut. La microscopie optique en contraste de phase réalisée sur les souches déplétées et délétées, à différents temps après l'arrêt de l'induction, permettrait de détecter l'évolution des phénotypes, et de déterminer la déstabilisation de l'enveloppe.

En parallèle, la fonction des LDts aussi bien de *B. abortus* que d'*A. tumefaciens*, pourrait être déterminée *in vitro*. Pour ce faire, les LDts seraient surexprimées dans *E. coli*, et ensuite, extraites et purifiées. Chaque LDt serait incubée dans un milieu contenant des chaines glycaniques solubles portant des tétrapeptides non réticulés, des sacculi de PG purifié et les différentes OMPs. Le produit de la réaction sera digéré par la mutanolysine et ensuite analysé par HPLC afin de déterminer le type et la quantité de réticulations formées entre les tiges peptidiques du PG. Ce produit de réaction pourrait également être digéré par la trypsine et analysé par LC-MS/MS, l'attachement des fragments N-terminaux des OMPs aux peptides du PG pourrait donc être identifié (Morè et al. 2019).

Les structures qui garantissent l'intégrité de l'enveloppe de *B. abortus* ont été déterminées au sein du laboratoire. La ME est liée au PG par des protéines en tonneau β avec une extension N-terminale périplasmique. Le tétrapeptide conservé (ADAI) des OMPs a été identifié comme étant lié de façon covalente au PG. Chez *B. abortus*, les LDts capables de former la liaison entre les OMPs et le PG, n'ont pas encore toutes été identifiées. Ce travail de mémoire montre que le système d'interaction entre la ME et le PG maintenant l'intégrité de l'enveloppe, est conservé chez *A. tumefaciens*. En effet, les OMPs RopA2, $Omp_{At}2$ et RopB, ont été mises en évidence chez *A. tumefaciens* comme étant liées de façon covalente au PG, par un système similaire à celui découvert chez *B. abortus*. Bien qu'aucune LDts d'*A. tumefaciens* n'ait été identifiée comme étant capable de former la liaison des protéines au PG, les expériences proposées ci-dessus permettront probablement d'apporter des éléments de réponse. Cette conservation dans *A. tumefaciens* indiquerait une certaine conservation du système d'interaction dans les autres Rhizobiales.

BIBLIOGRAPHIE

Asmar, Abir T., Josie L. Ferreira, Eli J. Cohen, Seung Hyun Cho, Morgan Beeby, Kelly T. Hughes, and Jean François Collet. 2017. "Communication across the Bacterial Cell Envelope Depends on the Size of the Periplasm." *PLoS Biology* 15 (12): 1–16. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004303.

Boigegrain, Rose-anne, Imed Salhi, Maria-Teresa Alvarez-Martinez, Jan Machold, Yann Fedon, Martine Arpagaus, Christoph Weise, Michael Rittig, and Bruno Rouot. 2004. "Release of Periplasmic Proteins of Brucella Suis upon Acidic Shock Involves the Outer Membrane Protein Omp25." *Infection and Immunity* 72 (10): 5693–5703. https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.5693.

Braun, Volkmar, and Valerie Bosch. 1972. "Sequence of the Murein . Lipoprotein and the Attachment Site of the Lipid." *European Journal of Biochemistry* 28 (1): 51–69. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1972.tb01883.x.

Brown, Pamela J B, Miguel A de Pedro, David T Kysela, Charles Van der Henst, Jinwoo Kim, Xavier De Bolle, Clay Fuqua, and Yves V Brun. 2012. "Polar Growth in the Alphaproteobacterial Order Rhizobiales." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (5): 1697–1701. https://doi.org/10.1073/pnas.1200309109.

Cameron, Todd A., James Anderson-Furgeson, John R. Zupan, Justin J. Zik, and Patricia C. Zambryski. 2014. "Peptidoglycan Synthesis Machinery in Agrobacterium Tumefaciens During Unipolar Growth and Cell Division." *MBio* 5 (3): 1–10. https://doi.org/10.1128/mbio.01219-14.

