



HAL
open science

**Interactome des antigènes protecteurs V de
Pseudomonas aeruginosa et de Yersinia pestis :
Mécanisme d'assemblage et interaction avec l'aiguille de
sécrétion de type III**

Caroline Gebus, Ina Attree

► **To cite this version:**

Caroline Gebus, Ina Attree. Interactome des antigènes protecteurs V de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Yersinia pestis* : Mécanisme d'assemblage et interaction avec l'aiguille de sécrétion de type III. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT : . tel-00335165

HAL Id: tel-00335165

<https://theses.hal.science/tel-00335165>

Submitted on 28 Oct 2008

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

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

UNIVERSITE JOSEPH FOURRIER-GRENOBLE I

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURRIER

Discipline : **Microbiologie, Biochimie**

**présentée et soutenue publiquement
par**

Caroline GEBUS

le 17 octobre 2008

**INTERACTOME DES ANTIGENES PROTECTEURS V DE
PSEUDOMONAS AERUGINOSA ET DE YERSINIA PESTIS :
MECANISME D'ASSEMBLAGE ET INTERACTION AVEC
L'AIGUILLE DE SECRETION DE TYPE III**

JURY

**Anne IMBERTY
Ariel BLOCKER
Sophie de BENTZMANN
Claire DANE
Ina ATTREE**

**Présidente du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Tutrice de thèse**

Thèse préparée dans le laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes
Intégrés, Commissariat à l'Energie Atomique,
17 Avenue des Martyrs, 38054 GRENOBLE Cedex 9, France
UMR 5092 ; CEA/CNRS/UJF

	FLAGELLE	FAMILLE Ysc <i>P. aeruginosa</i> <i>Y. pestis</i>		FAMILLE SsA-Esc <i>E.coli</i>	FAMILLE Inv-Mxi-Spa <i>S. typhimurium</i> <i>S. flexneri</i>	
BASE ATPase Complexe (CY) Anneau (MI) Anneau (MI) Anneau (MI) Anneau (MI) Lipoprotéine (PE) Anneau (ME)	FliI FliN/FliM FliP FliQ FliR FlhB FlhA FliF ∅	PscN PscQ PscR PscS PscT PscU PscV PscJ PscC	YscN YscQ YscR YscS YscT YscU YscV YscJ YscC	EscN EscQ EscR EscS EscT EscU EscV EscJ EscC	InvC/SpaL InvK/SpaO InvL/SpaP SpaQ InvN/SpaR SpaS InvA PrgK InvG	Spa47 Spa33 Spa24 Spa9 Spa29 Spa40 MxiA MxiJ MxiD
AIGUILLE	FlgE ?	PscF (PscE, PscG)	YscF (YscE, YscG)	EscF	PrgI (PrgJ)	MxiH (MxiI)
REGLE MOLECULAIRE	FliK	PscP	YscP		InvJ	Spa32
TRANSLOCON		PopB/ PopD (PcrH) PcrV (PcrG)	YopB/ YopD (LcrH) LcrV (LcrG)	EspB/ EspD EspA (CesA)	SipB/ SipC SipD	IpaB/ IpaC (IpgC) IpaD
EFFECTEURS		ExoS, ExoT, ExoU, ExoY	YopE (SycE) YopH, YopJ, YopM, YopO, YopT	Tir (CesT) EspF	SptP (SicP), SopE, SipA, SipC, SopB, SigD, AvrA, SipB, SspH1, SspH2, SlrP, SipC, SseF, SseG	IpaC, IpaB, IpaH9.8, IpaH7, IpaH 65.4kDa

Tableau 1 : Protéines orthologues des systèmes de sécrétion de type III des familles Ysc (*P. aeruginosa* et *Y. pestis*), SsA-Esc (*E. coli*), Inv-Mxi-Spa (STI-1 de *S. typhimurium* et *S. flexneri*). CY : Complexe cytoplasmique, MI : Membrane Interne, ME : Membrane Externe, PE : Périplasme.

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement Anne Imberty, Sophie de Bentzmann, Ariel Blocker, Claire Dane et toi Ina de m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie de mon jury de thèse et d'avoir pris le temps de lire ce travail.

Merci beaucoup à Michel Satre et François Boulay de m'avoir accueillie et acceptée dans leur laboratoire pour la poursuite de mes études.

Je remercie également la DGA, qui a financé ces trois années de thèse et qui m'a permis de réaliser ce travail.

Il existe peu de termes pour exprimer sa gratitude mais qui peuvent être agrémentés de quelques adverbes et je ne tiens pas à en faire une déclinaison ici. Je préfère énoncer les personnes et tout ce que chacun de vous a fait pour m'aider tant au niveau personnel que professionnel durant mes trois années de thèse. Alors je vous dit à tous un grand MERCI qui vient du fond du cœur :

Ina, pour tout ce que tu m'as appris, pour ta confiance, dont j'ai eu beaucoup besoin, pour certains des mutants que tu as fait, pour les discussions, les conseils et les encouragements, pour les soirées à relire ce manuscrit, et pour toutes les choses que j'oublie de citer ici mais que je n'oublierai pas pour autant.

Eric, pour m'avoir fait découvrir le monde de la biochimie et de la biophysique. Ta patience, ton caractère bricoleur, et ta disponibilité font de toi un élément incontournable du laboratoire. Tu nous manques et nous espérons te revoir très vite.

Sylvie, pour ton côté très humain et les mots de réconfort que tu trouves toujours. Pour la plus redoutable trouveuse de fautes en tout genre, qualité incontournable pour corriger tous les écrits du labo. En tout cas, j'espère que j'ai passé le test de la règle de trois avec succès !

Julie, Sophie, pour votre bonne humeur, votre présence, les discussions, les chansons, les découvertes sportives et tout le reste... Les séances remontage de moral et radio CEA vont me manquer.

Julie, bonne chance pour l'année à venir. Je ne me fais pas de soucis pour toi : garde confiance en toi, quoi qu'il arrive et si tu as besoin que je te le rappelle, tu sais où me trouver !

Sophie toi aussi reste confiante et arrête de lancer 100 manipes à la fois. Et en cas de situation stressante qui demande un débat avec une personne extérieure, je serai là.

Tammy, pour ta gentillesse, les corrections des textes en anglais et toutes les expériences d'hémolyse et de purification des membranes d'érythrocytes. Je te souhaite plein de bonheur avec ton mari.

Jessica : mutations réalisées en temps record. Je te souhaite de pouvoir continuer dans la voie que tu désires mais attention, la Suisse est obligée de se retirer du conflit hiérarchico-politique de la salle C3 454c.

Viviane et Marie-Pierre pour votre gentillesse, votre patiente et vos lumières pour nous guider dans le dédale administratif du CEA.

Vincent, pour m'avoir ouvert les portes de ton laboratoire, l'accès au CD, et tes consultations et conseils avisés.

Karine, pour tes conseils et les cours d'utilisation du MET, la coloration, le développement des photos argentiques...

David, pour avoir mené à bien les expériences de spectrométrie de masse native.

Marguerite Rinaudo, pour avoir accepté d'essayer les expériences de SEC-MALLS sur mes échantillons, pour avoir été positive et encourageante ce qui m'a permis de garder ma volonté à continuer dans cette direction.

Gérard, pour m'avoir expliqué le fonctionnement du "dino", pour tes conseils et les discussions que nous avons eues pour faire fonctionner l'HPLC.

Andréa, pour tous tes sages conseils, tes encouragements et la relecture du manuscrit.

Sophie, Romé, ChristopheX2, Isabelle, pour m'avoir pris sous votre aile à Seattle.

Rabia, Romain, pour m'avoir appris la technique du WB. Vous avez pensé aux membranes de nitrocellulose ? C'est moins chiant et vous n'avez pas besoin de l'équilibrer à l'éthanol avant... Si vous voyez ce que je veux dire !

Pascal, pour m'avoir consacré de temps au MET. Désolée de t'avoir lâché pour celui du CEA.

A mes parents, pour votre soutien, vos encouragements et tout ce que vous avez fait pour moi pendant ces longues années d'études.

Anne-Laure, pour tes encouragements et ta présence. Tic a toujours eu besoin de Tac et ça ne risque pas de changer !

Nicolas, pour ta patience, ton écoute, la confiance que tu places en moi, tes encouragements et tout ce que tu as fait pour moi au quotidien. J'espère que cette période n'a pas été trop dure pour toi.

A mes amis, pour avoir été là de près ou de loin, toujours disponibles pour des sessions changement d'idées et remontage de moral. J'adresse une pensée particulière à Maryline et à Séverine mes compagnes de galère.

Liste des principales abréviations

CD : Circular **D**ichroïsm (Dichroïsme circulaire)

DO₆₀₀ : **D**ensité **O**ptique à 600 nm

ELISA : **E**nzyme **L**inked **I**mmunosorbent **A**ssay

EPEC : **E***scherichia coli* entéro**p**athogène

EHEC : **E***scherichia coli* entéro**h**émorragique

IPTG : **I**sopropyl β -**D**-1-**t**hiogalactopyranoside

Lcr : **L**ow **c**alcium **r**esponse

LPS : **L**ipo**P**oly**S**accharide

MET : **M**icroscopie **E**lectronique à **T**ransmission

MOI : **M**ultiplicity **O**f **I**nfection

Psc : **P**seudomonas **s**ecreted **c**omponent

pYV : **p**lasmid **Y**ersinia **V**irulence

SEC-MALLS : **S**ize **E**xclusion **C**hromatography - **M**ulti **A**ngle **L**aser **L**ight **S**cattering
(Chromatographie d'exclusion de taille couplée à la diffusion angulaire de la lumière)

SST : **S**ystème de **S**écrétion de **T**ype

Yop : **Y**ersinia **O**uter **P**rotein

Sommaire

CHAPITRE 1 3

LES PATHOGÈNES P. AERUGINOSA ET Y. PESTIS

1. PSEUDOMONAS AERUGINOSA	3
1.1 Description	3
1.1.1 Niche écologique.....	3
1.1.2 Mode de vie	4
1.1.3 Infections dues à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
1.2 Les facteurs de virulence.....	8
1.2.1 Facteurs de virulence de surface	9
1.2.2 Facteurs de virulence sécrétés.....	10
1.2.3 Facteurs de virulence transloqués	11
1.3 Traitements et résistance aux antibiotiques.....	13
1.3.1 Traitements des infections à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
1.3.2 Résistance aux antibiotiques.....	14
1.4 Développement d'immunothérapies.....	14
2. YERSINIA PESTIS.....	16
2.1 Description	16
2.1.1 Mode de vie et cycle de transmission	16
2.1.2 Infections à <i>Yersinia pestis</i>	17
2.2 Les facteurs de virulence.....	18
2.2.1 Les facteurs de virulence codés par le plasmide pPst	19
2.2.2 Les facteurs de virulence codés par le plasmide pTox	20
2.2.3 Les effecteurs du système de sécrétion de type III	20
2.3 Traitement et résistance aux antibiotiques	22
2.3.1 Diagnostic	22
2.3.2 Traitements et résistances aux antibiotiques	22
2.3.3 Développement de vaccins	23
3. AUTRES PATHOGÈNES DE L'HOMME	24
4. CONCLUSION	25

CHAPITRE 2 27

LES SYSTÈMES DE SÉCRÉTION DES BACTÉRIES À GRAM NÉGATIF

1. LES SYSTÈMES SEC DÉPENDANTS	28
1.1 Le système général de sécrétion.....	28
1.2 Le système de sécrétion de type II (SST2).....	29
1.3 Le système de sécrétion de type V (SST5)	31
1.4 Les voies chaperone/usheer.....	33
2. LES SYSTÈMES SEC INDÉPENDANTS.....	35
2.1 Le système de sécrétion de type I (SST1)	35
2.2 Le système de sécrétion de type IV (SST4).....	37
3. LE SYSTÈME DE SÉCRÉTION DE TYPE VI (SST6).....	37
4. CONCLUSION SUR LES SYSTÈMES DE SÉCRÉTION	39

CHAPITRE 3 41

LE SYSTÈME DE SÉCRÉTION DE TYPE III (SST3)

1. ORIGINE ET ÉVOLUTIONS DU SST3.....	41
1.1 <i>Le flagelle et le SST3</i>	41
1.2 <i>Conservation et variabilité du SST3</i>	44
2. DESCRIPTION DE L'INJECTISOME.....	46
2.1 <i>La base du SST3</i>	47
2.1.1 Description de la structure.....	47
2.1.2 Assemblage du sécréton.....	49
2.1.3 L'ATPase.....	50
2.2 <i>L'aiguille de sécrétion</i>	53
2.2.1 Description générale de l'aiguille de sécrétion.....	53
2.2.2 Assemblage de l'aiguille chez <i>S. flexneri</i>	54
Structure du monomère de MxiH.....	54
Modèle d'assemblage du monomère en hélice de type III.....	55
2.2.3 Régulation de la taille de l'aiguille.....	56
Théorie de la règle moléculaire.....	57
Théorie de la polymérisation simultanée de la tige interne et de l'aiguille.....	58
3. LES CHAPERONES.....	59
3.1 <i>Les chaperones de classe I</i>	60
3.2 <i>Les chaperones de classe II</i>	61
3.3 <i>Les chaperones de classe III</i>	61
4. RÉGULATION DU SST3.....	62
4.1 <i>Régulation globale des facteurs de virulence</i>	63
4.2 <i>Régulation spécifique : couplage sécrétion/synthèse</i>	62
4.3 <i>Rôle de l'aiguille dans la régulation de la sécrétion</i>	64

CHAPITRE 4 67

LE TRANSLOCON DU SST3, LES ANTIGÈNES V DE *P. AERUGINOSA* ET DE *Y. PESTIS*

1. L'OPÉRON DE TRANSLOCATION.....	67
2. RÔLE DES TRANSLOCATEURS HYDROPHOBES.....	69
2.1 <i>Formation de pores dans les cellules hôtes</i>	69
Mise en évidence des pores par osmoprotection.....	69
Mise en évidence des pores par fuite de fluorochromes.....	70
Formation de pores sur des modèles membranaires (liposomes).....	70
2.2 <i>Caractéristiques du pore de translocation</i>	72
3. LE TRANSLOCATEUR HYDROPHILE.....	73
3.1 <i>Structure des translocateurs hydrophiles</i>	73
Domaines structuraux : classement en différentes familles.....	73
Structures cristallographiques.....	74
3.2 <i>Localisation du translocateur hydrophile</i>	78
Formation d'un complexe au sommet de l'aiguille de sécrétion.....	78
Composition du complexe distal.....	80
Orientation du complexe et modélisation.....	81
3.3 <i>Fonctions du translocateur hydrophile</i>	85
Plateforme d'insertion d'un pore dans les membranes des cellules hôtes.....	85
Senseur du contact cellulaire.....	87
Régulation de la sécrétion des effecteurs.....	87

Rôle dans l'immunité.....	89
3.4 <i>LcrV/PcrV, candidats vaccinaux</i>	89
CHAPITRE 5	91
CADRE ET OBJECTIFS DU PROJET DE THÈSE	
CHAPITRE 6	93
TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE	
1. SOUCHES ET PLASMIDES.....	95
2. STRATÉGIES DE CLONAGE.....	100
2.1 <i>Vecteurs de complémentation de P. aeruginosa CHAΔV</i>	100
2.2 <i>Vecteurs d'expression des mutants de PscF dans P. aeruginosa</i>	100
2.3 <i>Vecteurs d'expression dans E. coli</i>	101
Pour la co-expression de PscF et de PcrV.....	101
Pour l'expression de la protéine hybride FV _{Cter}	101
2.4 <i>Mutagenèse dirigée sur les vecteurs d'expression dans E. coli</i>	102
Pour la co-expression de PscF mutants et de PcrV.....	102
CHAPITRE 7	103
MICROBIOLOGIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE	
1. CONDITIONS DE CULTURE.....	103
2. TESTS DE LA FONCTIONNALITÉ DU SST3.....	103
3. TEST DE L'INTÉGRITÉ DU SST3.....	104
3.1 <i>Capacité de synthèse et de sécrétion</i>	104
3.2 <i>Purification des aiguilles</i>	105
3.3 <i>Observation des aiguilles par MET</i>	105
Directement sur la surface de la bactérie.....	105
Sur des échantillons d'aiguilles purifiées.....	106
CHAPITRE 8	107
TECHNIQUES DE BIOCHIMIE	
1. PURIFICATION DES PROTÉINES.....	107
1.1 <i>Co-purification de PscF_{His6} et de PcrV</i>	107
1.2 <i>Purification de l'hybride FV_{Cter His6}</i>	108
2. CARACTÉRISATION DES PROTÉINES PURIFIÉES.....	109
2.1 <i>Analyses biophysiques</i>	109
2.2 <i>Spectrométrie de masse</i>	110
Spectrométrie de masse native.....	110
Spectrométrie de masse MS/MS.....	110
2.3 <i>SEC-MALLS</i>	111
2.4 <i>Analyse de la polymérisation par MET</i>	111

CHAPITRE 9 113

MÉCANISME D'ASSEMBLAGE DES ANTIGÈNES V

1. OLIGOMÉRISATION DE PCR V ET DE LCR V.....	113
1.1 Déplie ment/replie ment de Pcr V.....	114
Déplie ment/replie ment par le chlorure de guanidium.....	115
Déplie ment/replie ment par le pH.....	117
1.2 Formation de multimères de Pcr V/Lcr V.....	119
1.3 Structure des oligomères de Pcr V/Lcr V.....	121
1.4 Rôle de l'hélice $\alpha 12$ C terminale dans la multimérisation.....	126
Etude du rôle de l'hélice $\alpha 12$ par une protéine tronquée Pcr V $_{\Delta Cter}$	126
Acides aminés critiques pour la fonction de l'hélice $\alpha 12$	129
1.5 Cas particulier de Pr V $_{L262D/V273D}$	132
2. ASSEMBLAGE DE PCR V SUR LES AIGUILLES DE P. AERUGINOSA.....	138
2.1 Localisation de Pcr V avant infection.....	138
2.2 Domaines importants pour la fonction de Pcr V.....	140

