

Résumé

Haemophilus influenzae est une bactérie à Gram-négatif dont l'hôte unique est l'homme. Etant auxotrophe pour l'hème, elle présente à la membrane externe de nombreux systèmes lui permettant d'acquérir l'hème lié aux hémoprotéines humaines. Le système étudié ici est le système Hxu (Hemopexin utilization), qui permet l'acquisition de l'hème de l'hémopexine. L'hémopexine est une glycoprotéine du sérum composée de deux domaines MMP (matrix metalloproteinase) similaires; une molécule d'hème peut se fixer à l'interface entre les deux domaines avec une haute affinité ($K_d < 1 \text{ pM}$). L'hémopexine est impliquée dans le recyclage de l'hème après hémolyse, en protégeant ainsi le corps du stress oxydatif causé par l'hème libre.

Le système Hxu est composé de trois protéines de membrane externe, codées par l'opéron *hxuCBA*: le récepteur TonB-dépendant HxuC, et les protéines HxuB et HxuA qui forment un système de sécrétion à deux partenaires (Two Partner Secretion). Des études précédentes ont démontré que HxuA forme des complexes à très haute affinité avec l'hémopexine et que l'hème est relargué suite à cette interaction, devenant disponible pour le récepteur HxuC. L'internalisation à travers HxuC nécessite de l'énergie: celle-ci est fournie par le complexe TonB, localisé dans la membrane interne.

Au cours de cette thèse, afin d'étudier du point de vue structural l'acquisition de l'hème par le système Hxu, un variant soluble de la protéine HxuA, appelé HxuAdm, a été purifié et cristallisé. La structure cristallographique de HxuAdm a été obtenue à une résolution de 1.6 \AA : elle représente la première structure pleine longueur d'une protéine TpsA (Two Partner Secretion A) à avoir été résolue. En utilisant différentes techniques, notamment microscopie électronique en transmission, calorimétrie isotherme de titration (ITC) et chromatographie, il a été démontré que HxuA interagit seulement avec le domaine N-ter de l'hémopexine. Le complexe HxuA-NterHpx a ensuite été cristallisé, et sa structure résolue à 2.8 \AA .

L'étude détaillée de la structure d'HxuA en complexe comparé avec celle de HxuA libre a permis de proposer un mécanisme d'éjection de l'hème de l'hémopexine. Le mécanisme a été validé avec la construction de mutants de HxuA, dont l'un a été cristallisé en complexe avec l'hème-hémopexine.

Cette étude a mis en évidence le rôle fondamental d'une boucle au C-terminal de HxuA: le changement de conformation de cette boucle est nécessaire pour l'éjection de l'hème et un résidu (Asp726) de cette boucle joue un rôle essentiel dans le mécanisme.