Cremniter, Julie, Jean-luc Mainardi, Nathalie Josseaume, Jean-charles Quincampoix, Lionel Dubost, Jean-emmanuel Hugonnet, Arul Marie, Laurent Gutmann, Louis B Rice, and Michel Arthur. 2006. "Novel Mechanism of Resistance to Glycopeptide Antibiotics in Enterococcus Faecium." *The Journal of Biological Chemetry* 281 (43): 32254–62. https://doi.org/10.1074/jbc.M606920200.

Curtis, Patrick D., and Yves V. Brun. 2014. "Identification of Essential Alphaproteobacterial Genes Reveals Operational Variability in Conserved Developmental and Cell Cycle Systems." *Molecular Microbiology* 93 (4): 713–35. https://doi.org/10.1111/mmi.12686.

Dubray, Gérard, and Christiane Charriaut. 1983. "Evidence of Three Major Polypeptide Species Ans Two Major Polysaccharide Species in the Brucella Outer Membrane." *Annales de Recherches Vétérinaires* 14 (3): 311–18.

Edgar, Robert C. 2004. "MUSCLE : A Multiple Sequence Alignment Method with Reduced Time and Space Complexity." *BMC Bioinformatics* 5 (113): 1–19. https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113.

Flärdh, Klas. 2003. "Essential Role of DivIVA in Polar Growth and Morphogenesis in Streptomyces Coelicolor A3 (2)." *Molecular Microbiology* 49 (6): 1523–36. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03660.x.

Gasteiger, Elisabeth, Christine Hoogland, Alexandre Gattiker, Séverine Duvaud, Marc R Wilkins, Ron D Appel, and Amos Bairoch. n.d. "Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server." In *The Proteomics Protocols Handbook*, edited by J. M. Walker, Humana Pre, 571–608. Totowa, NJ. https://doi.org/https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571.

Grangeon, Romain, John R. Zupan, James Anderson-Furgeson, and Patricia C. Zambryski. 2015. “PopZ Identifies the New Pole, and PodJ Identifies the Old Pole during Polar Growth in Agrobacterium Tumefaciens.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (37): 11666–71. https://doi.org/10.1073/pnas.1515544112.

Hayat, Sikander, Christoph Peters, Nanjiang Shu, Konstantinos D Tsirigos, and Arne Elofsson. 2016. “Structural Bioinformatics Inclusion of Dyad-Repeat Pattern Improves Topology Prediction of Transmembrane b -Barrel Proteins.” *Structural Bioinformatics* 32 (10): 1571–73. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw025.

Laloux, Géraldine, Michaël Deghelt, Marie de Barsy, Jean Jacques Letesson, and Xavier de Bolle. 2010. “Identification of the Essential Brucella Melitensis Porin Omp2b as a Suppressor of Bax-Induced Cell Death in Yeast in a Genome-Wide Screening.” *PLoS ONE* 5 (10). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013274.

Letek, Michal, Efrén Ordonez, José Vaquera, William Margolin, Klas Flärdh, Luis M. Mateos, and José A. Gil. 2008. “DivIVA Is Required for Polar Growth in the MreB-Lacking Rod-Shaped Actinomycete Corynebacterium Glutamicum.” *Journal of Bioenergetics* 190 (9): 3283–92. https://doi.org/10.1128/JB.01934-07.

Magnet, Sophie, Samuel Bellais, Lionel Dubost, Martine Fourgeaud, Jean-Luc Mainardi, Sébastien Petit-Frère, Arul Marie, Dominique Mengin-Lecreulx, Michel Arthur, and Laurent Gutmann. 2007. “Identification of the L,D-Transpeptidases Responsible for Attachment of the Braun Lipoprotein to Escherichia Coli Peptidoglycan.” *Journal of Bacteriology* 189 (10): 3927–31. https://doi.org/10.1128/JB.00084-07.

Mainardi, Jean-luc, Martine Fourgeaud, Jean-emmanuel Hugonnet, Lionel Dubost, Jean-paul Brouard, Jamal Ouazzani, Louis B Rice, et al. 2005. “A Novel Peptidoglycan Cross-Linking Enzyme for a B-Lactam-Resistant Transpeptidation Pathway.” *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 280 (46): 38146–52. https://doi.org/10.1074/jbc.M507384200.