CHAPITRE 10..... 147

INTERACTION DE PCR V AVEC L'AIGUILLE DE SÉCRÉTION

1. INTERACTION DE PSC F ET DE PCR V : ÉTUDE IN VITRO.....	147
1.1 Mise en évidence de l'interaction entre Psc F et Pcr V.....	148
1.1.1 Principe de la co-purification.....	148
1.1.2 Pcr V interagit directement avec Psc F.....	150
1.2 Interaction entre Pcr V et Psc F* monomérique.....	152
1.3 Rôle de l'hélice $\alpha 12$ de Pcr V dans l'interaction.....	155
1.3.1 Co-purification de Psc F et de Pcr V $_{\Delta Cter}$	156
1.3.2 Etude de la polymérisation d'un hybride FV $_{Cter}$	158
2. INTERACTION PSC F ET PCR V : ÉTUDE IN VIVO.....	161
2.1 Interaction de Pcr V au sommet des aiguilles.....	161
2.2 Etude de mutants de Psc F.....	161
2.2.1 Choix des mutants de Psc F.....	161
2.2.2 Détermination du phénotype des mutants.....	163
2.2.3 Insertion du pore de translocation par les mutants de Psc F.....	165
2.2.4 Choix des mutations à étudier plus amplement.....	166
2.2.4 Interaction de Psc F $_{D76A}$ et Psc F $_{P47A/Q54A}$ et de Pcr V.....	169

CHAPITRE 11..... 175

ASSEMBLAGE DES ANTIGÈNES V SUR LES AIGUILLES

1. PARTENAIRE PCR V/LCR V.....	175
2. INTERACTION AVEC LA SOUS UNITÉ FORMANT L'AIGUILLE.....	177
3. INTERACTION AVEC LE PORE DE TRANSLOCATION.....	180
4. THÉRAPIES CONTRE P. AERUGINOSA ET Y. PESTIS.....	181

CHAPITRE 12..... 183

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Liste des figures

Figure 1.1... Le bacille pyocyanique <i>P. aeruginosa</i>	3
Figure 1.2... <i>Pseudomonas aeruginosa</i> organisé en biofilm	4
Figure 1.3... Formation de biofilms de <i>P. aeruginosa</i>	5
Figure 1.4... Principaux facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i>	8
Figure 1.5... Le coccobacille <i>Yersinia pestis</i>	16
Figure 1.6... Cycle de transmission de <i>Y. pestis</i>	17
Figure 2.1... Systèmes de sécrétion des bactéries à gram négatif	26
Figure 2.2... Systèmes de sécrétion de <i>P. aeruginosa</i> et <i>Y. pestis</i>	28
Figure 2.3... Schéma représentant le SST2 de <i>P. aeruginosa</i>	30
Figure 2.4... Schéma représentant le SST5 de <i>P. aeruginosa</i>	32
Figure 2.5... Schéma représentant la voie chaperone/usher.....	34
Figure 2.6... Schéma représentant le SST1 de <i>P. aeruginosa</i>	36
Figure 2.7... Modèle hypothétique du SST6 de <i>P. aeruginosa</i>	39
Figure 3.1... Représentation schématique du SST3.....	40
Figure 3.2... Représentation schématique du flagelle bactérien et du SST3...42	
Figure 3.3... Structure des SST3 des 4 principales familles	46
Figure 3.4... Photos de microscopie électronique injectisomes	47
Figure 3.5... Bases du SST3 de <i>S. thyphimurium</i> et de <i>S. flexneri</i>	48
Figure 3.6... Modélisation de l'ATPase HcrN.....	50
Figure 3.7... Schéma présentant le processus sécrétoire et son énergétique.52	
Figure 3.8... Structure tridimensionnelle du monomère de MxiH	55
Figure 3.9... Modélisation de l'assemblage de l'aiguille de <i>S. flexneri</i>	56
Figure 3.10... Modèle de la règle moléculaire YscP	58
Figure 3.11... Contrôle de la taille des aiguilles chez <i>S. thyphimurium</i>	59
Figure 3.12... Modèle du couplage transcription du SST3/sécrétion	63
Figure 3.13... Modèle de la régulation de la sécrétion par l'aiguille.....	65
Figure 4.1... Opérons de translocation de plusieurs injectisomes	66
Figure 4.2... Formation du translocon par PopB et PopD chez <i>P. aeruginosa</i> ...71	
Figure 4.3... Structure tridimensionnelle d'IpaD et de BipD.....	75
Figure 4.4... Structure tridimensionnelle de LcrV	77
Figure 4.5... LcrV au sommet des aiguilles de <i>Y. enterocolitica</i>	79

Figure 4.6... IpaD est situé au sommet des aiguilles de <i>S. flexneri</i>	80
Figure 4.7... Structure des complexes d'orthologues de LcrV.....	82
Figure 4.8... Modélisations du complexe de LcrV	83
Figure 4.9... Modélisation du complexe IpaD	84
Figure 4.10... Epitopes protecteurs de LcrV et de PcrV	91
Figure 9.1... La guanidine induit un dépliement de PcrV	116
Figure 9.2... PcrV forme des oligomères après dépliement/repliement.....	120
Figure 9.3... LcrV forme des oligomères après dépliement/repliement	122
Figure 9.4... Les protéines PcrV _{ΔCter} et PcrV _{L276D} sont bien repliées.....	129
Figure 9.5... Le mutant PcrV _{L262D/V273D} n'est pas virulent <i>in vivo</i>	133
Figure 9.6... Le mutant PcrV _{L262D/V273D} oligomérisse spontanément	134
Figure 9.7... Le mutant PcrV _{L262D/V273D} oligomérisse et forme des anneaux	135
Figure 9.8... Complexe de PcrV au sommet de aiguilles de <i>P. aeruginosa</i>	139
Figure 9.9... Schéma de LcrV, PcrV et AcrV et des hybrides	141
Figure 9.10... Expression de PcrV, LcrV, AcrV par CHAΔV.....	144
Figure 10.1... Vecteur permettant de co-expression de PscF _{His6} et PcrV	148
Figure 10.2... Etapes de co-purification des protéines PscF _{His6} et PcrV.....	149
Figure 10.3... Les protéines PscF _{His6} et PcrV co-purifient	151
Figure 10.4... Localisation des acides aminés V70, L74 et M78 sur PscF.....	152
Figure 10.5... Les protéines PscF* _{His6} et PcrV co-purifient.....	154
Figure 10.6... PscF _{His6} et PcrV _{ΔCter} co-purifient seulement sur 2 colonnes.....	157
Figure 10.7... Schéma représentant la protéine hybride FV _{Cter His6}	158
Figure 10.8... La protéine hybride FV _{Cter His6} est capable de polymériser	160
Figure 10.9... Mutations de PscF étudiées localisées sur la séquence	162
Figure 10.10... Phénotype des mutants de PscF	163
Figure 10.11... Insertion du pore de translocation par les mutants de PscF.....	165
Figure 10.12... PscF _{D76AHis6} et PcrV co-purifient seulement sur 2 colonnes.....	171
Figure 10.13... PscF _{P47A/Q54AHis6} et PcrV co-purifient.....	172
Figure 11.1... Assemblage de V par échange de domaines intermoléculaires.....	177
Figure 11.2... Schéma de l'assemblage de PcrV sur l'aiguille de sécrétion	179

Liste des tableaux

Tableau 1...Protéines orthologues des systèmes de sécrétion de type III....	43
Tableau 2...Souches et plasmides utilisés pour cette étude	96-97
Tableau 3...Oligonucléotides utilisés pour cette étude	98-99
Tableau 4...Analyse par spectrométrie de masse de PcrV _{L262D/V273D}	137
Tableau 5...Résultats d'hémolyse de <i>Y. enterocolitica</i> exprimant LcrV, ces homologues ou les hybrides des homologues.....	142
Tableau 6...Récapitulatif du phénotype des mutants de PscF étudiés	164
Tableau 7...Co-purification de PscF _{D76A} et PscF _{P47A/Q54A} et de PcrV.....	170

Avant propos

Un problème auquel nous sommes de plus en plus confronté aujourd'hui est l'utilisation massive d'antibiotiques qui a conduit à l'émergence de souches bactériennes multi-résistantes. En France, pays grand consommateur d'antibiotiques, un tiers des infections à *Staphylococcus* n'est plus traitable par antibiothérapie. Un autre exemple est celui des différentes espèces de *Pneumocoques* résistantes à la pénicilline qui a augmenté de 100 fois en l'espace de quinze ans. Devant ce phénomène de transmission de résistance aux antibiotiques, les recherches se tournent actuellement vers de nouveaux moyens de combattre les infections bactériennes. Il est donc impératif de définir de nouvelles cibles thérapeutiques et d'en avoir une connaissance approfondie.

Les bactéries à gram négatif n'échappent pas à ce phénomène et certaines espèces posent de sérieux problèmes sanitaires dans les hôpitaux et autres lieux collectifs. Les espèces les plus virulentes à ce jour comptent les *Yersiniads*, famille de l'espèce *Yersinia pestis* qui a décimé 1/3 de la population européenne au XIV^{ème} siècle, les *Pseudomonads*, dont *Pseudomonas aeruginosa* qui est responsable de 10% des infections nosocomiales enregistrées actuellement en France, les *Shigelloïdes*, les *Salmonelles* ainsi, que, les formes virulentes des *Coliformes* (*Escherichia coli* entéropathogène et entérohémorragique). Ces bactéries sont dotées de nombreux facteurs de virulence parmi lesquels le système de sécrétion de type III, élément clé de l'infection aiguë chez l'Homme. Il joue un rôle majeur dans l'infection par sa capacité à injecter directement des toxines du cytoplasme bactérien dans la cellule hôte par le biais d'une véritable nano-machine. Ce système est assez conservé et il est possible de faire des parallèles de son fonctionnement entre les différentes espèces bactériennes citées. Les études scientifiques sur la structure et le fonctionnement du système de sécrétion-translocation de type III mettent en évidence qu'il est une cible thérapeutique potentielle de choix. Certains vaccins sont actuellement en cours de test clinique en phase II et ciblent un élément clé de ce facteur de virulence, l'antigène V de *Y. pestis* et de *P. aeruginosa*, dont il sera question dans ce travail de thèse.

Première partie

Etat de l'art

Chapitre 1

Les pathogènes *P. aeruginosa* et *Y. pestis*

1. *Pseudomonas aeruginosa*

1.1 Description

P. aeruginosa ou bacille pyocyanique est une bactérie à gram négatif isolée par Carle Gessard en 1882 se présentant sous la forme de bâtonnets d'environ 1 μm de long (Figure 1.1). Son nom provient de la production d'un pigment, la pyocyanine, de couleur bleue en solution aqueuse à pH neutre ou basique (Lyczak *et al.*, 2000).

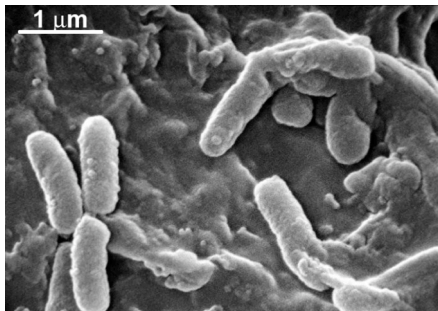


Figure 1.1

Le bacille pyocyanique *P. aeruginosa*
(Photo de microscopie électronique à balayage,
Source : Public Health Image Library, #232).

1.1.1 Niche écologique

P. aeruginosa est un pathogène ubiquitaire qui est capable de survivre dans toutes sortes de niches écologiques et il est largement répandu dans notre environnement. Il colonise l'eau, les sols humides, les végétaux sous sa forme saprophyte ou encore le tube digestif de l'homme sous sa forme commensale. Son métabolisme est respiratoire, il utilise l' O_2 comme accepteur final d'électrons. Son hôte naturel est l'homme mais il est aussi capable d'infecter une multitude d'autres organismes tels que les nématodes, les insectes et les plantes (Filloux and Vallet, 2003).

Le génome complet de la souche *P. aeruginosa* PAO1 est disponible depuis l'année 2000 (Stover *et al.*, 2000). Il a apporté de nombreuses informations concernant l'évolution de cette bactérie pour s'adapter à ses nombreuses niches écologiques. En effet, sa taille est de 6,3 Mpb (contre 4,6 Mpb pour *E. coli*), avec un % C+G important de 66% et 5570 cadres de lecture prédits. Notamment, avec 8,4 % du total des gènes, c'est la bactérie qui présente le plus fort taux de gènes dédiés aux systèmes de régulation (senseurs

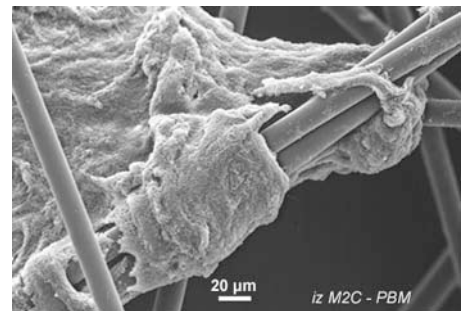
environnementaux et facteurs de transcription). Ce système complexe de régulation pourrait expliquer comment cet organisme peut répondre à des variations importantes de son environnement de vie ainsi qu'à la régulation d'un arsenal important de facteurs de virulence. De plus, cette bactérie a développé un nombre très important de systèmes de transports membranaires (apport de nutriments), des pompes à efflux (résistance aux antibiotiques) et plusieurs systèmes de chimiotactisme (vie communautaire) (Stover *et al.*, 2000).

1.1.2 Mode de vie

Cette bactérie présente deux modes de vie distincts : un planctonique (Figure 1.1) où elle est mobile grâce à un flagelle et d'autres appendices comme les pili de type IV. Elle peut également, selon les conditions, se regrouper sous forme de biofilm où elle perd sa mobilité et adopte un mode de vie communautaire (Figure 1.2).

Figure 1.2

***Pseudomonas aeruginosa* organisé en biofilm**
(photo de microscopie électronique à balayage,
Sébastien Vilain, Source : <http://www.univ-rouen.fr/M2C/bacteries/pseudomonas.html>).



Les biofilms sont des organisations particulières se formant sur des surfaces inertes ou vivantes où ils sont très difficiles à éradiquer. Ils sont présents dans 65% des cas d'infection à *P. aeruginosa* chez l'homme et sous cette forme infectent de nombreux tissus comme les yeux, les oreilles, le tractus urogénital ainsi que les poumons (Filloux and Vallet, 2003 ; Chicurel, 2000).

Un biofilm est constitué d'une population bactérienne (mixte ou unique) entourée d'une matrice d'exopolysaccharides, ou glycocalyx qui représente 85% de son volume total. Elle permet de renforcer sa structure et de la protéger (Filloux and Vallet, 2003 ; Chicurel, 2000 ; Kolter and Losick, 1998).

La formation d'un biofilm se fait en plusieurs étapes schématisées en Figure 1.3.

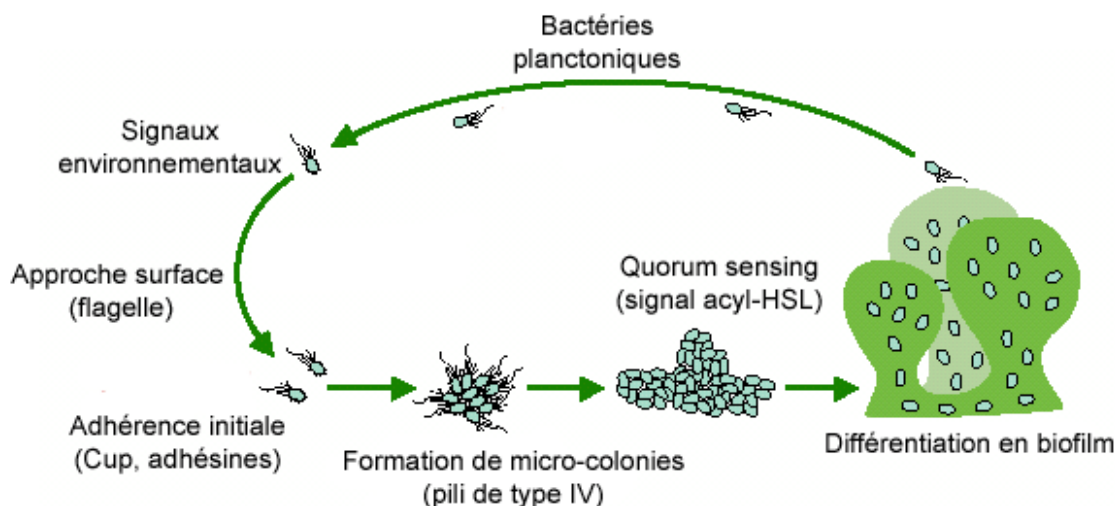


Figure 1.3 : Formation de biofilms de *P. aeruginosa*.
D'après (Filloux and Vallet, 2003).

L'étape initiale consiste à l'attachement de bactéries planctoniques sur une surface. Cette étape fait intervenir le flagelle qui permet aux bactéries de se mouvoir jusqu'au point d'attache. L'adhérence stable sur la surface est réalisée par l'intermédiaire d'autres facteurs de virulence que sont les pili de type fimbriae et le pili de type IV. Le rassemblement de bactéries conduit à la formation de micro-colonies au sein desquelles les cellules vont se différencier. Elles adoptent une structure particulière où les micro-colonies sont assemblées et se forment autour de canaux fluidiques. Ceux-ci permettent d'une part d'acheminer l'oxygène et les nutriments au sein du biofilm et, d'autre part, de libérer les déchets toxiques dus au métabolisme bactérien.

Une organisation en biofilm confère aux bactéries une résistance accrue aux antibiotiques (jusqu'à 1000 fois supérieure) et une protection contre les défenses immunitaires de l'hôte. Ces phénomènes n'ont pu être explicitement compris mais il est possible que cette résistance provienne du fait que la croissance et le métabolisme bactériens au sein du biofilm sont lents, rendant inefficaces les antibiotiques. De plus la présence de la matrice d'exopolysaccharides ralentit la pénétration des antibiotiques (Kolter and Losick, 1998 ; Chicurel, 2000 ; Filloux and Vallet, 2003).

