

Thèse : Mathieu CHAULEAU

RÉSUMÉ Les colicines sont des toxines antibactériennes d'*Escherichia coli* qui sont relâchées par les cellules productrices (colicinogènes) dans le milieu extracellulaire en réponse à des conditions de stress environnementaux. Les colicines D et E3 sont des RNases qui clivent respectivement les tRNA^{Arg} et le 16S RNA ribosomique. Les deux colicines parvenues au cytoplasme de la cellule cible provoquent ainsi la mort par inactivation de la machinerie de biosynthèse des protéines. L'import de ces deux colicines nécessite d'abord le détournement de deux systèmes cellulaires différents (FepA/TonB ou BtuB/Tol) de leur fonction physiologique, permettant leur translocation à travers la membrane externe. L'idée que par la suite la translocation à travers la membrane interne nécessite au préalable une étape de processing des colicines nucléases est ancienne, mais elle n'a jamais été démontrée formellement. Nos travaux ont permis de montrer qu'une coupure endoprotéolytique des deux colicines constitue une étape de « processing » essentielle de leur action toxique. Nous avons détecté la présence du domaine C-terminal catalytique des deux colicines dans le cytoplasme des cellules cibles préalablement exposées à la toxine. Les mêmes fragments processés (PF) ont été identifiés dans les cellules sensibles et dans les cellules immunes contre ces colicines, qui sont protégées par une protéine d'immunité spécifique, formant un complexe neutre avec le domaine catalytique. Nous avons démontré que la protéase essentielle de la membrane interne, FtsH, est nécessaire au processing des deux colicines pendant leur import. Nous avons montré aussi que la signal-peptidase LepB, une autre enzyme essentielle de la membrane interne, interagit directement avec le domaine central de la colicine D *in vitro* et ainsi elle est un facteur protéique spécifiquement nécessaire au processing de la colicine D. Cependant ce n'est pas l'activité catalytique de LepB qui est impliquée dans la toxicité de la colicine D, mais elle jouerait un rôle structural. LepB ainsi faciliterait probablement l'association de la colicine D avec la membrane interne en vue de la reconnaissance de la toxine par FtsH. Nous avons aussi montré que la protéase OmpT de la membrane externe est responsable d'une coupure endoprotéolytique alternative, qui reflète probablement son rôle bien connu dans le système de défense des bactéries contre les peptides anti-microbiens. Même si cette coupure *in vitro* permet de libérer le domaine catalytique des colicines D et E3, il est établi maintenant que la protéase OmpT n'est pas impliquée dans le processing des colicines durant leur import dans le cytoplasme. Mots clés : toxines bactériennes / nucléases anti-microbiennes / import de colicines / translocation membranaire / processing protéolytique / signal-peptidase LepB / membrane protéase FtsH / RNase colicine

ABSTRACT Colicins are antibacterial toxins of *Escherichia coli* that are released into the extracellular medium in response to environmental stress conditions. Colicin D is an RNase that cleaves the anticodon loop of all four isoaccepting tRNA^{Arg}. Colicin E3 cleaves 16 S ribosomal RNA. Both colicins provoke cell death by inactivating the protein biosynthetic machinery. Colicin producer cells are protected against both endogenous and exogenous toxin molecules by the constitutive expression of a cognate immunity protein, which forms a tight heterodimer complex with the nuclease domain of the colicin. The import of both colicins first requires the "hijack" of some distinct functions of the target cell (namely the BtuB/Tol and FepA/TonB systems, respectively), this allowing their translocation across the outer membrane. It has long been suggested that the import of nuclease colicins requires protein processing during the translocation across the inner membrane; however it had never been formally demonstrated. Our work shows that the two different RNase colicins E3 and D undergo a processing step inside the cell that is essential to their killing action. We have detected the presence of the C-terminal catalytic domains of these colicins in the cytoplasm of target bacteria. The same processed forms (PF) were identified in both colicin-sensitive cells and in cells immune to colicins, because of the expression of the cognate immunity protein. We demonstrate that the inner membrane protease FtsH is necessary for the processing of colicins D and E3 during their import. We also show that the signal peptidase LepB interacts directly with the central domain of colicin D *in vitro* and that it is a specific but not a catalytic requirement for *in vivo* processing of colicin D. The interaction of colicin D with LepB may ensure a stable association with the inner membrane that in turn allows the colicin recognition by FtsH. We have also shown that the outer membrane protease OmpT is responsible for alternative and distinct endoproteolytic cleavages of colicins D and E3 *in vitro*, presumably reflecting its known role in the bacterial defense against antimicrobial peptides. Even though the OmpT-catalyzed *in vitro* cleavage also liberates the catalytic domain from colicins D and E3, it is not involved in the processing of nuclease colicins during their import into the cytoplasm. Key words : bacterial toxins / antibacterial nucleases / colicin import / membrane translocation / proteolytic processing / signal-peptidase LepB / membrane-protease FtsH / RNase colicin