Mainardi, Jean-Luc, Jean-Emmanuel Hugonnet, Filippo Rusconi, Martine Fourgeaud, Lionel Dubost, Angèle Nguekam Moumi, Vanessa Delfosse, et al. 2007. “Unexpected Inhibition of Peptidoglycan LD-Transpeptidase from Enterococcus Faecium by the β-Lactam Imipenem.” *The Journal of Biological Chemetry* 282 (42): 30414–22. https://doi.org/10.1074/jbc.M704286200.

Mainardi, Jean-luc, Raymond Legrand, Michel Arthur, Bernard Schoot, Jean van Heijenoort, and Laurent Gutmann. 2000. “Novel Mechanism of β-Lactam Resistance Due to Bypass of DD-Transpeptidation in Enterococcus Faecium.” *The Journal of Biological Chemetry* 275 (22): 16490–96. https://doi.org/10.1074/jbc.M909877199.

Meeske, Alexander J, Eammon P Riley, William P Robins, Tsuyoshi Uehara, John J. Mekelanos, Daniel Kahne, Suzanne Walker, Andrew C Kruse, Thomas G. Bernhardt, and David Z Rudner. 2016. “SEDS Proteins Are a Widespread Family of Bacterial Cell Wall Polymerases.” *Nature* 537 (7622): 634–38. https://doi.org/10.1038/nature19331.SEDS.

Morè, Niccolò, Alessandra M. Martorana, Jacob Biboy, Christian Otten, Matthias Winkle, Carlos K. Gurnani Serrano, Alejandro Montón Silva, et al. 2019. “Peptidoglycan Remodeling Enables Escherichia Coli To Survive Severe Outer Membrane Assembly Defect.” *MBio* 10 (1): 16–18. https://doi.org/10.1128/mBio.02729-18.

Moreno, Edgardo, and Ignacio Moriyón. 2006. “The Genus Brucella.” In *The Prokaryotes*, edited by Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer, and Erko Stackebrandt, Third, 315–456. Springer. https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_17.

Ncbi Resource Coordinators. 2016. “Database Resources of the National Center for Biotechnology Information.” *Nucleic Acids Research* 44: 7–19. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1290.

Nielsen, Henrik, Konstantinos D Tsirigos, Søren Brunak, and Gunnar Von Heijne. 2019. “A Brief History of Protein Sorting Prediction.” *The Protein Journal* 38 (3): 200–216. https://doi.org/10.1007/s10930-019-09838-3.

Paquet, Jean-yves, Maria A Diaz, Stephanie Genevrois, Maggy Grayon, Jean-michel Verger, Xavier De Bolle, Jeremy H Lakey, Jean-jacques Letesson, and Axel Cloeckaert. 2001. “Molecular , Antigenic , and Functional Analyses of Omp2b Porin Size Variants of Brucella Spp .” *Journal of Bacteriology* 183 (16): 4839–47. https://doi.org/10.1128/JB.183.16.4839.

Pedro, Miguel A de, José Carlos Quintela, Joachim-V. Holtje, and Heinz Schwarz. 1997. “Murein Segregation in Escherichia Coli.” *Journal of Bacteriology* 179 (9): 2823–34. https://doi.org/De Pedro, M. A., Quintela, J. C., Höltje, J. V., & Schwarz, H. (1997). Murein segregation in Escherichia coli. Journal of Bacteriology, 179(9), 2823–2834. doi:10.1128/jb.179.9.2823-2834.1997.

Pisabarro, Antonio G, Miguel A De Pedro, and David Vazquez. 1985. “Structural Modifications in the Peptidoglycan of Escherichia Coli Associated with Changes in the State of Growth of the Culture.” *Journal of Bacteriology* 161 (1): 238–42.

Rahman, Obaidur, Stephen P. Cummings, Dean J Harrington, and Iain C Sutcliffe. 2008. “Methods for the Bioinformatic Identification of Bacterial Lipoproteins Encoded in the Genomes of Gram-Positive Bacteria.” *World Journal Microbiology Biotechnology* 24: 2377–82. https://doi.org/10.1007/s11274-008-9795-2.