Les biofilms peuvent être composés d'un ensemble de plusieurs espèces bactériennes différentes. Dans ce type de système, il est suggéré que la mixité des populations est en partie dépendante des nutriments disponibles et se met en place si une "chaîne alimentaire" peut être créée. Ces communautés favorisent le phénomène de transfert

horizontal de gènes. Les communications entre les micro-colonies d'espèces différentes se font *via* un système commun peu caractérisé, l'esperanto bactérien (Winans, 2002).

L'augmentation de la densité bactérienne lors de la formation des micro-colonies et la maturation en une organisation telle que les biofilms suggère une communication importante entre les cellules et des actions coordonnées. C'est le quorum sensing (QS) qui est le principal mode de régulation de la pathogénicité et de l'adaptation écologique de *P. aeruginosa* (Parsek and Greenberg, 2000). C'est un système de régulation global contrôlant directement ou indirectement l'expression d'au moins 400 gènes (Kirisits and Parsek, 2006). La communication bactérienne repose principalement sur des phéromones diffusibles, des N-acétyl-homosérines lactones qui sont produites par chaque cellule et dont la concentration augmente donc en parallèle à la densité cellulaire. Lorsqu'une certaine concentration est atteinte, ces molécules se fixent spécifiquement à des régulateurs transcriptionnels qui vont alors activer la transcription des gènes régulés par ce système (Parsek and Greenberg, 2000 ; Le Berre *et al.*, 2006). L'expression des facteurs de virulence, de facteurs sécrétés jouant un rôle dans la croissance cellulaire, de certains appendices de surface ayant un rôle dans la motilité, mais aussi des régulateurs globaux tels que les éléments du système à deux composants, sont ainsi régulés. Plusieurs systèmes de QS ont été mis en évidence chez *P. aeruginosa* (Parsek and Greenberg, 2000) ; (Le Berre *et al.*, 2006). Leur rôle est essentiel à la formation des biofilms et ce à tous les stades de son développement. En effet, selon la densité cellulaire, le QS permet de contrôler la sécrétion de plusieurs facteurs nécessaires à l'attachement des bactéries puis à la formation des canaux fluidiques, à l'augmentation des capacités à capter les nutriments dans l'environnement et aussi à la sécrétion d'ADN dont le transfert entre les bactéries est augmenté au sein des biofilms (Kirisits and Parsek, 2006).

L'action du QS sur les systèmes à deux composants est aussi importante. En effet, la régulation engendrée par ces derniers joue aussi un rôle dans la capacité à former des biofilms. Elle est nécessaire pour que l'architecture de ces structures soit correcte et pour l'augmentation de la résistance aux antibiotiques (Parkins *et al.*, 2001). Les facteurs régulés par les systèmes à deux composants ayant un rôle dans la formation de biofilms ne sont pas connus mais leur action ne touche pas le QS ni la motilité des bactéries ni la production d'alginate (Parkins *et al.*, 2001).

1.1.3 Infections dues à *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est un pathogène qualifié d'opportuniste car malgré le fait qu'il soit présent dans notre environnement quotidien, il n'est capable d'infecter que les personnes dont le système immunitaire est affaibli (patients atteints du SIDA, de diabète, de cancers, de la mucoviscidose, grands brûlés, patients hospitalisés en réanimation).

Deux types d'infection se distinguent : les infections aiguës et chroniques (Lyczak *et al.*, 2000).

Les infections aiguës conduisent à des cas de septicémie sévère notamment chez les grands brûlés, très susceptibles à l'infection par cette bactérie. D'autres traumatismes tels que des interventions chirurgicales, les intubations endotrachéales et les cathéters urinaires à l'origine de la formation de plaies dans les muqueuses entraînent une sensibilité à cette bactérie. Les appareils hospitaliers sont des sources de contamination et conduisent à des infections aiguës des poumons, du système digestif, ainsi que des voies urinaires (Lyczak *et al.*, 2000 ; Berthelot *et al.*, 2005).

Un autre type d'infection aiguë comprend la kératite (inflammation de la cornée), l'ulcère de la cornée et l'infection du globe oculaire. Leur origine est une blessure dans la cornée qui sert à la bactérie pour atteindre les couches profondes de l'œil ou la présence de lentilles de contact contaminées qui lui permettent d'adhérer fortement aux cellules de la cornée (Lyczak *et al.*, 2000).

P. aeruginosa est aussi responsable d'infections pulmonaires chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose et représente leur principale cause de mortalité. Au niveau de l'épithélium respiratoire de ces patients, la bactérie adopte un phénotype mucoïde conduisant à la formation de biofilms qui leur confère une résistance accrue aux antibiotiques et, une fois l'infection installée, elle reste difficile à traiter (Lyczak *et al.*, 2000). La persistance de l'infection conduit à l'accumulation de lésions pulmonaires et à une augmentation de la mortalité.

Ce pathogène est aussi responsable de maladies nosocomiales. Toutes les pathologies décrites ci-dessus se contractent souvent en milieu hospitalier (Berthelot *et al.*, 2005). Les contaminations à *P. aeruginosa* sont assez fréquentes *via* les appareils médicaux mais il existe aussi un risque de transmission aux patients par manuportage des bactéries ou par infection par des souches endémiques. Ainsi, *P. aeruginosa* est la troisième bactérie responsable de maladies nosocomiales déclarées en France et représente 10% des cas

d'incidence selon le rapport de l'Institut de Veille Sanitaire (Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, juin 2006).

1.2 Les facteurs de virulence

Le séquençage de la souche PAO1 a mis en évidence la présence de nombreux facteurs de virulence codés sur le large génome de *P. aeruginosa*. La fonction exacte de tous n'est pas encore connue. Ils sont impliqués dans la survie de la bactérie dans différents environnements et ils interviennent au cours du processus d'infection (Kipnis *et al.*, 2006) (Figure 1.4). En effet, ils ont un rôle dans le choix du mode de vie de la bactérie (mobilité, formation de biofilms), dans la reconnaissance et l'adhésion aux cellules infectées, dans le détournement des voies de signalisation eucaryotes conduisant à la mort cellulaire, dans l'inhibition des processus immunitaires de défense (phagocytose, clairance mucociliaire), dans la stimulation de la réponse inflammatoire entraînant la formation de lésions tissulaires. Il est possible de considérer comme facteur de virulence les systèmes généraux de régulation (systèmes à deux composants, QS) et spécifiques de certains des facteurs de virulence qui permettent de coordonner les différentes actions suivant le niveau d'avancement de l'infection.

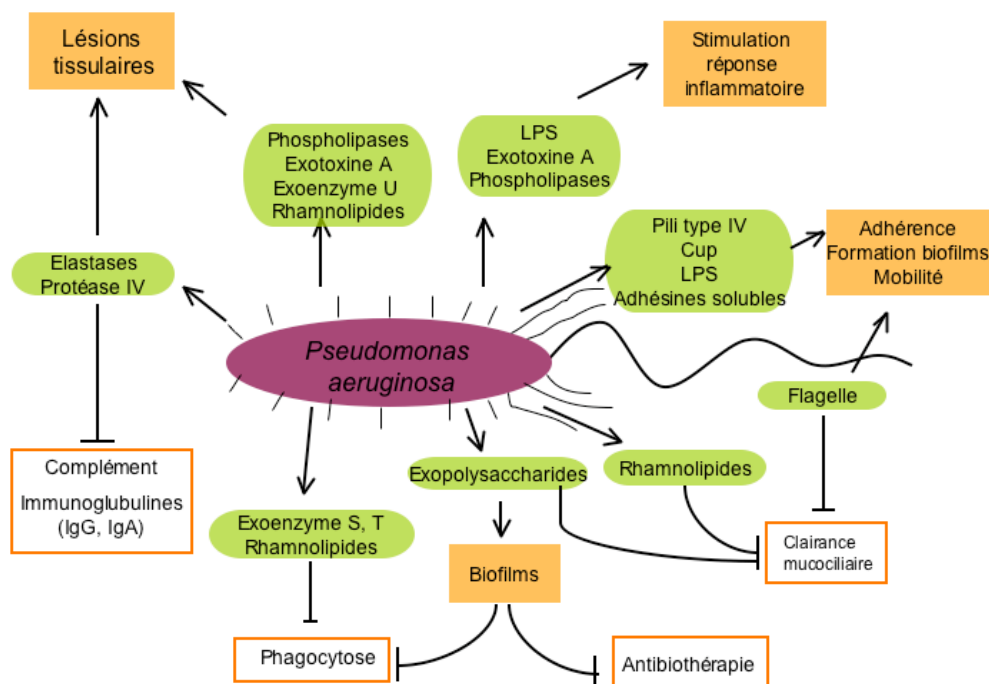


Figure 1.4 : Schéma des principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa* et de leurs effets.

1.2.1 Facteurs de virulence de surface

Cette classe de facteurs de virulence joue principalement un rôle dans l'adhésion des bactéries aux surfaces et plus particulièrement aux tissus infectés (Figure 1.4).

Le **flagelle** est une structure multi-protéique formant un appendice polarisé. C'est le moteur principal de la bactérie qui lui confère sa capacité à nager. Les flagelles ont un rôle important dans la pathogénie car ils permettent l'adhésion aux cellules épithéliales. Cette fonction est réalisée par le biais de l'interaction entre les unités formant le flagelle (FliC) et le glycolipide de surface eucaryote de type asialo-GM1. Le flagelle est également très immunogène de par son interaction avec les récepteurs membranaires TLR5 et TLR2 qui déclenche une réponse immunitaire dépendante du facteur NFκB (Kipnis *et al.*, 2006). Un mutant dépourvu de flagelle présente une pathogénicité réduite surtout dans le cas d'infections de type pneumonie et bactériémie. Au contraire, la perte du flagelle dans le cadre d'infections chroniques permet à la bactérie d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Il est tout de même indispensable dans les premières étapes de formation des biofilms (Filloux and Vallet, 2003).

Les **pili de type IV**, principales adhésines de *P. aeruginosa*, et les **pili de type fimbriae** (Cup) sont également des appendices de surface qui sont en général présents en plusieurs copies à la surface des cellules. Les pili de type IV sont responsables de la motilité des bactéries appelée "twitching" qui est due à la capacité de ces structures à adhérer sur une surface puis à se rétracter à l'intérieur de la cellule, ramenant par mouvement mécanique la bactérie au point d'attache. Ils sont responsables du mouvement à l'interface d'une surface solide et permettent la colonisation rapide des surfaces et sont aussi cruciaux dans les premières étapes de colonisation des tissus. Leurs récepteurs au niveau des cellules épithéliales, en particulier des cellules pulmonaires, sont l'asialo-GM1 et l'asialo-GM2 (Kipnis *et al.*, 2006 ; Mattick, 2002). Les Cup sont assemblés par la voie "chaperone usher" (décrite dans le Chapitre 2, paragraphe 1) (Ruer *et al.*, 2007). Ces facteurs d'attachement sont essentiels pour l'adhérence à des surfaces abiotiques et jouent également un rôle dans la formation des biofilms (Vallet *et al.*, 2001).

La surface de la membrane externe de *P. aeruginosa* est principalement composée de **lipopolysaccharide** (LPS). C'est un composé amphiphile constitué d'une partie

hydrophobe, le lipide A, ancré dans la bicouche lipidique et d'une partie hydrophile constituée de chaînes polysaccharidiques ou antigène O. Cet antigène, dont la composition varie, permet la caractérisation des différents sérotypes de *P. aeruginosa*. Le LPS est très immunogène car il active plusieurs voies de l'inflammation, en particulier *via* la reconnaissance des récepteurs asialo-GM1 et TLR4 (Kipnis *et al.*, 2006). Il reconnaît aussi le récepteur CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), récepteur déficient chez les patients atteints de mucoviscidose. Cette interaction joue un rôle dans le phénomène de clairance des cellules épithéliales pulmonaires, phénomène qui est réduit chez les patients atteints de cette pathologie (Pier *et al.*, 1997).

1.2.2 Facteurs de virulence sécrétés

Ces facteurs de virulence touchent principalement le pouvoir de formation de lésions tissulaires de la bactérie, sa capacité à induire une réponse inflammatoire, et à perturber une partie du système immunitaire (Figure 1.4).

La **pyocyanine**, un pigment essentiel au transport du fer, a un rôle de virulence important notamment lors des infections pulmonaires chroniques. Elle entraîne la diminution de la réponse immunitaire de l'hôte, l'induction de l'apoptose des neutrophiles et une réponse inflammatoire par augmentation de l'IL-8. La **pyoverdine** est un sidérophore : elle chélate des ions ferreux présents dans le milieu pour la croissance de la bactérie (Kipnis *et al.*, 2006). De plus, elle jouerait aussi un rôle dans la virulence par l'interaction de sa forme ferrique avec son récepteur membranaire qui induit une cascade de régulation conduisant à sa propre expression et à celle d'un autre facteur de virulence, l'exotoxine A (Lamont *et al.*, 2002).

Un grand nombre de protéases sont sécrétées par *P. aeruginosa*, dont le rôle précis n'est pas déterminé pour toutes. La **protéase alcaline**, sécrétée par le système de sécrétion de type I, a un rôle dans les infections aiguës, la **protéase IV** dans les infections de la cornée et des poumons (Kipnis *et al.*, 2006). L'**élastase**, la **phospholipase C** et l'**exotoxine A** sont sécrétées par le système de sécrétion de type II. Ces trois enzymes ont toutes une fonction pro-inflammatoire, notamment par le biais de l'augmentation du taux d'IL-8.

L'élastase et la phospholipase C jouent également un rôle dans la déstructuration des tissus, par destruction des jonctions entre les cellules épithéliales et action sur les phospholipides de la membrane des cellules (Kipnis *et al.*, 2006). L'exotoxine A, quant à

elle, a un rôle particulièrement virulent car après son auto-translocation dans la cellule hôte, elle inhibe la synthèse protéique en se fixant sur le facteur d'élongation EF-2. Ceci conduit à la mort cellulaire de la cellule cible par nécrose (Kipnis *et al.*, 2006).

Les **rhamnolipides** sont des glycolipides extracellulaires amphiphiles possédant un pouvoir surfactant sur les phospholipides des cellules épithéliales pulmonaires. Ces composés rendent plus accessibles aux phospholipases C les phospholipides. Ils inhibent la phagocytose et sont aussi impliqués dans le maintien de l'architecture des biofilms (Filloux and Vallet, 2003).

Les **alginate**s sont des exopolysaccharides constitués de répétitions de polymères d'acides manuronique et glucuronique. Les alginate, comme le LPS, servent d'adhésines et permettent l'ancrage des bactéries à l'épithélium, en particulier l'épithélium respiratoire. Dans le cas d'infections chroniques des voies respiratoires, les conditions environnementales conduisent à la conversion des souches de *P. aeruginosa* hypermutatrices vers un phénotype dit mucoïde qui conduit à la formation de biofilms. Un trait majeur de ce phénotype est la production des alginate en quantité importante qui protège la bactérie de la phagocytose, des antibiotiques et atténue la réponse immunitaire de l'hôte (Kipnis *et al.*, 2006).

Les **lectines** sont des glycoprotéines sécrétées qui reconnaissent spécifiquement des sucres (glycoconjugués) à la surface des cellules hôtes. Leurs différents rôles dans la virulence ne sont pas encore clairement définis. Néanmoins, ils permettent l'agglutination des érythrocytes et d'autres bactéries protégeant *P. aeruginosa*. Certaines lectines sont cytotoxiques pour les cellules respiratoires, d'autres bloquent le battement ciliaire de ces cellules permettant de défaire les défense des voies respiratoires (Imberty *et al.*, 2004).

1.2.3 Facteurs de virulence transloqués

Les facteurs de virulence transloqués (directement transférés du cytoplasme bactérien vers la cellule hôte) sont les **exoenzymes** produites par le système de sécrétion de type III. Elles sont au nombre de quatre chez *P. aeruginosa* : les exoenzymes ExoS, ExoT, ExoU et ExoY. L'étude d'un grand nombre de souches cliniques issues de patients atteints de mucoviscidose a montré qu'en moyenne toutes les souches codent pour

exoT, 89% pour *exoY*, 72% pour *exoS* et 28% pour *exoU* (Shaver and Hauser, 2004). Dans la majorité des cas, il a été observé que les souches codant pour *exoS* ne codent pas pour *exoU* et inversement : les deux toxines semblent être mutuellement exclusives (Shaver and Hauser, 2004) ; (Wolfgang *et al.*, 2003). La souche CHA, isolat clinique que nous utilisons comme modèle d'étude au laboratoire (Toussaint *et al.*, 1993) ; (Dacheux *et al.*, 1999), est une souche exprimant ExoS, ExoT et ExoY.

Les effets des différentes toxines sont plus ou moins importants : ExoU est la toxine ayant l'effet majeur sur la mortalité (100 fois supérieur à celui d'ExoS (Kipnis *et al.*, 2006)), et est toujours associée à un mauvais pronostic vital (Wolfgang *et al.*, 2003). ExoS a un effet intermédiaire tandis que ExoT et ExoY ont des effets plus faibles (Shaver and Hauser, 2004).

L'**exoenzyme U** a une activité phospholipase A₂ dont l'activation requiert la présence d'un ou plusieurs facteurs des cellules eucaryotes, dont la superoxyde dismutase à Ca²⁺ et à Zn²⁺ (Sato *et al.*, 2006). L'injection de cette enzyme dans le cytoplasme des cellules et le large spectre de ses substrats (lipides neutres et phospholipides) lui permettent de dégrader les composants de la membrane cellulaire mais aussi des membranes des compartiments internes entraînant la lyse des cellules et une mort par nécrose. Elle participe également à la perméabilisation des cellules et à la dissémination rapide de la souche (Sato *et al.*, 2003). En effet, la capacité des souches pourvues de cette enzyme à tuer les cellules, notamment les cellules immunitaires, réduit le phénomène de clairance et provoque des lésions au niveau du tissu infecté conduisant à une réaction d'inflammation forte qui cause elle-même de nombreux dégâts. La barrière épithéliale des poumons est ainsi rapidement détruite et les bactéries peuvent migrer vers la circulation sanguine causant des chocs septiques (Shaver and Hauser, 2004).