Rojas, Enrique R, Gabriel Billings, Pascal D Odermatt, George K Auer, Lillian Zhu, Amanda Miguel, Fred Chang, Douglas B. Weibel, Julie A. Theriot, and Kerwyn Casey Huang. 2018. “The Outer Membrane Is an Essential Load-Bearing Elementelement in Gram-Negative Bacteria.” *Nature* 559: 617–621.

Roy, Ambrish, Alper Kucukural, and Yang Zhang. 2010. “I-TASSER: A Unified Platform for Automated Protein Structure and Function Prediction.” *Nature Protocols* 5 (4): 725–38. https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5.

Sanderson, K E, T Macalister, J W Costerton, and K Cheng. 1974. “Permeability of Lipopolysaccharide-Deficient (Rough) Mutants of Salmonella Typhimuvium to Antibiotics, Lysozyme, and Other Agents.” *Canadian Journal of Microbiology* 20 (14).

Sham, Lok-To, Emily K. Butler, Matthew D. Lebar, Daniel Kahne, Thomas G. Bernhardt, and Natividad Ruiz. 2015. “MurJ Is the Flippase of Lipid-Linked Precursors for Peptidoglycan Biogenesis.” *Science* 345 (6193): 220–22. https://doi.org/10.1126/science.1254522.MurJ.

Singh, Santosh Kumar, L Saisree, Ravi N Amrutha, and Manjula Reddy. 2012. “Three Redundant Murein Endopeptidases Catalyse an Essential Cleavage Step in Peptidoglycan Synthesis of Escherichia Coli K12.” *Molecular Microbiology* 86 (5):

1036–51. https://doi.org/10.1111/mmi.12058.

Sycuro, Laura K., Chelsea S. Rule, Timothy W. Petersen, Timna J. Wyckoff, Tate Sessler, Dilip B. Nagarkar, Fakhra Khalid, et al. 2013a. “Flow Cytometry-Based Enrichment for Cell Shape Mutants Identifies Multiple Genes That Influence Helicobacter Pylori Morphology.” *Molecular Microbiology* 90 (4): 869–83. https://doi.org/10.1111/mmi.12405.

Sycuro, Laura K, Chelsea S Rule, Timothy W Petersen, Timna J Wyckoff, Tate Sessler, Dilip B Nagarkar, Fakhra Khalid, et al. 2013b. “Flow Cytometry-Based Enrichment for Cell Shape Mutants Identifies Multiple Genes That Influence Helicobacter Pylori Morphology.” *Molecular Microbiology* 90 (4): 869–83. https://doi.org/10.1111/mmi.12405.

Taguchi, Atsushi, Michael A Welsh, Lindsey S Marmont, Wonsik Lee, Megan Sjodt, Andrew C Kruse, Daniel Kahne, Thomas G Bernhardt, and Suzanne Walker. 2019. “FtsW Is a Peptidoglycan Polymerase That Is Functional Only in Complex with Its Cognate Penicillin-Binding Protein.” *Nature Microbiolgy* 4 (4): 587–94. https://doi.org/10.1038/s41564-018-0345-x.FtsW.

Takacs, Constantin N, Sebastian Poggio, Godefroid Charbon, Mathieu Pucheault, Waldemar Vollmer, and Christine Jacobs-wagner. 2010. “MreB Drives De Novo Rod Morphogenesis in Caulobacter Crescentus via Remodeling of the Cell Wall.” *Journal of Bacteriology* 192 (6): 1671–84. https://doi.org/10.1128/JB.01311-09.

Thanky, Niren R, Douglas B Young, and Brian D Robertson. 2007. “Unusual Features of the Cell Cycle in Mycobacteria : Polar-Restricted Growth and the Snapping-Model of Cell Division.” *Tuberculosis* 87: 231–36. https://doi.org/10.1016/j.tube.2006.10.004.

Typas, Athanasios, Manuel Banzhaf, Carol A. Gross, and Waldemar Vollmer. 2012. “From the Regulation of Peptidoglycan Synthesis to Bacterial Growth and Morphology.” *Nature Reviews Microbiology* 10 (2): 123–36. https://doi.org/10.1038/nrmicro2677.

Vassen, Victoria, Claire Valotteau, Cécile Feuillie, Cécile Formosa-Dague, Yves F Dufrêne, and Xavier De Bolle. 2019. “ Localized Incorporation of Outer Membrane Components in the Pathogen Brucella Abortus .” *The EMBO Journal* 38 (5): 1–15. https://doi.org/10.15252/embj.2018100323.

Vollmer, Waldemar, and Ute Bertsche. 2008. “Murein (Peptidoglycan) Structure , Architecture and Biosynthesis in Escherichia Coli.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1778 (9): 1714–34. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.06.007.

Vollmer, Waldemar, Didier Blanot, and Miguel A. de Pedro. 2008. “Peptidoglycan Structure and Architecture.” *FEMS Microbiology Reviews* 32 (2): 149–67. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x.

Wang, Yan-fei, Raimund Dutzler, Pierre J Rizkallah, Jurg P Rosenbusch, and Tilman Schirmer. 1997. “Channel Specificity : Structural Basis for Sugar Discrimination and Differential Flux Rates in Maltoporin.” *Journal of Molecular Biology* 272: 56–63. https://doi.org/DOI: 10.1006/jmbi.1997.1224.

Waterhouse, Andrew M, James B Procter, David M A Martin, Michèle Clamp, and Geoffrey J Barton. 2009. “Jalview Version 2 — a Multiple Sequence Alignment Editor and Analysis Workbench.” *Bioinformatics* 25 (9): 1189–91. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033.

Yamashita, Satoshi, and Susan K Buchanan. 2010. “Solute and Ion Transport : Outer Membrane Pores and Receptors.” *EcoSal Plus*, 1–14. https://doi.org/doi:10.1128/ecosalplus.3.3.1.

Yu, Nancy Y, James R Wagner, Matthew R Laird, Gabor Melli, Sébastien Rey, Raymond Lo, Phuong Dao, et al. 2010. “PSORTb 3 . 0 : Improved Protein Subcellular Localization Prediction with Refined Localization Subcategories and Predictive Capabilities for All Prokaryotes.” *Bioinformatics* 26 (13): 1608–15. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq249.

Zupan, John R., Romain Grangeon, José Sebastian Robalino-Espinosa, Nydia Garnica, and Patricia C. Zambryski. 2019. “GROWTH POLE RING Protein Forms a 200-Nm-Diameter Ring Structure Essential for Polar Growth and Rod Shape in Agrobacterium Tumefaciens.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1–6. https://doi.org/10.1073/pnas.1905900116.

ANNEXES

Identified Proteins (379)	Accession Number	Alternate ID	Spectral Count	Localisation	Additional comments	Modified version DB
Cluster of Porina	A9CJL0_AGRFC	Atu1020	497	ME		Y
Porina	A9CJK9_AGRFC	Atu1021	191	ME		Y
Outer membrane protein	Q7CZX2_AGRFC	ropB	57	ME		Y
30S ribosomal protein S13	RS13_AGRFC	rpsA	22	CYT		N
Elongation factor Tu	EFTU_AGRFC	tufA	17	CYT		N
Outer membrane protein	Q7CXQ9_AGRFC	omp	15	ME		Y
Uncharacterized proteina	A9CFY8_AGRFC	Atu4026	11	P	SPI, BOCTOPUS NOK	Y
30S ribosomal protein S3	RS3_AGRFC	purA	3	CYT		N
ATP synthase subunit beta	ATPB_AGRFC	atpD	4	CYT		N

Tableau S1 | Analyse protéomique du PG digéré à l'amidase de *S. globisporus* et au lysozyme. Au total 9 protéines ont été identifiées. La localisation subcellulaire de ces protéines a été prédite avec l'arbre décisionnel.