L'**exoenzyme S** est une enzyme bifonctionnelle ayant une activité ADP-ribosyltransférase portée par son domaine C terminal, et une activité activateur de GTPases en N terminal. Cette dernière est spécifique des GTPases de la famille Rho (Rho, Rac, Cdc42) qui maintiennent l'organisation du cytosquelette d'actine. Par son action, ExoS induit une inactivation de la signalisation dépendante des protéines G ce qui entraîne la réorganisation du cytosquelette (désorganisation des fibres de stress). Ceci provoque l'inhibition des processus cellulaires comme la mobilité ou la phagocytose (Kipnis *et al.*, 2006 ; Pederson *et al.*, 2002).

Le rôle d'ExoS dans la pathogénicité est principalement dû à sa seconde activité. Celle-ci consiste en l'ADP-ribosylation de la protéine Ras qui entraîne l'incapacité du facteur d'échange de guanidine à se fixer sur cette protéine. Elle conserve alors une conformation où elle est inactive conduisant à l'inhibition de toute la voie de transduction du signal Ras. Les processus cellulaires bloqués par ce biais sont la prolifération et la différenciation cellulaires, le processus apoptotique et le transport des vésicules intracellulaires (Kipnis *et al.*, 2006 ; Pederson *et al.*, 2002). L'activation de ce domaine nécessite un facteur de la cellule hôte, la protéine FAS (Facteur Activant ExoS) (Kipnis *et al.*, 2006).

L'**exoenzyme T** présente 75% d'homologie de séquence en acides aminés avec ExoS, porte les deux mêmes activités que cette dernière mais cible des protéines différentes. En effet, l'activité activatrice de GTPases d'ExoT touche spécifiquement la GTPase RhoA. Les cibles de l'ADP-ribosyltransférase sont les protéines CrkI et II (Sun and Barbieri, 2003). L'efficacité de cette fonction pour ExoT représente moins d'1% de celle d'ExoS. Bien que les cibles cellulaires ne soient pas les mêmes, ExoT a des effets sur l'organisation du cytosquelette d'actine. Elle inhibe aussi l'internalisation de *P. aeruginosa* et la réparation des lésions (Kipnis *et al.*, 2006 ; Sundin *et al.*, 2004).

L'**exoenzyme Y** possède une activité adénylate cyclase. Après son injection dans les cellules eucaryotes, l'enzyme va être localisée dans le cytoplasme cellulaire et non à la membrane comme les adénylates cyclases eucaryotes. Là, elle va être activée par des cofacteurs eucaryotes tels que la calmoduline. ExoY génère un pool d'AMP cyclique qui n'est pas régulé comme le pool cellulaire, par les phosphodiesterases. Ainsi, un gradient d'AMP cyclique inverse aux conditions physiologiques est généré qui induit un phénomène de modification de la morphologie cellulaire (arrondissement de la cellule). Ceci conduit à la formation d'espaces entre les cellules augmentant la perméabilité et fragilisant les tissus (Sayner *et al.*, 2004 ; Yahr *et al.*, 1998).

1.3 Traitements et résistance aux antibiotiques

1.3.1 Traitements des infections à *Pseudomonas aeruginosa*

Des traitements anti-inflammatoires oraux sont utilisés en complément des antibiothérapies pour diminuer les phénomènes d'inflammation qui ont lieu au niveau

des tissus infectés. L'antibiothérapie est souvent massive et doit être mise en place à un stade précoce et ne pas être administrée trop longtemps. Elle concerne les antibiotiques de type tobramycine, piperacilline, ceftazimide, thienamycine, meropenem, colistine, ciprofloxacine... La ciprofloxacine, antibiotique de la famille des fluoroquinolones, administrée par voie orale permet la destruction de 60 à 90% des bactéries organisées en biofilms. Malgré ce traitement qui permet de diminuer la densité bactérienne, l'éradication de l'infection n'est pas définitive (Wang *et al.*, 2006).

1.3.2 Résistance aux antibiotiques

P. aeruginosa est très résistant aux traitements antibiotiques classiques. Un des systèmes d'efflux exprimé constitutivement permet notamment la résistance intrinsèque à la ceftazamide, aux 4^{èmes} générations de céphalosporines, à l'azotreonam, et aux carbapénems (Wang *et al.*, 2006). *P. aeruginosa* possède dans son chromosome un gène *ampC* codant pour une céphalosporinase qui lui confère une forte résistance aux β -lactamines, pénicillines et cephems (Hirakata *et al.*, 2002). De plus, la bactérie est capable d'intégrer des plasmides de résistance par transfert horizontal (Filloux and Vallet, 2003). Il faut noter que l'incidence de l'acquisition de multirésistances aux antibiotiques est dépendante des pays, des hôpitaux et du type de malades (Hamze *et al.*, 2004). C'est pourquoi une surveillance épidémiologique (Institut de veille sanitaire en France) a été mise en place dans tous les pays afin d'adapter les antibiothérapies à l'évolution des résistances des souches.

1.4 Développement d'immuno thérapies

Malgré le nombre important de personnes infectées par *P. aeruginosa* et l'inappropriation des antibiothérapies, aucun vaccin contre cette bactérie n'est disponible actuellement.

Des vaccins ciblant les LPS ont été testés en différentes phases cliniques. Le LPS purifié est une molécule toxique et pyrogène, caractères dus à sa partie lipidique. La recherche s'est donc tournée vers la production de vaccins à partir des O-polysaccharides seuls. Comme ils sont variables selon les sérotypes de chaque souche, ce sont des vaccins multivalents qui ont été produits. Pour certains vaccins les alginates ont été ajoutés comme antigène. Ces candidats se sont montrés peu immunogènes,

ainsi, pour augmenter l'antigénicité de ces composés, leur greffe à des protéines porteuses est testée (Doring and Pier, 2008).

Une autre cible vaccinale est le flagelle. Chez *P. aeruginosa*, la protéine FliC formant le flagelle peut être classée en deux groupes dont les séquences sont différentes. Les flagellines de type-a regroupent des unités hétérogènes tandis que les flagellines de type-b sont homogènes (Spangenberg *et al.*, 1996). Une tentative d'élaboration d'un vaccin à partir des deux types d'unité de flagelle (FliC, type-a et b) a été testée. Ces vaccins permettent, en modèle animal la protection des grands brûlés contre l'infection à *P. aeruginosa*. En phase clinique la protection engendrée par ces vaccins c'est avérée faible (de l'ordre de 34%) (Doring and Pier, 2008).

D'autres essais ciblent les protéines membranaires externes conservées : OprF et OprI. Une protéine de fusion entre ces deux composés membranaires a été testée et génère une protection dans différents modèles d'infection d'animaux. Ce vaccin est actuellement en cours d'essais en phase clinique sur l'Homme (Doring and Pier, 2008).

Un vaccin oral avec des bactéries atténuées (mutantes pour l'AroA, enzyme essentielle de la synthèse des acides aminés aromatiques) est en cours de développement. Mais ces bactéries atténuées gardent suffisamment de virulence. Des vaccins oraux utilisant des bactéries entières tuées sont en cours d'essai en phase I de tests cliniques (Doring and Pier, 2008).

Des essais d'élaboration de vaccins contre le pili de type IV ont aussi été développés. Mais les monomères de piline formant cet appendice sont hypervariables d'une souche à l'autre. Une protéine de fusion entre la piline du groupe phylogénétique 1 et l'exotoxine A a tout de même été développée qui a fait ses preuves de protection en modèles animaux contre les infections pulmonaires mais qui n'a pas encore été testée en phase clinique (Doring and Pier, 2008).

La dernière cible des vaccins contre *P. aeruginosa* en cours de développement est le système de sécrétion de type III (SST3). Des approches par immunisation active contre la protéine PcrV mais aussi contre la toxine ExoU ont été développées. Ces traitements sont efficaces dans des modèles animaux d'infection pulmonaire. ExoU n'est pas une toxine exprimée par la majorité des souches et ne représente donc pas la cible la plus intéressante. PcrV, quant à lui, est présent dans toutes les souches exprimant le SST3

et sa localisation au cours de l'infection fait de lui un meilleur candidat vaccinal. Nous reviendrons plus en détail sur cet aspect dans le chapitre 4 (paragraphe 3.4).

2. *Yersinia pestis*

2.1 Description

Y. pestis a été isolé pour la première fois en 1894 par Alexandre Yersin. C'est un coccobacille à gram négatif de 1 à 3 μm de long et de 0,5 à 0,8 μm de diamètre (Figure 1.5). Il est classé par la communauté européenne parmi les pathogènes de classe 3 qui comprend des agents qui "provoquent des maladies sérieuses chez l'Homme et qui présentent un risque de propagation dans la collectivité".

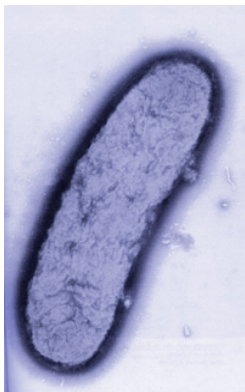


Figure 1.5
Le coccobacille *Yersinia pestis*.
(Source : www.eiu.org/experiments/dispersion/pathogens.html)

2.1.1 Mode de vie et cycle de transmission

Y. pestis se distingue des autres bactéries de la sous-population des *Yersiniae* par le fait qu'elle ne soit pas mobile. Elle dérive de la bactérie *Y. pseudotuberculosis*, un pathogène entérique. Elle a évolué en acquérant la capacité d'infecter des insectes et de les utiliser comme vecteur de transmission. Cette évolution est due au détournement d'un îlot de pathogénicité utilisé par *Y. pseudotuberculosis* pour former des biofilms dans les nématodes. En effet, *Y. pestis* utilise cet îlot pour former des biofilms dans les insectes. Elle a de plus acquis d'autres îlots de pathogénicité exprimant des toxines insecticides. Son cycle de vie et de transmission (Figure 1.6) est complexe. Le premier hôte est le rongeur, principalement le rat. Le passage dans les insectes (puces du rat) se fait après morsure d'un mammifère infecté. La bactérie colonise ensuite l'estomac et la cavité gastrique de l'insecte et forme un biofilm qui joue un rôle de bouchon empêchant

l'animal de se nourrir. C'est ainsi que les insectes multiplient leur effort pour se nourrir et que le cycle de transmission va toucher l'Homme (Prentice and Rahalison, 2007).

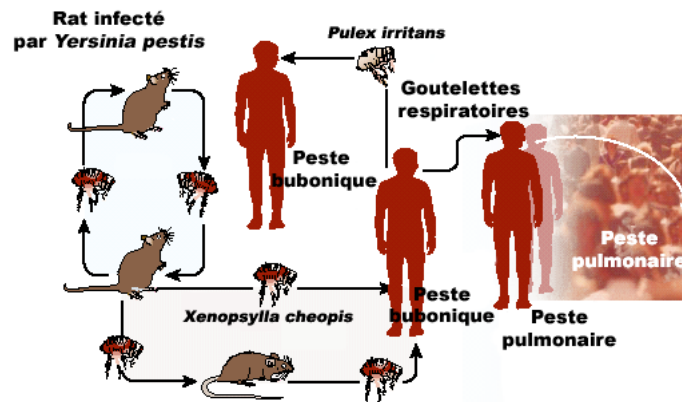


Figure 1.6 : Cycle de transmission de *Y. pestis*
(Source : Cole and Buchrieser, 2001).

L'extrême virulence de la bactérie est due à une incapacité de l'hôte à engendrer une réponse immunitaire efficace. Dans les premiers moments de l'infection, la bactérie, qui est un pathogène intracellulaire facultatif (Perry and Fetherston, 1997), est capable de vivre à l'intérieur des monocytes et macrophages pour échapper au système immunitaire. Puis, la bactérie regagne un mode de vie extracellulaire où elle va réduire l'inflammation en détruisant les cellules immunitaires telles que les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques (Prentice and Rahalison, 2007 ; Perry and Fetherston, 1997).

2.1.2 Infections à *Yersinia pestis*

Les infections à *Y. pestis* peuvent être classées en trois catégories selon les symptômes. En général, lors d'une morsure par un insecte infecté, il y a délocalisation de la bactérie vers les nodules lymphatiques les plus proches. L'inflammation produit une protubérance ou bubon, d'où le nom de peste bubonique. C'est le cas le plus répandu représentant 80 à 95% des cas déclarés et dont la mortalité est la plus faible (10 à 20%). Si l'infection n'est pas traitée, elle va se répandre à travers l'organisme notamment vers les poumons où elle cause la deuxième forme d'infection : la peste pulmonaire de second degré. Cette forme est une source de transmission de la bactérie par la salive et notamment *via* les gouttelettes respiratoires. Les personnes alors infectées par ce biais sont atteintes de peste pulmonaire de premier degré. L'incubation

courte, de 2 à 3 jours, est suivie d'une infection virulente. C'est la forme de la maladie la plus rare, mais qui atteint un taux de mortalité de 100% (Perry and Fetherston, 1997 ; Prentice and Rahalison, 2007).

Y. pestis a été responsable de trois grandes pandémies à travers le monde. La première c'est déroulée sous l'empire romain au IV^{ème} siècle, la seconde, connue sous le nom de la Peste Noire, a décimé plus d'un tiers de la population européenne au XIV^{ème} siècle. La dernière pandémie date de la fin du XIX^{ème} siècle et a touché la Chine et l'Inde. L'amélioration des conditions d'hygiène, de la veille sanitaire, de la connaissance sur les modes de transmission du bacille et des traitements antibiotiques a permis d'éradiquer les grands foyers de peste. Elle est tout de même classée parmi les maladies réémergentes par le WHO (World Health Organization), des foyers de peste étant déclarés en Asie, en Afrique du Nord, du Sud et de l'Est (Perry and Fetherston, 1997 ; Prentice and Rahalison, 2007).

Y. pestis est aussi une bactérie très surveillée par le US Center for Disease Control et l'American Society of Microbiology. En effet, elle a été utilisée comme arme biologique sur des civils et prisonniers de guerre en Chine lors de la seconde guerre mondiale, sous forme de "bombes à insectes contaminés". Des recherches ont été menées afin de créer des aérosols de *Y. pestis* par les américains et les soviétiques lors de la guerre froide, ce qui permettrait de s'affranchir du passage par le vecteur insecte et d'obtenir une arme biologique puissante (Prentice and Rahalison, 2007 ; Smiley, 2008).

2.2 Les facteurs de virulence

Y. pestis exprime de nombreux facteurs de virulence dont les principaux sont codés sur trois plasmides (Perry and Fetherston, 1997 ; Brubaker, 1991). pPst, plasmide de 10 kb unique à cette souche, code pour une toxine pesticine et un activateur du plasminogène (Pla). Le plasmide pTox de 100 kb code pour un grand nombre de facteurs dont, dans de nombreux cas, la fonction est inconnue. Parmi ces facteurs un grand nombre de protéines permettent le transport et le stockage des ions métalliques, qui sont indispensables à la croissance et à la virulence de la bactérie. D'autres facteurs y sont aussi codés comme l'antigène F1 et l'antigène pH6 (Perry and Fetherston, 1997 ; Brubaker, 1991).

Le troisième plasmide indispensable à la virulence de l'espèce *Yerinia* est le plasmide pCD1 (*Y. pestis*)/pYV (*Y. enterocolitica* et *pseudotuberculosis*), de 70 kb, qui code pour :

Un système de sécrétion de type III, six effecteurs, ou Yops (Yersinia Outer Proteins), des régulateurs de l'expression des gènes du SST3 et de la sécrétion/translocation des Yops et une adhésine, YadA.

Toutes les souches de la sous-population *pestis* ont une mutation par délétion dans la zone codant pour *yadA* et par conséquent n'expriment pas cette adhésine (Brubaker, 1991 ; Perry and Fetherston, 1997 ; Cornelis, 2002 ; Aepfelbacher *et al.*, 2007). Par contre, les autres gènes sont très conservés.

2.2.1 Les facteurs de virulence codés par le plasmide pPst

La **pesticine** est une protéine de type bactériocine qui est codée par le gène *pst*. Un gène *pim* "pesticin immunity" codant pour une protéine qui protège *Y. pestis* contre l'action de la pesticine est aussi portée par ce plasmide. La pesticine a une activité sur les souches de *Y. pseudotuberculosis*, quelques souches de *Y. enterocolitica* et plusieurs souches d'*E. coli*. C'est une activité muramidase conduisant à la dégradation du peptidoglycane. Les cellules sensibles forment, après action de cette enzyme, des sphéroblastes entraînant l'arrêt de la croissance bactérienne (Vollmer *et al.*, 1997). Ce facteur de virulence permet donc à *Y. pestis* de prendre le dessus sur d'autres espèces bactériennes qui pourraient se trouver au niveau de sites d'infection communs.

L'**activateur de plasminogène** Pla de *Y. pestis* est aussi codé par pPst et cible les précurseurs de la plasmine présents dans le plasma des organismes eucaryotes (Lahteenmaki *et al.*, 2001). Ces précurseurs, après clivage protéolytique, libèrent l'enzyme plasmine qui a plusieurs rôles : lyse de la fibrine, dégradation de composants de la matrice extracellulaire, activation de certains facteurs de croissance. Pla est une protéine ancrée dans la membrane externe de la bactérie. Son activité confère à la bactérie un caractère invasif important et lui permet de circuler rapidement à partir de la piqûre d'insecte vers la circulation sanguine, le foie, la rate et les poumons. Il a été montré qu'une souche n'exprimant pas le gène *pla* a une virulence très atténuée. En effet, elle doit être inoculée par injection subcutannée à une dose de 10^7 bactéries pour avoir un effet mortel sur des souris comparable à celui d'une souche sauvage qui est inoculée à 50 bactéries (Lahteenmaki *et al.*, 2001).