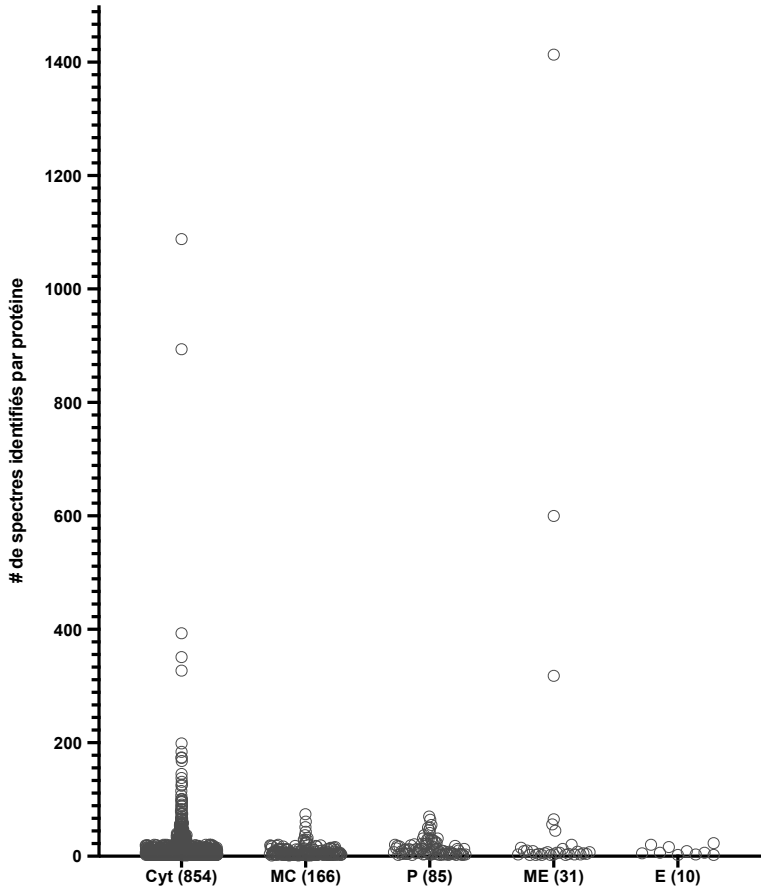


Figure S1 | Classification des protéines identifiées par LS-MS/MS dans le lysat d'*A. tumefaciens*. La classification des protéines identifiées est réalisée en fonction du nombre de spectres par protéine et de leur prédiction de localisation subcellulaire. 1146 protéines ont été identifiées dans le lysat d'*A. tumefaciens*. Les protéines GroL et TufA ont respectivement 1088 et 894 spectres identifiés. Les OMPs ont également été identifiées comme prédominantes avec un nombre de spectres de 1413 pour RopA2, 600 pour RopB et 318 pour l'$Omp_{At}2$.

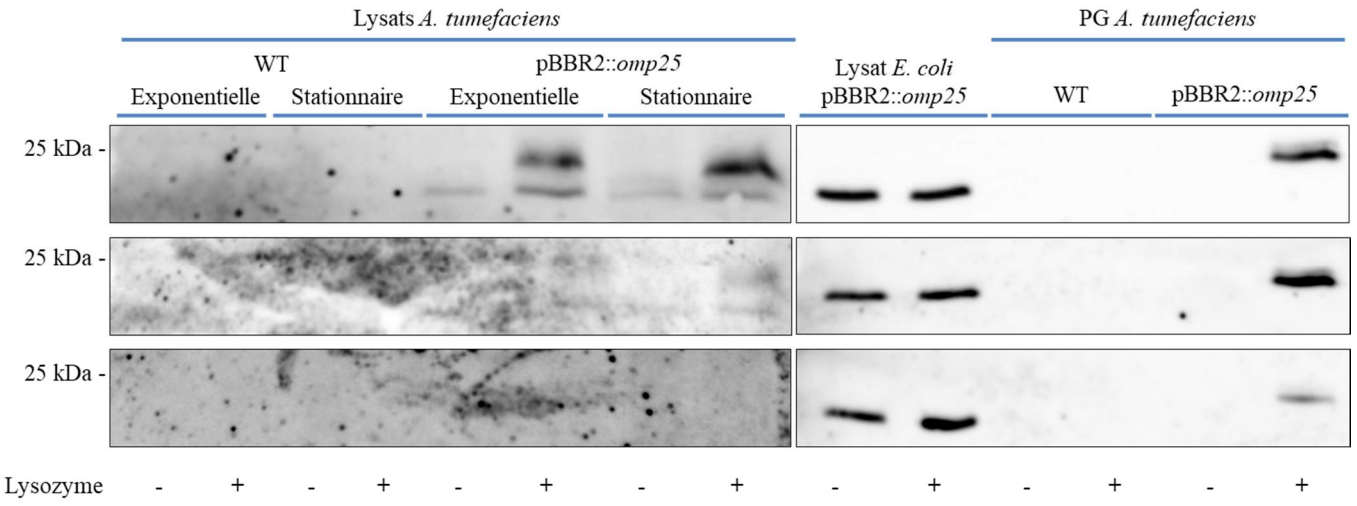


Figure S2 | Triplicats de l'expression de l'Omp25 dans *A. tumefaciens*. L'Omp25 n'est pas détectée dans tous les lysats d'*A. tumefaciens*, présentant une hétérogénéité. L'Omp25 est détectable par western blot dans les lysats d'*E. coli*. Lorsque le PG est isolé, l'Omp25 n'est détectée que dans le PG digéré d'*A. tumefaciens* possédant le plasmide pBBR2::*omp25*.

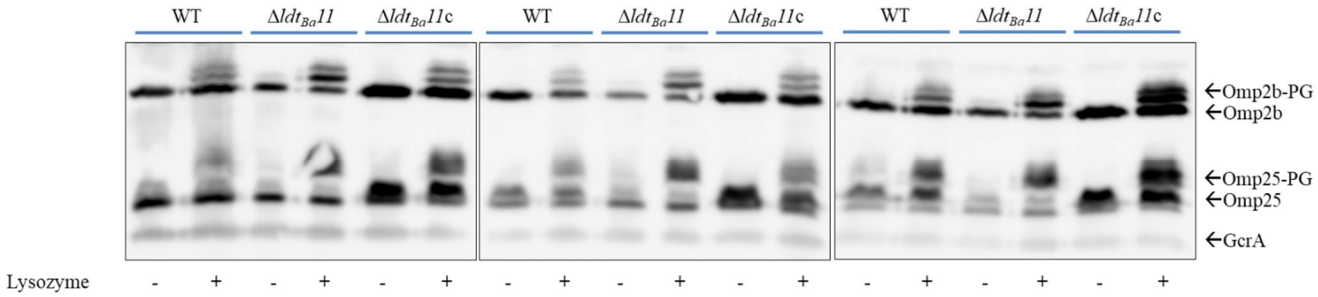


Figure S3 | Triplicats de l'impact de la LDtBa11 sur la liaison de l'Omp2b et l'Omp25. Nous avons testé l'effet de la délétion et de la complémentation du mutant LDtBa11 chez *B. abortus*. Dans la souche de délétion, une augmentation des formes liées au PG et une diminution des formes libres de l'Omp25 et l'Omp2b sont observées. La souche de complémentation présente une forte augmentation de la forme libre des deux OMPs. La protéine GcrA a été utilisée comme contrôle de charge.

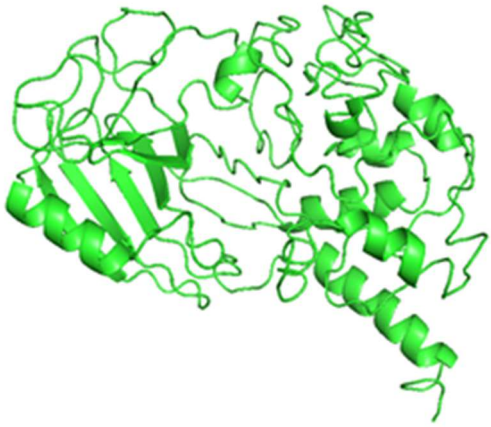


Figure S4 | Prédiction de structure tridimensionnelle de BAB1_2034. La séquence a été soumise sur le serveur I-Tasseur. La protéine Csd6 de *Helicobacter pylori* est la protéine modèle.