Pla se fixe à la laminine ce qui permet à la bactérie de se localiser dans la matrice extracellulaire. Elle active le plasminogène entraînant la production de plasmine qui va dégrader la matrice extracellulaire. Pla a aussi la capacité de dégrader l' α_2 -

antiplasmine, enzyme de dégradation de la plasmine permettant l'accumulation de cette dernière dans le milieu extracellulaire. Elle inactive le complément et réduit la production de chimioattractants qui va supprimer la migration des cellules immunitaires sur le site d'infection (Lahteenmaki *et al.*, 2001 ; Galvan *et al.*, 2008). Elle a aussi une action protéolytique sur les peptides antimicrobiens chargés positivement (Galvan *et al.*, 2008).

2.2.2 Les facteurs de virulence codés par le plasmide pTox

Ce plasmide code principalement pour deux antigènes de surface, l'**antigène capsulaire fraction 1** (antigène F1) et l'**antigène pH6** (Psa). Ces deux structures inhibent l'internalisation des bactéries par les cellules (en particulier les macrophages). Ils sont également importants dans le processus d'invasion car ils permettent l'interaction des bactéries avec les cellules eucaryotes.

L'antigène pH6 est la seule adhésine connue de *Y. pestis*. Elle forme de fines structures en fibrilles à la surface de la bactérie, composées par l'homopolymérisation de la sous-unité PsaA, et peut être classée parmi les structures de type fimbriae. Elle est sécrétée par une des voies "chaperone usher" de *Yersinia* spp. (Voir Chapitre 2, paragraphe 1). Elle est exprimée à des pH de l'ordre de 5 ou 6, pH qui sont en général observés au niveau des sites d'infection (bubons, lésions au niveau du foie et de la rate). L'antigène pH6 permet le contact avec les cellules cibles par son interaction avec un motif polysaccharidique retrouvé sur les glycosphingolipides. Il agit aussi en protégeant les bactéries contre les peptides anti-microbiens (Liu *et al.*, 2006 ; Galvan *et al.*, 2008 ; Payne *et al.*, 1998).

L'antigène F1 est aussi sécrété par une des voies "chaperone usher". Il forme une structure capsulaire amorphe à la surface des bactéries qui l'expriment. Ces structures sont des homopolymères de la sous-unité Caf1 (Liu *et al.*, 2006). Ses rôles sont similaires à ceux de l'antigène pH6.

2.2.3 Les effecteurs du système de sécrétion de type III

Quatre effecteurs ont pour cible principale le cytosquelette de la cellule eucaryote hôte : YopE, YopH, YopT et YpkA (ou YopO pour *Y. enterocolitica*). L'effet majeur produit par ces toxines est l'inhibition de la phagocytose.

YopE a une activité d'activation de protéines GTPases qui touche les GTPases Rho, Rac et Cdc42 (Cornelis, 2002 ; Aepfelbacher *et al.*, 2007).

YopH est une phosphotyrosine phosphatase très active. Ses substrats sont des protéines qui régulent les interactions entre le cytosquelette d'actine et les intégrines extracellulaires (points focaux d'adhésion). Leur déphosphorylation conduit à la destruction des points focaux d'adhésion, d'où l'action anti-phagocitaire de YopH qui représente 50% de cette activité des effecteurs de *Yersinia* spp (Cornelis, 2002 ; Aepfelbacher *et al.*, 2007).

YopT conduit à la dépolymérisation du cytosquelette d'actine par le biais de son action sur la GTPase RhoA qui régule la formation de fibres de stress. YopT a une action protéasique sur cette dernière qui conduit à son détachement des membranes plasmiques où elle ne peut plus remplir son rôle (Cornelis, 2002 ; Aepfelbacher *et al.*, 2007).

YpkA/YopO est une sérine-thréonine kinase, fonction portée par son domaine N-terminal. Le domaine C terminal quant à lui est un domaine d'interaction avec l'actine et avec les GTPases Rho et Rac. Cette enzyme, une fois injectée, est localisée à la surface interne de la membrane plasmique de la cellule eucaryote d'où elle détruit les fibres de stress d'actine (Cornelis, 2002 ; Aepfelbacher *et al.*, 2007).

Les toxines **YopP** et **YopJ** jouent un rôle dans l'atténuation de la réponse immunitaire. Plusieurs hypothèses ont été émises sur leur fonctionnement. Elles auraient une activité acétyltransférase sur les résidus sérines et thréonines de certaines kinases cellulaires. YopP et YopJ acétylraient les kinases IKK β et MAPKK et empêcheraient leur activation. En inactivant les voies de transduction du signal NF κ B et MAPK, elles sont capables d'atténuer la réponse immunitaire innée des cellules. Enfin, en inhibant les signaux anti-apoptotiques, ces deux toxines induisent aussi l'apoptose des cellules dendritiques et des macrophages (Cornelis, 2002 ; Aepfelbacher *et al.*, 2007).

Une dernière toxine, **YopM**, est exprimée par le SST3. Sa fonction n'est pas déterminée mais elle est importante pour la virulence de *Yersinia* spp. dans un modèle d'infection de souris (Cornelis, 2002). Il a été montré que cette protéine migre vers le noyau où elle influencerait la transcription de certains gènes.

2.3 Traitement et résistance aux antibiotiques

2.3.1 Diagnostic

Les moyens de détection et d'identification classiques de microbiologie prennent trop de temps pour la détermination de l'agent infectieux *Y. pestis*. Pour trouver une solution à ce problème, d'autres tests de diagnostic plus rapides sont en voie de développement. Deux d'entre eux reposent sur des examens biochimiques à partir d'échantillons de sang ou de crachats de personnes infectées. Ils consistent en des tests de type ELISA pour la détection de LcrV, une protéine du SST3 de *Y. pestis*, des tests ELISA et d'hémagglutination dirigés contre le facteur F1 (Prentice and Rahalison, 2007 ; Smiley, 2008).

2.3.2 Traitements et résistances aux antibiotiques

Les traitements disponibles actuellement sont basés sur l'antibiothérapie. La streptomycine à forte dose (30 mg/kg journaliers) est le traitement le plus efficace contre la peste bubonique et pulmonaire. Pour la peste pulmonaire de premier degré, le problème majeur réside dans la rapidité de l'infection qui, en général, ne laisse pas le temps de définir un diagnostic.

Les antibiotiques de la famille des aminoglycosides (streptomycine et gentamycine), des tétracyclines et des quinolones (fluoroquinolone) sont efficaces pour traiter la peste. Les aminoglycosides sont principalement utilisés pour le traitement, tandis que les tétracyclines et quinolones sont utilisés pour la prophylaxie (Dennis and Hughes, 1997).

Les β -lactames (pénicillines et céphalosporines) quant à eux semblent moins efficaces notamment pour le traitement de la peste pulmonaire. Deux souches multi-résistantes ont été isolées sur deux patients atteints de peste bubonique à Madagascar en 1995 et 1997. La souche *Y. pestis* 16/95 est résistante à la streptomycine tandis que la seconde souche, *Y. pestis* 17/95 est elle mutli-résistante (ampicilline, chloramphénicol, kanamycine, streptomycine, spectinomycine, sulfonamides et tétracyclines). *Y. pestis* 16/95 exprime une streptomycine phosphotransférase par le biais d'un plasmide qu'elle a acquis lors d'un transfert génétique d'origine inconnue. *Y. pestis* 17/95 exprime plusieurs enzymes, dont une streptomycine adényltransférase, lui conférant une multirésistance par le biais d'un plasmide acquis par transfert horizontal ayant certainement pour origine une souche de la famille des enterobacteriaceae.

Ces deux plasmides sont maintenus au cours des génération et présentent un fort taux de transfert horizontal (Guiyoule *et al.*, 2001 ; Galimand *et al.*, 1997).

2.3.3 Développement de vaccins

Aux vues des risques bioterroristes que présente *Y. pestis*, et comme la peste est une maladie réémmergente, aujourd'hui les recherches se multiplient pour la production d'un vaccin efficace contre ce pathogène (Smiley, 2008).

Le premier vaccin utilisé à grande échelle a été décrit en 1897 (Smiley, 2008). Ce vaccin est constitué d'organismes virulents de *Y. pestis* tués par la chaleur. Il confère une protection contre la peste bubonique mais pas contre la forme pulmonaire. Au XX^{ème} siècle, une nouvelle forme de vaccin a été décrite qui utilise cette fois des cellules tuées à la formaline qui présente les mêmes inconvénients que la première forme de vaccins. En 1904, des bacilles vivants atténués ont été testés et ils confèrent une résistance à la peste bubonique et pulmonaire. Mais le bacille conserve une certaine virulence en modèle d'infection de primates. Malgré ces observations, le vaccin actuellement utilisé est constitué de la souche EV 76 de *Y. pestis* vivante atténuée (Smiley, 2008). Des recherches sont en cours pour l'utilisation de cellules EV 76 modifiées génétiquement afin de produire une grande quantité de lipopolysaccharides de surface, augmentant le pouvoir immunogène du vaccin.

Pour pallier aux problèmes engendrés par l'utilisation de cellules entières, les vaccins à base de sous-unités protéiques ou d'anticorps se sont développés.

En 1952, la protéine capsulaire F1 de *Y. pestis* a été purifiée. L'immunisation de rats, de souris et même de macaques avec cette protéine les protègent contre l'infection à *Y. pestis* (Smiley, 2008). La limite de ce vaccin potentiel est qu'il existe un certain nombre de souches qui ne produisent pas de protéine F1 et contre lesquelles le vaccin n'a pas d'effet.

Sur le même modèle une série d'études a été réalisée en utilisant comme cible vaccinale la protéine LcrV, protéine de surface retrouvée au sommet de l'aiguille du SST3 (Chapitre 4, paragraphe 3.4). L'immunisation active (injection de la protéine recombinante) protègent des modèles animaux contre la peste bubonique et pulmonaire due à des souches F1 positives et négatives.

Pour augmenter l'efficacité des vaccins par immunisation active, la recherche se tourne vers la combinaison de F1 et de LcrV. Un alun de F1 et LcrV ainsi qu'une protéine de

fusion F1-LcrV (rF1V) ont été créés et testés : ils protègent les souris contre la peste pulmonaire (Smiley, 2008). Ces deux vaccins sont entrés en phase d'essais cliniques. Pour augmenter encore leur efficacité, diverses améliorations sont testées :

- Utilisation d'antigènes génétiquement modifiés (délétion de la région immunosuppressive de LcrV),
- test de différents adjuvants,
- utilisation de vecteurs pour introduire directement les antigènes dans les cellules humaines,
- ajout d'antigènes supplémentaires dans le vaccin : YopD, YopB (protéines formant le pore de translocation des toxines du SST3) et YopE (effecteur).

3. Autres pathogènes de l'Homme

Lors de ce travail de thèse nous ferons allusion à d'autres bactéries à gram négatif pathogènes. Des comparaisons avec leurs systèmes de sécrétion de type III (organisation, structures tridimensionnelles...) seront effectuées. Il s'agit des espèces d'*Escherichia coli* entéropathogènes et entérohémorragique (EPEC, EHEC), des *Shigella* et *Salmonella* et de *Burkholderia pseudomallei*.

Burkholderia pseudomallei, préalablement classé parmi le genre *Pseudomonas*, est un pathogène opportuniste intracellulaire facultatif (Stevens *et al.*, 2006). Il est responsable de la mélioïdose chronique ou aiguë, endémique dans la région Asie-Pacifique. Il entre dans les cellules non-phagocytaires grâce à son système de sécrétion de type III où il forme des traînées d'actine et se répand de cellules en cellules (Stevens *et al.*, 2006).

Le genre *Salmonella*, selon les souches, provoque des maladies allant de gastroentérites aiguës à la fièvre typhoïde. C'est un pathogène intracellulaire facultatif. Il a acquis des facteurs de virulence, notamment le SST3, qui lui permettent d'induire sa propre internalisation par modification du cytosquelette d'actine au point d'entrée de la bactérie (Stevens *et al.*, 2006 ; Pizarro-Cerda and Cossart, 2006).

Le genre *Shigella*, pathogène intracellulaire facultatif, qui provoque des gastroentérites aiguës, agit de manière identique aux Salmonelles. Il entre dans les cellules épithéliales de façon dépendante du SST3 (Stevens *et al.*, 2006 ; Pizarro-Cerda and Cossart, 2006).

Les espèces pathogènes d'*Escherichia coli* : *E. coli* entéropathogènes (EPEC) et *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) provoquent des infections intestinales qui peuvent

gagner des tissus extérieurs (tractus urinaire, cerveau). Ces bactéries, extracellulaires, se fixent sur les cellules du système entérique et, grâce à leur SST3, engendrent la formation d'un piédestal. Ainsi, ces pathogènes créent des lésions sur l'épithélium entérique par la destruction locale des microvilli. Ils se propagent sur la surface des cellules et de cellules en cellules grâce à ce piédestal d'actine qui les supporte (Stevens *et al.*, 2006).

4. Conclusion

Les bactéries *P. aeruginosa* et *Y. pestis* sont capables d'infecter un spectre d'hôtes important et présentent un large arsenal de facteurs de virulence. *P. aeruginosa* est présent dans de nombreuses niches écologiques, et son large génome lui permet de s'adapter à de nombreuses situations. C'est aussi un organisme qui se protège efficacement des antibiotiques et qui acquiert de nombreuses résistances. *Y. pestis* est lui responsable d'infections très virulentes et a évolué d'un cycle zootique vers l'infection des Hommes. C'est un pathogène réémergent dans certains pays qui commence à acquérir des multi-résistance aux antibiotiques. À ce jour, aucun vaccin dirigé contre l'une ou l'autre de ces deux bactéries n'est commercialisé.

Un fait intéressant des nouvelles technologies vaccinales est le développement d'anticorps monoclonaux protecteurs. Ceux-ci sont de plus en plus utilisés pour immuniser de manière passive les individus infectés par certains micro-organismes. Les anticorps développés sont dirigés contre des protéines spécifiques de bactéries ou même directement contre les toxines de ces organismes (Casadevall *et al.*, 2004).

Ainsi, par exemple, une immunothérapie passive est disponible pour lutter contre les infections à *Streptococcus pneumoniae* et *Corynebacterium diphtheriae* et les vaccins contre ces deux agents sont en cours de développement (Casadevall *et al.*, 2004).

Le problème est que les connaissances dans les agents infectieux ne sont souvent pas encore suffisantes pour déterminer de bonnes cibles pour les anticorps thérapeutiques. Dans le cas des bactéries pathogènes à gram négatif, notamment les espèces virulentes que nous venons de décrire, le système de sécrétion de type III semble offrir un nombre de candidats potentiels. De nombreux travaux sont actuellement réalisés sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre les protéines LcrV de *Y. pestis* et PcrV de *P. aeruginosa* (Chapitre 4, paragraphe 3.4).

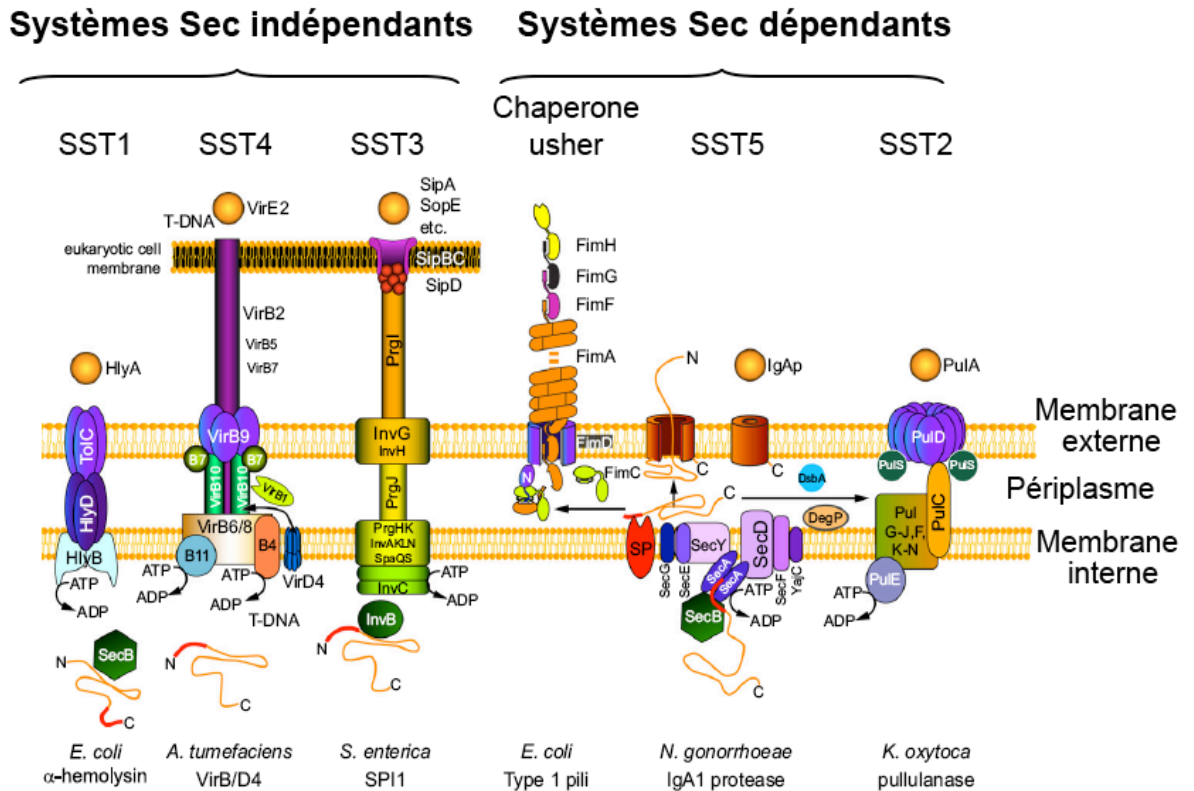


Figure 2.1 : Systèmes de sécrétion des bactéries à gram négatif. (Source : Gerlach & Hensel, 2007).

Le SST1 est représenté par la sécrétion de l' α -hémolysine par *E. coli*, le SST2 par le mécanisme de sécrétion de la pullulanase de *Klebsellia oxytoca*. En parallèle du SST2, la voie chaperone/usher est schématisée en utilisant l'exemple de l'assemblage du pili de type I d'*E.coli*. Le SST3 de la figure fait partie de la famille des injectisomes Inv-Mxi-Spa dont un des représentant est le SST3 SPI-1 de *Salomnella enterica*. Le SST4 est représenté par le système d'injection d'ADN dans les cellules de plantes par *Agrobacterium tumefaciens*. Le modèle utilisé pour présenter le SST5 est celui de l'IgA1 protéase sécrétée par *Neisseria gonorrhoeae*.

Chapitre 2

Les systèmes de sécrétion des bactéries à gram négatif

Le transport de protéines à travers les membranes est une fonction conservée chez toutes les bactéries. Les protéines sécrétées présentent de nombreuses propriétés dont un rôle dans la biogenèse de l'enveloppe cellulaire, l'acquisition de nutriments, la communication intercellulaire et la libération de facteurs de virulence (adhésion, mobilité, toxines, protéases...).

Plusieurs systèmes différents permettent la sécrétion de ces facteurs et selon l'espèce, ils ne sont pas tous présents. Un système général de sécrétion (système Sec) permettant le passage des membranes existe chez toutes les bactéries, les archae bactéries ainsi que dans les cellules eucaryotes (au niveau des organelles telles que les chloroplastes ou le réticulum endoplasmique). Tandis que ce système permet aux bactéries à gram positif de sécréter des molécules dans le milieu extracellulaire, il ne conduit que le passage des protéines à travers la membrane interne des bactéries à gram négatif. Une fois dans le périplasma, il faut donc qu'elles passent la membrane externe. Des systèmes ont été développés par les bactéries à gram négatif pour compléter la sécrétion de ce système général : le système de sécrétion de type II, le système de sécrétion de type V et la voie "chaperone/usher". Ces systèmes sont schématisés en figure 2.1 et sont présentés chez des organismes modèles pour lesquels ils sont le mieux connus.

Trois autres systèmes de sécrétion, indépendants du système Sec ont aussi été développés par les bactéries à gram négatif. Il s'agit des systèmes de sécrétion de type I, III et IV (Figure 2.1).

Un nouvel appareil, le système de sécrétion de type VI, a été décrit chez plusieurs bactéries à gram négatif dont *P. aeruginosa*. Il n'est cependant pas assez connu pour pouvoir le classer dans une des deux catégories précédentes.

P. aeruginosa possède tous les systèmes excepté le SST4 pour la sécrétion spécifique de nombreuses molécules qui lui permettent de s'adapter à toutes ses niches écologiques et lui confèrent une virulence envers différents organismes (Figure 2.2) (Ma *et al.*, 2003).

Y. pestis, dont le génome a été séquencé en 2001 (Parkhill *et al.*, 2001), ne possède que les systèmes de sécrétion de type III et VI et plusieurs voies de type chaperone/usher.

Un système de sécrétion de type III est codé par le plasmide pCD1 et un second système de type III est codé au niveau du chromosome. Les gènes sont similaires et ordonnés de la même manière que pour le SST3 de la famille SPI-2 de *S. typhimurium* (voir chapitre 3, paragraphe 1.2). Aucun effecteur n'a pu être mis en évidence pour ce second système et il apparaît comme étant non fonctionnel. Les voies chaperone/usher permettent la synthèse de structures de type fimbriae telles que l'antigène pH6 et F1. Huit autres systèmes de type chaperone/usher ont été mis en évidence au niveau du génome mais leur fonctionnalité n'a pas été démontrée (Figure 2.2).

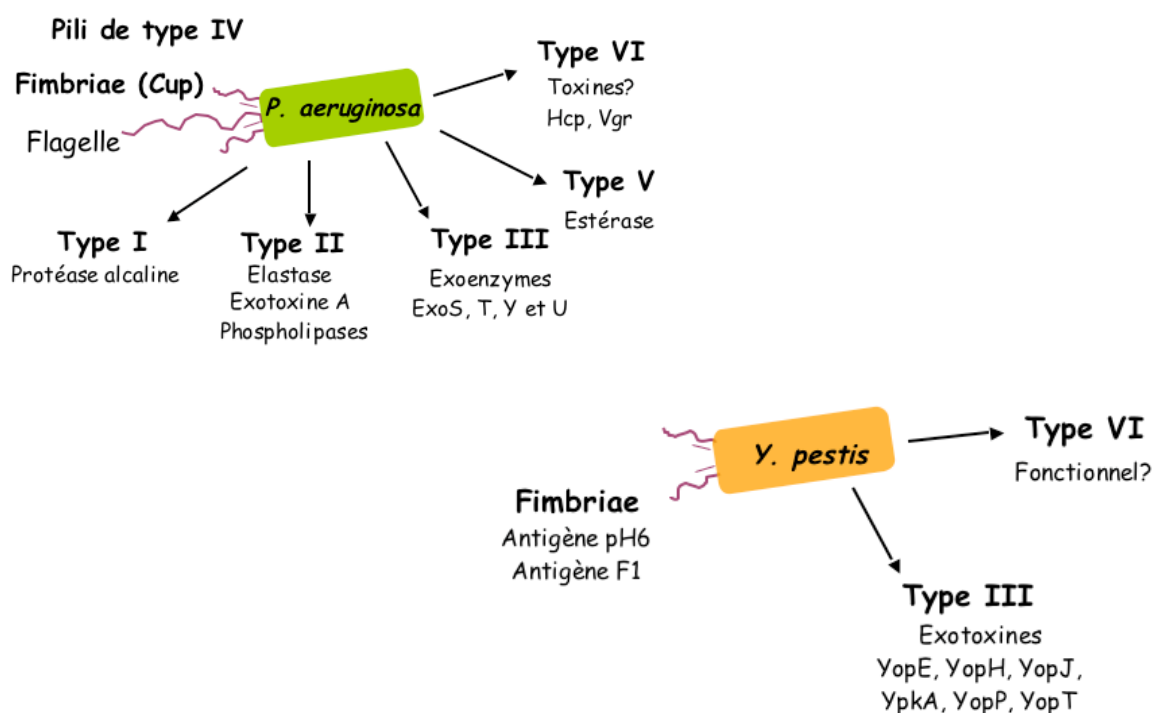


Figure 2.2 : Systèmes de sécrétion de *P. aeruginosa* et *Y. pestis* et leurs substrats principaux.

1. Les systèmes Sec dépendants

1.1 Le système général de sécrétion

Il permet la sécrétion de protéines cibles du cytoplasme bactérien vers le périplasme. Ces protéines sont reconnues grâce à un peptide signal contenu dans leur partie N terminale et qui est clivé après leur passage de la membrane interne par des peptidases spécifiques (SPases I et II). Le transport de ces protéines est réalisé par un complexe hétérotrimérique de SecY, SecE et SecG qui forme un pore inséré dans la membrane

interne (Ma *et al.*, 2003 ; Gerlach & Hensel, 2007) (Figure 2.1). Il est aidé par un autre complexe dans la membrane (SecD, SecE et YajC) qui facilite le transfert. À l'intérieur de la cellule, les protéines partiellement dépliées sont reconnues par le facteur SecA et sa chaperone SecB qui les dirigent vers le pore SecYEG. La translocation de la protéine se fait grâce à la force motrice d'hydrolyse de l'ATP réalisée par SecA (Ma *et al.*, 2003 ; Gerlach & Hensel, 2007 ; Eser & Ehrmann, 2003).

Ce système général est commun à toutes les bactéries à gram négatif et délivre les protéines à sécréter dans le périplasma où elles sont ensuite prises en charge par les systèmes de sécrétion que nous allons présenter.

1.2 Le système de sécrétion de type II (SST2)

Il complète la sécrétion vers le milieu extracellulaire du système Sec et celui d'un second système connu pour fonctionner en parallèle. Ce dernier est le système Tat (Tween Arginine Translocation System) qui est opérationnel chez *P. aeruginosa* (Voulhoux *et al.*, 2001). Il est constitué de trois protéines de la membrane interne TatA, TatB et TatC et il permet la sécrétion du cytoplasme vers le périplasma bactérien de substrats spécifiques sous forme repliée, contrairement au système Sec. Cette fonction est indépendante de l'hydrolyse de l'ATP et ne requiert que la force protomotrice. Les substrats (dont la phospholipase C) ont un peptide signal particulier d'environ 40 acides aminés situés en N terminal nécessaire à leur passage par le système Tat. Dans le périplasma, ils sont ensuite pris en charge par le système de sécrétion de type II.

Deux systèmes de sécrétion de type II ont été mis en évidence chez *P. aeruginosa* : le système principal, *xcp*, homologue aux systèmes mis en évidence chez d'autres espèces bactériennes (Pugsley *et al.*, 1997 ; Filloux *et al.*, 1998 ; Gerlach & Hensel, 2007). Un second SST2 a été décrit, le système *hxc* (pour homologous to *xcp*) (Ball *et al.*, 2002). Ces deux systèmes sont spécifiques de certains substrats. Ainsi, le système *xcp* permet la sécrétion des élastases LasA et LasB, de l'exotoxine A et les phospholipases C (Pugsley *et al.*, 1997 ; Filloux *et al.*, 1998 ; Gerlach & Hensel, 2007). Le système *hxc* permet, quant à lui, la sécrétion de la phosphatase alcaline et ne serait fonctionnel que dans des conditions particulières. En effet, l'augmentation de la sécrétion de la phosphatase alcaline permet d'augmenter l'efficacité d'acquisition de phosphate inorganique dans des conditions où la sécrétion de l'alcaline phosphatase par *xcp* est limitée, phénomène

dû à une activité importante de la sécrétion des autres exotoxines par *xcp* (Ball *et al.*, 2002).

Le système de sécrétion de type *xcp* est conservé parmi les espèces bactériennes qui en sont pourvues. La nomenclature est la même que celle présentée en figure 2.1 sur le modèle *Klebsellia oxytoca*, exceptée pour *P. aeruginosa*. La structure globale du système ainsi que son fonctionnement restent les mêmes (Figure 2.3).

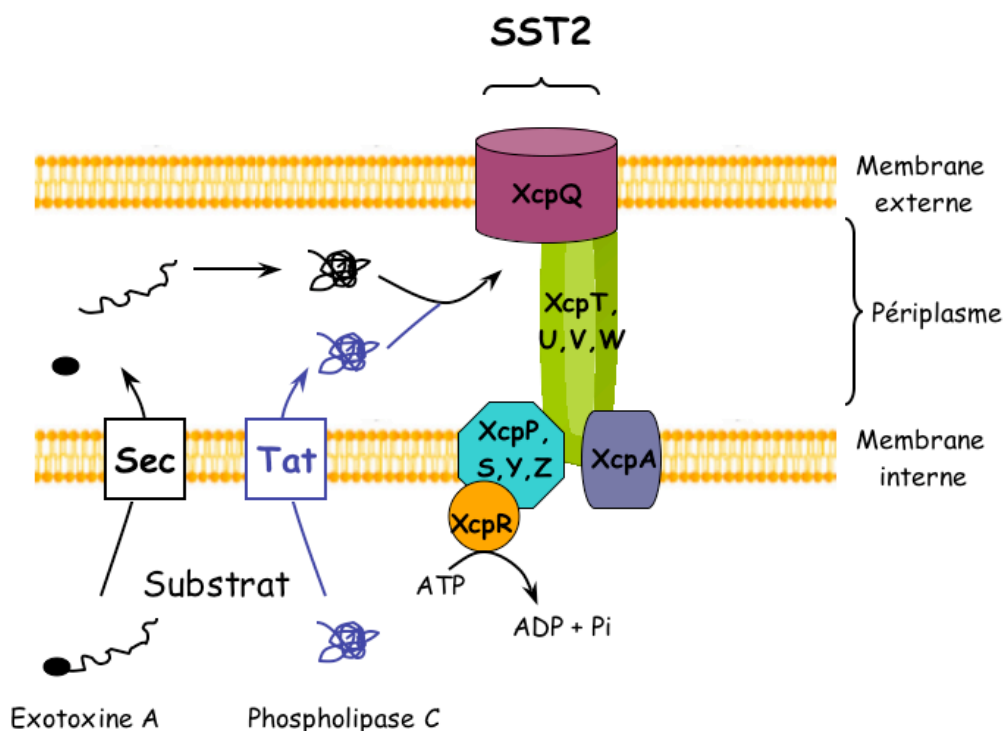


Figure 2.3 : Schéma représentant le SST2 de *P. aeruginosa*.

Le système *xcp* est représenté avec les complexes protéiques dont la localisation n'est pas toujours définie exactement. Les systèmes Sec et Tat sont les deux alternatives aux substrats pour le passage de la membrane interne. Dans le périplasme, les deux types de substrats sont pris en charge par le SST2.

Chez *P. aeruginosa*, douze gènes sont codés par le locus *xcp* et sont nécessaires à son fonctionnement. Parmi les protéines de ce système, la plupart sont localisées dans la membrane interne et le périplasme (Pugsley *et al.*, 1997 ; Filloux *et al.*, 1998 ; Kostakioti *et al.*, 2005). Seule la protéine XcpQ est une protéine intégrée dans la membrane externe et, sous forme d'un oligomère de 12 à 14-mers, génère un pore central qui permet le passage des substrats sous forme repliée (Filloux *et al.*, 1998 ; Russel, 1998). Une partie des autres protéines formant le complexe (XcpT à W) est appelée pseudopiline pour leur ressemblance au monomère de piline et forme une structure qui

traverse le périplasma bactérien (Filloux *et al.*, 1998). Il a été proposé que ces composants pourraient agir comme un piston pour exporter les protéines par le pore de sécrétion (Kostakioti *et al.*, 2005 ; Pugsley *et al.*, 1997).

Les autres composants sont intégrés plus ou moins à la membrane interne et n'ont pas de fonction déterminée mis à part XcpA qui est une pseudopiline peptidase (Filloux *et al.*, 1998). Elle a deux actions : elle hydrolyse les 6 derniers résidus de la partie N terminale des pseudopilines libérant leur segment hydrophobe, puis elle mature le segment par méthylation de domaine N terminal (Filloux *et al.*, 1998).

Enfin, XcpR, composant cytoplasmique, est une ATPase putative car elle contient des séquences similaires aux séquences codant pour les domaines de type Walker (Pugsley *et al.*, 1997 ; Filloux *et al.*, 1998 ; Russel, 1998).

De nombreux gènes qui codent pour des composants nécessaires à l'assemblage et à la fonction du SST2, sont homologues aux gènes codant pour le pilus de type IV (Hahn, 1997 ; Russel, 1998). Ils forment tout de même deux familles de gènes distincts mais environ une dizaine de protéines sont homologues entre les deux systèmes (Wall & Kaiser, 1999).

Les protéines nécessaires à la formation du pilus de type IV sont synthétisées sous forme de précurseurs et sont importées dans le périplasma par le système Sec. Après hydrolyse du peptide signal par la peptidase SpI ou II, les prépilines sont prises en charge par PilD (XcpA dans la nomenclature du SST2) (Nunn *et al.*, 1990 ; Mattick *et al.*, 1996 ; Wall & Kaiser, 1999). PilD hydrolyse les 6 derniers résidus de la partie N terminale des prépilines libérant leur segment hydrophobe, puis elle mature le segment par méthylation de domaine N terminal (Filloux *et al.*, 1998). Suite à cela, la piline PilA, polymérise. L'assemblage d'unités de PilA constitue le corps du pilus, une structure très longue ($> 1\mu\text{m}$), creuse, d'environ 5 nm de diamètre. Sa polymérisation est dirigée vers l'extérieur de la cellule et traverse la membrane externe *via* la sécrétine PilQ. Une ATPase, PilB, énergiise le système. Elle a un rôle important car il a été démontré que le pilus de type IV est capable de s'assembler et de se désassembler (Nunn *et al.*, 1990 ; Mattick *et al.*, 1996 ; Hahn, 1997 ; Russel, 1998 ; Wall & Kaiser, 1999).

1.3 Le système de sécrétion de type V (SST5)

Le système de sécrétion de type V a été décrit pour la première fois chez la bactérie *Neisseria gonorrhoeae*. Il représente le modèle schématisé en figure 2.1 (Kostakioti *et al.*,

2005). C'est par ce système que la bactérie exporte la protéase IgA1. Un autre membre bien connu de cette famille de transporteur est l'adhésine YadA des souches *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* (Gerlach & Hensel, 2007). Ce système comprend plusieurs voies de sécrétion : les systèmes de sécrétion de type Va et Vb.

Les protéines sécrétées par le système de sécrétion de type Va sont des protéines auto-transportrices (Figure 2.4 a). Elles sont constituées de quatre domaines. Une région N terminale, qui est la séquence signal du système Sec et qui sera clivée après transport dans le périplasma. Le domaine C terminal (ou transporteur), va alors former une structure en tonneau β qui permettra la traversée de la membrane externe du domaine passager. Celui-ci est relié par un domaine de liaison au transporteur et a une fonction d'effecteur. Une fois dans le milieu extracellulaire, il sera ou non coupé par hydrolyse. C'est donc un système qui ne requiert pas d'apport d'énergie pour son fonctionnement (Henderson *et al.*, 2004 ; Kostakioti *et al.*, 2005 ; Gerlach & Hensel, 2007).

Chez *P. aeruginosa*, l'estérase A pourrait être une molécule auto-transportrice (Ma *et al.*, 2003) et aucun système similaire n'a été décrit chez *Y. pestis*.

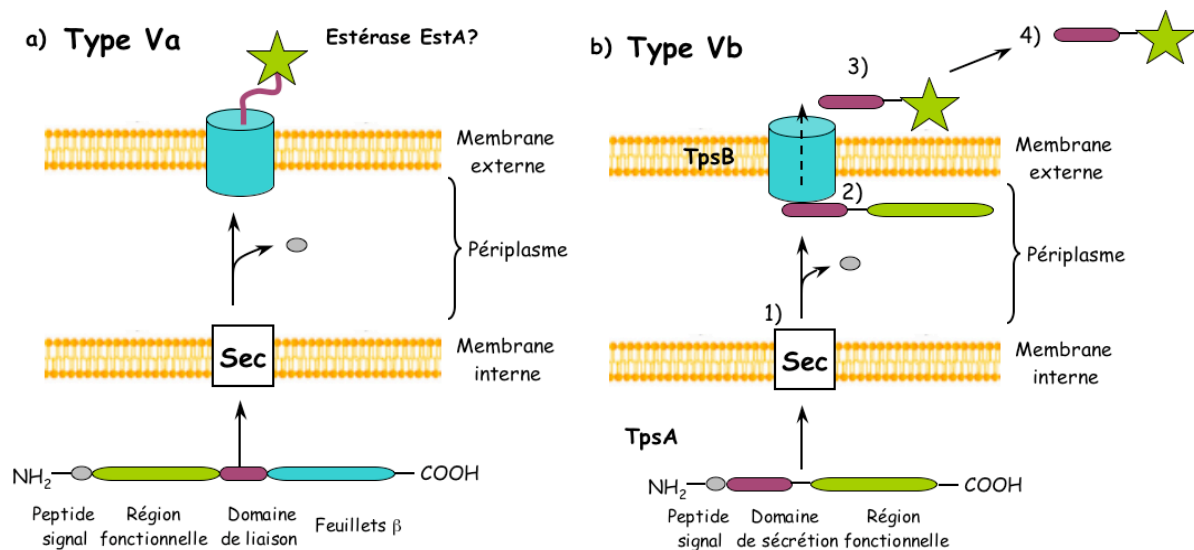


Figure 2.4 : Représentations des SST5 de type a et b de *P. aeruginosa*.

Le système de sécrétion de type Vb est appelé TPS pour "Two Partners System" ou système à deux partenaires (Figure 2.4 b) (Henderson *et al.*, 2004). En effet, dans ce cas, la sécrétion requiert la présence de deux protéines. Les gènes codant pour les deux partenaires sont en général organisés en opéron ou situés dans un même locus. La protéine transporteur TpsB et l'exoprotéine TpsA sont sécrétées dans le périplasma par le biais du système Sec (Figure 2.4 b, étape 1). Puis, le transporteur TpsB forme une

structure en tonneau β dans la membrane bactérienne externe et reconnaît son exoprotéine spécifique grâce au domaine de sécrétion porté par cette dernière (étape 2). Celle-ci est sécrétée à la surface cellulaire où elle va se replier au fur et à mesure de sa sortie (étape 3). Avant d'être fonctionnelle, elle subit souvent une dernière étape de maturation réalisée par des protéases extracellulaires (étape 4). Ce système permet la sécrétion de grosses protéines dont le poids moléculaire est compris entre 100 et 500 kDa (Henderson *et al.*, 2004).

P. aeruginosa comprend 5 systèmes de ce type dont les exoprotéines putatives auraient des fonctions dans l'haemagglutination ou seraient des adhésines (Ma *et al.*, 2003). Des séquences codant pour des systèmes de type Vb putatifs ont aussi été mis en évidence dans le génome de *Y. pestis* (Henderson *et al.*, 2004).

1.4 Les voies chaperone/usher

La voie chaperone/usher est dédiée à la sécrétion de structures de type pili (adhésines fimbriales) et de structures amorphes capsulaires (adhésines non fimbriales) (Kostakioti *et al.*, 2005). Ce sont des structures qui permettent à la bactérie d'adhérer aux cellules et aux surfaces abiotiques. L'adhérence aux cellules est possible *via* une liaison adhésine (retrouvé en surface du pili) et son récepteur spécifique sur la cellule. Les liaisons aux surfaces abiotiques se font grâce à une augmentation de l'hydrophobicité de la membrane bactérienne au niveau de l'implantation des adhésines. Un des modèles le mieux étudié est celui de l'assemblage du pilus de type 1 d'*E. coli* (Fim) présenté en figure 2.1.

Les sous unités formant ces structures (FimA) sont transportées par le système Sec dans le périplasme où elles sont prises en charge par une chaperone (FimC). Celle-ci permet d'empêcher la polymérisation prématurée de l'appendice dans le périplasme. Elle interagit avec la sous-unité par un phénomène d'échange de brin (un brin β de la chaperone est inséré dans une poche hydrophobe de la sous-unité) et la maintient dans une conformation à forte énergie libre. Elle la dirige vers l'unité usher, la sécrétine FimD, qui permet le transport à travers la membrane externe. C'est une protéine membranaire intégrale, qui sert de plateforme d'assemblage et qui maintient le pilus en formation sur la cellule. Là, une nouvelle molécule va interagir avec une autre sous-unité par échange de brin (le brin β de la chaperone est remplacé par le domaine N terminal de la sous unité suivante), ce qui va l'emmener dans un état énergétique plus faible. Cette différence d'énergie entre les deux états est la force qui permet la

formation de la fibre et sa sécrétion (Kostakioti *et al.*, 2005 ; Gerlach & Hensel, 2007 ; Remaut & Waksman, 2004).

Récemment, la résolution de la structure d'un complexe entre la sécrétine FimD, en association avec la chaperone FimC et les adhésines FimH, FimG, et FimF (qui sont situées au sommet du pilus formé par FimA) en cours d'extraction du système, a pu être réalisée par cryomicroscopie. FimD dimérise et forme deux pores transmembranaires dont seul l'un d'entre eux permet la sécrétion du pilus. Il a été proposé que le second pore permettrait le recrutement des sous-unités qui vont polymériser en association avec leur chaperone dans l'espace périplasmique (Remaut *et al.*, 2008). Les deux pores fonctionnent en alternance dans le recrutement.

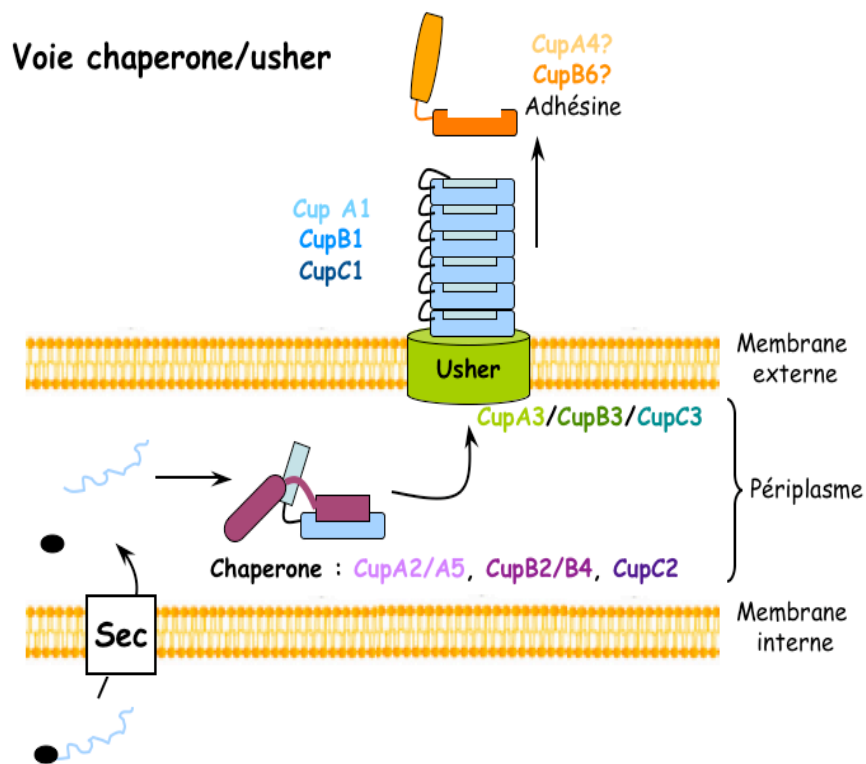


Figure 2.5 : Schéma représentant la voie chaperone/usher de *P. aeruginosa*. Représentation des trois systèmes permettant l'assemblage des fimbriae par la voie chaperone/usher. Sont indiqués du plus clair au plus foncé les systèmes CupA, CupB et CupC. Comme décrit pour le pilus de type 1 d'*E. coli*, les voies de *P. aeruginosa* ont une ou plusieurs chaperones intrapériplasmique (CupA2/A5, CupB2/B4 et CupC2) qui prennent en charge les unités formant le pili (CupA1, CupB1 et CupC1) en les empêchant de polymériser et en les dirigeant vers la protéine transmembranaire usher (CupA3, CupB3 et CupC3).

Trois systèmes de ce type ont été mis en évidence chez *P. aeruginosa*, qui sont codés au niveau de cluster de gènes nommés *cup* (chaperon usher pathway). Ils codent pour des

fimbriae de type CupA, CupB et CupC (Figure 2.5) qui ont un rôle important dans la formation de biofilms (Vallet *et al.*, 2001). Ces systèmes forment des fibres à la surface de la bactérie constituées d'homopolymères de CupC1 pour le système *cupC* et d'hétéropolymères de CupB1 et de l'adhésine CupB6 pour le système *cupB*. Ces assemblages sont spécifiques de chacun des systèmes (Ruer *et al.*, 2007).

L'antigène F1 de *Y. pestis* est une structure capsulaire amorphe synthétisée aussi par une voie chaperone/usher. Ces structures contiennent une ou deux sous-unités CafI et n'ont pas d'unité de type adhésine mais présentent elles-mêmes cette propriété. Le complexe unité CafI et sa chaperone CafIM, ainsi que le complexe intermédiaire CafI/CafI/CafIM ont été cristallisés et ces structures ont permis de bien comprendre le mécanisme d'échange de brins (Zavialov *et al.*, 2003).

2. Les systèmes Sec indépendants

Ce sont des systèmes permettant la sécrétion directe des substrats du cytoplasme bactérien vers le milieu externe sans arrêt par le périplasme.

Le système de sécrétion de type III fait partie de cette catégorie de transporteur mais il fera l'objet d'une présentation détaillée dans le chapitre 3.

2.1 Le système de sécrétion de type I (SST1)

Il est formé d'un transporteur ABC (ATP-Binding Cassette) inséré dans la membrane interne et couplé à une protéine adaptatrice reliant ce transporteur au troisième composant qui est une protéine de la membrane externe (Kostakioti *et al.*, 2005 ; Gerlach & Hensel, 2007 ; Remaut & Waksman, 2004).

Le modèle le mieux connu est le système de sécrétion de type I d'*E. coli*, permettant le transport de l' α -hémolysine. L'ABC transporteur HlyB, est relié à la protéine de la membrane externe, TolC, par la protéine adaptatrice HlyD qui forme un canal traversant le périplasme (Figure 2.1). L'ABC transporteur forme un homodimère qui reconnaît spécifiquement le substrat et par hydrolyse d'ATP, il apporte l'énergie nécessaire au fonctionnement du système. La protéine TolC passe d'une conformation fermée à une conformation ouverte lors du recrutement du substrat. L'ouverture est réalisée grâce à un réarrangement de l'organisation des hélices α de cette protéine

(Remaut & Waksman, 2004 ; Koronakis *et al.*, 2004 ; Kostakioti *et al.*, 2005 ; Gerlach & Hensel, 2007).

Les substrats de ce système (HylA pour le système *E. coli*) sont des toxines de haut poids moléculaire qui, pour la plupart, présentent une séquence signal non clivable en C terminal.

Quatre transporteurs ABC ont été mis en évidence chez *P. aeruginosa* (Figure 2.6).

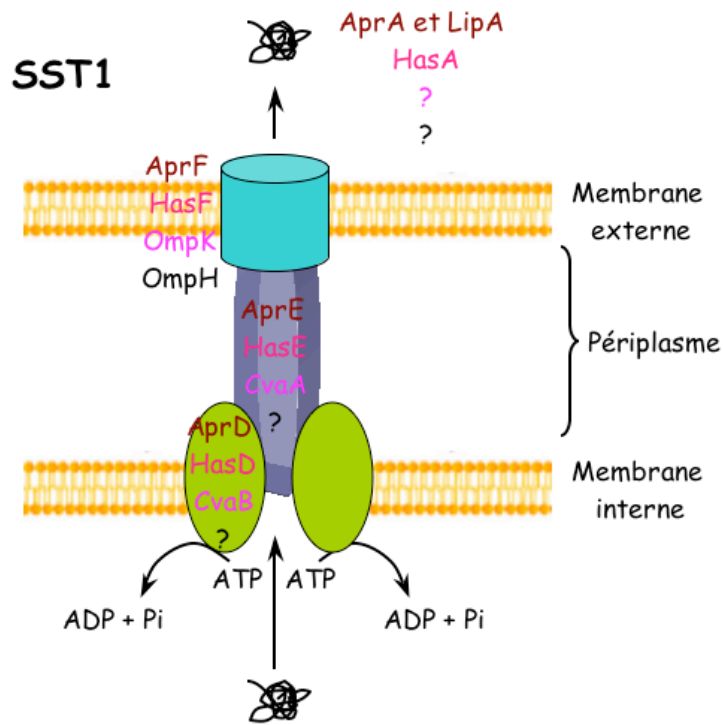


Figure 2.6 : Schéma représentant le SST1 de *P. aeruginosa*.

Les quatre transporteurs de type I sont schématisés avec les données connues pour chacun. Les protéines constitutives de chaque SST1 sont annotées par une couleur différente.

Le système Apr permet la sécrétion de la protéase alcaline AprA et de la lipase LipA. Le transporteur ABC est constitué de la protéine AprD, l'adaptateur est AprE et la protéine membranaire, AprF. Le système HasDEF sécrète la protéine HasA qui a la capacité d'acquérir des ions des hèmes des hémoglobulines. Le troisième système est CvaBA-OmpK dont le substrat n'est pas connu et le dernier système n'est que putatif et n'a pas encore été caractérisé (Ma *et al.*, 2003).

2.2 Le système de sécrétion de type IV (SST4)

Le système de sécrétion de type IV permet de transloquer des complexes protéiques ainsi que de l'ADN simple brin. Ce type de machinerie dérive des systèmes de conjugaison bactériens. Le système modèle est celui du transfert de l'ADN-T d'*Agrobacterium tumefaciens* qui peut transporter des complexes nucléoprotéiques dans le cytoplasme des cellules végétales. Il semble différer en cela des SST4 des pathogènes humains et animaux, qui eux ne peuvent transloquer que des protéines. C'est le cas de la toxine pertussique (*Bordetella pertussis*), sécrétée dans le milieu extracellulaire, ou de la cytotoxine CagA (*Helicobacter pylori*) transloquée dans le cytoplasme cellulaire. Cette voie de sécrétion joue aussi un rôle important dans la survie des bactéries intracellulaires dans les vacuoles de phagocytose (*Brucella suis* et *Legionella pneumophila*).

L'appareil de sécrétion de type IV d'*A. tumefaciens* (Figure 2.1) est formé de :

- 3 ATPases cytoplasmiques fournissant l'énergie au système (VirB4, VirB11 et VirD4),
- les composants VirB6 à VirB10 formant le corps du système et localisés entre les deux membranes cytoplasmiques,
- un appendice extracellulaire : le pili formé de la sous-unité majeure VirB2 et des sous-unités mineures VirB5 et VirB7.

Deux modèles de sécrétion ont été proposés : une sécrétion des substrats *via* le canal formé par le pilus. Le second modèle propose un transport *via* un pilus rétractable qui pousserait le substrat à travers le complexe ancré dans la membrane externe lors de son élongation. Ce modèle a été validé notamment pour la sécrétion de la toxine pertussique (Kostakioti *et al.*, 2005 ; Gerlach & Hensel, 2007 ; Remaut & Waksman, 2004).

3. Le système de sécrétion de type VI (SST6)

Un îlot de pathogénicité, IAH (IcmF-Associated Homologous Protein), présent chez de nombreuses bactéries pathogènes à Gram négatif, a été mis en évidence par criblage de génomes. L'étude de cet îlot a permis de mettre à jour un nouveau système de sécrétion chez *V. cholerae* (Pukatzki *et al.*, 2006) et ensuite chez *P. aeruginosa* (Mougous *et al.*, 2006). Ce système permet la sécrétion de plusieurs facteurs dans le milieu extracellulaire.

Chez *V. cholerae*, il a été montré que ce SST6 est nécessaire à l'infection de cellules en modèle *Dictyostelium discoideum* (Pukatzki *et al.*, 2006). De plus, quatre protéines ont pu être identifiées comme étant sécrétées : VgrG1, VgrG2, VgrG3 et Hcp. Un domaine en N terminal de VgrG1 est transféré dans les cellules hôtes où il est capable d'atteindre son substrat, l'actine. Les protéines VgrG, dont des homologues sont présents chez de nombreuses espèces, ont été étudiées par prédiction de structure. Elles présentent des homologies avec les protéines qui forment les pointes des queues de bactériophages. Elles sont de plus capables de s'assembler en structures hétéromériques qui pourraient former un appareil de sécrétion ou de translocation (Pukatzki *et al.*, 2007).

Chez *P. aeruginosa*, trois loci de ce type ont été identifiés et nommés HSI (Hcp Secretion Island). HSI-I est actif dans un modèle d'infection chronique des poumons (Figure 2.7). Ce locus code pour une protéine Hcp qui est sécrétée et qui semble jouer un rôle dans les infections : elle est retrouvée dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose infectés de longue date. Cette protéine est capable de s'assembler en hexamères et pourrait former un canal permettant le passage d'autres molécules (Mougous *et al.*, 2006). Le locus HSI-I code également pour une protéine ClpV1 qui fait partie du corps de ce SST6, et qui appartient à la famille des ATPases AAA+. Elle pourrait donc être le facteur apportant l'énergie au système (Mougous *et al.*, 2006). D'autres partenaires ont été décrits : la kinase PpkA et une phosphatase PppA qui ont un substrat commun, FhaI. Ces deux protéines pourraient réguler l'activation du système selon un modèle proposé par les auteurs. Un signal environnemental inconnu conduirait à l'activation de PpkA par autophosphorylation conduisant au recrutement de FhaI. Cette liaison conduirait à sa phosphorylation et, lorsque le niveau de FhaI phosphorylé est suffisant, ceci entraînerait l'activation de la sécrétion par le SST6 (notamment de Hcp1). PppA quant à lui permettrait d'inactiver le système par déphosphorylation de FhaI (Mougous *et al.*, 2007) (Figure 2.7).

Peu de choses sont connues à ce jour de ce système mais il semble impliqué dans l'infection par *P. aeruginosa* de patients atteints de la mucoviscidose ce qui confère un enjeu thérapeutique à son étude. De plus la conservation de ce locus dans de nombreuses autres bactéries pathogènes (10 espèces au moins dont *Y. pestis*) suggère un rôle important dans l'interaction hôte-pathogène (Mougous *et al.*, 2006 ; Mougous *et al.*, 2007).

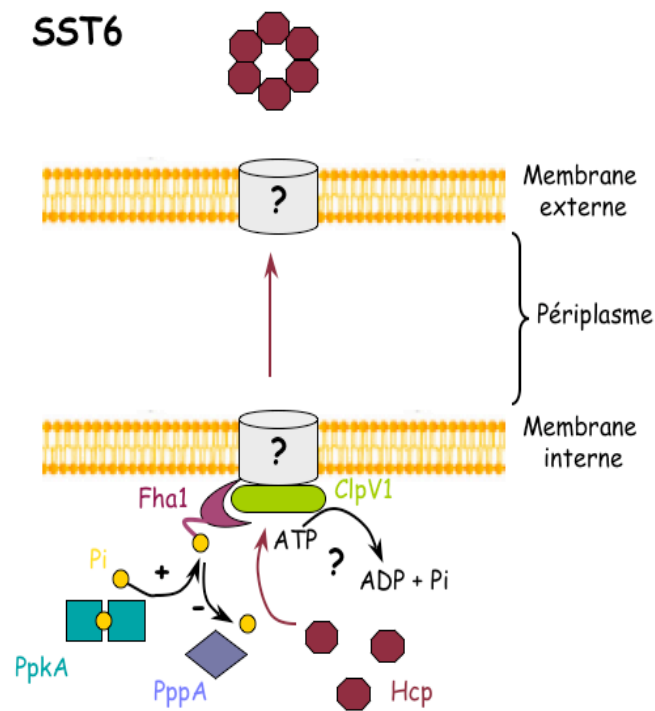


Figure 2.7 : Modèle hypothétique du SST6 de *P. aeruginosa*.

Les données connues actuellement sur ce SST6 sont synthétisées sur ce schéma. Les structures représentées en gris, sont inconnues et leur localisation est hypothétique.

4. Conclusion sur les systèmes de sécrétion

Les bactéries à gram négatif ont développé un large éventail d'appareils permettant l'export de substrats variés à travers leur double membrane. Tous les systèmes sont plus ou moins fortement impliqués dans la virulence de la bactérie car un grand nombre de facteurs de virulence sont sécrétés par ces voies. Parmi les systèmes développés, les systèmes de sécrétion de type III et IV sont particulièrement élaborés. Ils sont constitués d'une base ancrée dans la membrane bactérienne et d'une structure érigée à la surface de la cellule. Ils permettent la sécrétion de leurs effecteurs (ADN-T et exoprotéines) directement dans le cytoplasme de la cellule hôte.

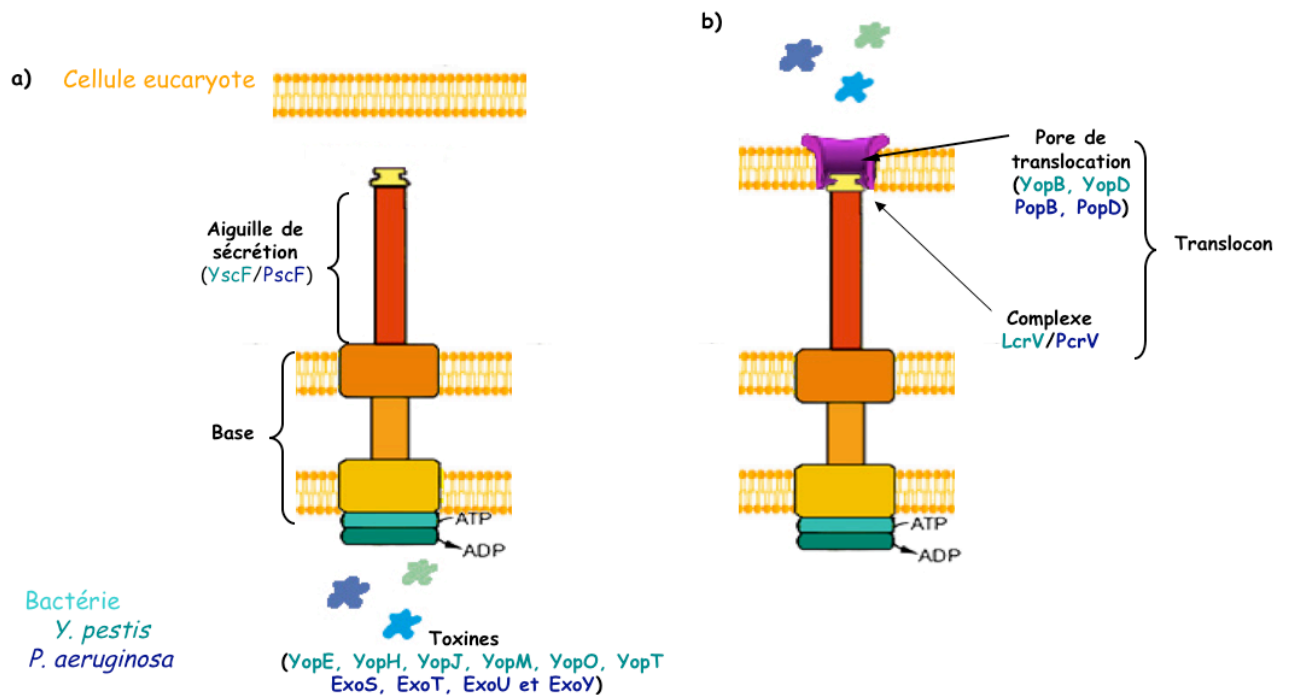


Figure 3.1 : Représentation schématique du SST3 de *Y. pestis* et de *P. aeruginosa*.

a) Le SST3, structure multimérique, est composé d'une base ancrée dans les deux membranes bactériennes. L'aiguille, structure pointant à l'extérieur de la bactérie, prolonge la base et forme le canal de sécrétion qui est surplombé par un complexe de la protéine LcrV/PcrV. b) Lors de l'infection la pointe de l'aiguille permet l'insertion d'un pore de translocation fonctionnel. Le système est alors capable d'injecter des toxines directement du cytoplasme bactérien au cytoplasme de la cellule eucaryote infectée.

Chapitre 3

Le système de sécrétion de type III (SST3)

Dans ce chapitre, le SST3 est présenté plus particulièrement car les protéines étudiées au cours de cette thèse font partie intégrante de ce système. Pour une meilleure compréhension des informations qui suivent, la figure 3.1 représente un schéma global de la structure du SST3 de la famille Ysc, dont font partie les SST3 de *P. aeruginosa* et de *Y. pestis*.

1. Origine et évolutions du SST3

Le SST3 est un système ancien, acquis certainement après l'apparition des premiers eucaryotes. Il a un ancêtre commun avec le flagelle et il a évolué au cours de nombreux transferts de gènes horizontaux (Gophna *et al.*, 2003).

1.1 Le flagelle et le SST3

Les nombreuses homologues de séquences protéiques ainsi que la conservation fonctionnelle entre les composants du SST3 et du flagelle sont dus à une origine commune des deux systèmes (Blocker *et al.*, 2003). Ils partagent un appareil de sécrétion et un mécanisme d'assemblage similaires. Le SST3 a une fonction de sécrétion d'effecteurs tandis que le flagelle est nécessaire à la mobilité des bactéries. Néanmoins le flagelle, dans certains cas, présente aussi une fonction de sécrétion qui est dépendante de la base et du crochet mais non pas du filament. Par exemple, il est capable de sécréter des protéines effectrices qui ont été nommées les Fops (Flagellar Outer Proteins). *Y. enterocolitica* sécrète dépendamment de la base et du crochet du flagelle un grand nombre de Fops dont une a pu être identifiée. Il s'agit d'YplA qui possède une activité phospholipase (Young *et al.*, 1999).

Des études ont par contre montré que les composants du flagelle sont regroupés sur une branche phylogénétique distincte de leurs homologues du SST3 (Gophna *et al.*, 2003). Par conséquent, il n'y a pas eu d'échanges entre ces deux systèmes depuis qu'ils ont divergé de leur ancêtre commun.

Environ dix protéines de l'injectisome du SST3 présentent une forte similitude au niveau de leur séquence protéique ou de la prédiction des domaines

transmembranaires avec des composants du flagelle (Tableau 1). Cette homologie concerne les protéines formant la base du SST3, ancrées dans les deux membranes bactériennes et traversant le périplasma, mais aussi des protéines annexes comme l'ATPase (Figure 3.2 et Tableau 1) (Blocker *et al.*, 2003 ; Yip and Strynadka, 2006). Une similitude avec les protéines formant le crochet du flagelle et les unités polymérisant pour former l'aiguille du SST3 est aussi proposée (Blocker *et al.*, 2003 ; Yip and Strynadka, 2006).

En plus des homologies de séquence et de fonction, l'observation par microscopie électronique de la base du SST3 chez *S. typhimurium* puis chez *S. flexneri* a révélé que celle-ci ressemble à la base du flagelle, de par son organisation en anneaux superposés et son insertion au sein de la membrane interne, du peptidoglycane et du périplasma (Kubori *et al.*, 1998 ; Blocker *et al.*, 2001). Ces structures basales sont de plus traversées par un cylindre interne creux de 2 à 3 nm de diamètre, canal qui existe aussi à l'intérieur du flagelle (Blocker *et al.*, 2001).

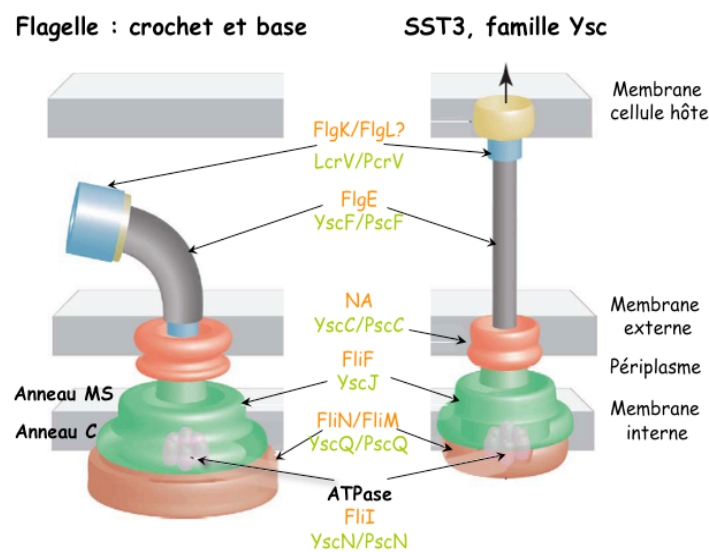


Figure 3.2 : Représentation schématique du flagelle bactérien et du SST3 de la famille Ysc (d'après Yip and Strynadka, 2006).

Les unités du flagelle (orange) qui sont homologues aux unités du SST3 de *Y. pestis* et de *P. aeruginosa* (vert) sont annotées sur ce schéma. NA signifie Non Attribué.

Ces deux structures possèdent une architecture similaire avec, au niveau de la base, trois anneaux, ancrés dans la membrane interne (vert et marron) et dans la membrane externe (rouge) de la bactérie. Une ATPase (rose) localisée dans le cytoplasme bactérien fait partie intégrante de cette base. Une structure hélicoïdale (gris), l'aiguille pour le SST3 et le crochet pour le flagelle, ont des paramètres structuraux similaires. Le SST3 est équipé d'une plateforme (bleue) surplombée par un pore de translocation qui s'insère dans la membrane cellulaire hôte (jaune). Le flagelle, quant à lui, forme un filament après le crochet composé de la protéine FliC.

	FLAGELLE	FAMILLE Ysc		FAMILLE SsA-Esc	FAMILLE Inv-Mxi-Spa	
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>Y. pestis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. flexneri</i>
BASE						
ATPase	FliI	PscN	YscN	EscN	InvC/SpaL	Spa47
Complexe (CY)	FliN/FliM	PscQ	YscQ	EscQ	InvK/SpaO	Spa33
Anneau (MI)	FliP	PscR	YscR	EscR	InvL/SpaP	Spa24
Anneau (MI)	FliQ	PscS	YscS	EscS	SpaQ	Spa9
Anneau (MI)	FliR	PscT	YscT	EscT	InvN/SpaR	Spa29
Anneau (MI)	FlhB	PscU	YscU	EscU	SpaS	Spa40
Anneau (MI)	FlhA	PscV	YscV	EscV	InvA	MxiA
Lipoprotéine (PE)	FliF	PscJ	YscJ	EscJ	PrgK	MxiJ
Anneau (ME)	∅	PscC	YscC	EscC	InvG	MxiD
AIGUILLE	FlgE ?	PscF (PscE, PscG)	YscF (YscE, YscG)	EscF	PrgI (PrgJ)	MxiH (MxiI)
REGLE MOLECULAIRE	FliK	PscP	YscP		InvJ	Spa32
TRANSLOCON		PopB/ PopD (PcrH) PcrV (PcrG)	YopB/ YopD (LcrH) LcrV (LcrG)	EspB/ EspD EspA (CesA)	SipB/ SipC SipD	IpaB/ IpaC (IpgC) IpaD
EFFECTEURS		ExoS, ExoT, ExoU, ExoY	YopE (SycE) YopH, YopJ, YopM, YopO, YopT	Tir (CesT) EspF	SptP (SicP), SopE, SipA, SipC, SopB, SigD, AvrA, SipB, SspH1, SspH2, SlrP, SipC, SseF, SseG	IpaC, IpaB, IpaH9.8, IpaH7, IpaH 65.4kDa

Tableau 1 : Protéines orthologues des systèmes de sécrétion de type III des familles Ysc (*P. aeruginosa* et *Y. pestis*), SsA-Esc (*E. coli*), Inv-Mxi-Spa (STI-1 de *S. typhimurium* et *S. flexneri*). CY : Complexe cytoplasmique, MI : Membrane Interne, ME : Membrane Externe, PE : Périplasme. Les unités formant la base, représentées en grisé, sont très conservées et homologues aux protéines du flagelle. Les effecteurs, représentés en violet sont variables. Les chaperones qui seront citées dans le texte sont indiquées entre parenthèse.

1.2 Conservation et variabilité du SST3

Le SST3 est présent chez de nombreuses bactéries à gram négatif. Il est retrouvé chez les pathogènes humains, animaux mais aussi chez les pathogènes de plantes ou les bactéries symbiotiques. Il a des fonctions diverses selon sa famille d'appartenance et selon les effecteurs codés. Il est capable d'induire l'internalisation de bactéries par les cellules de mammifères (SPI-1 de *Salmonella* et *Shigella*), d'induire l'apoptose des macrophages ou la mort d'autres cellules (*Yersinia* spp. et *P. aeruginosa*), de former des pores dans les cellules de plantes, de provoquer des réponses d'hypersensibilité (*P. syringae*, *Erwinia* spp., *Xanthomonas*) et de créer des relations symbiotiques (*Rhizobium* spp., *P. fluorescens*) (Pallen *et al.*, 2005).

Les SST3 sont codés par des régions génétiques instables comme les îlots de pathogénicité (SPI-1 de *Shigella* et *Salmonella*) ou des plasmides (pCD1 de *Y. pestis*). Ce sont des éléments qui ont été acquis par transfert de gènes horizontal et leur évolution a été réalisée grâce à une accumulation de transferts multiples.

Les sous unités formant la base du système sont assez conservées (Tableau 1), quelle que soit la famille de SST3. Par contre, chaque organisme ayant un SST3 sécrète un nombre variable d'effecteurs (jusqu'à six ou sept toxines) qui lui sont propres (voir par exemple, le tableau 1). Ainsi, à ce jour, environ une centaine d'effecteurs ont été mis en évidence dont la fonction de certains n'est pas encore connue. Certaines activités sont tout de même communément retrouvées dans les familles de SST3, et d'autres même entre les différentes familles (par exemple les activités cystéine protéase, activateur de GTPases, phospholipase, adénylate cyclase...) (Pallen *et al.*, 2005). Aux vues de cette diversité, les effecteurs ne seront pas décrits davantage, la fonction putative ou déterminée des effecteurs de *P. aeruginosa* et de *Y. pestis* ayant été décrite dans le chapitre 1 (paragraphe 1.2 et 2.2). Le point commun entre tous les effecteurs est leur translocation dans les cellules hôtes. Ce phénomène a pu être mis en évidence par différents systèmes rapporteurs ne fonctionnant que dans l'environnement du cytoplasme eucaryote (Sory *et al.*, 1994 ; Rosqvist *et al.*, 1994 ; Day *et al.*, 2003).

Les arbres phylogénétiques effectués par l'analyse de plusieurs composants de l'injectisome (base et aiguille du SST3) ont conduit à l'identification de sept familles (Troisfontaines and Cornelis, 2005).

- La **famille Ysc** (Yop secretion)

L'archétype de cette famille est le SST3 de *Yersinia* spp. codé par son plasmide de virulence pYV/pCD1. Elle comporte notamment les SST3 de *P. aeruginosa* (Psc) et d'*Aeromonas* spp. (Asc). Ce SST3 a la structure globale que nous avons présentée en début de chapitre (Figure 3.1 et Figure 3.3). Il permet aux bactéries d'échapper au système immunitaire en provoquant la mort des cellules immunitaires et l'inhibition de la phagocytose, et il provoque des réactions inflammatoires sur les sites d'infection.

- La **famille Inv-Mxi-Spa**

Elle comporte le SST3 Inv-Spa de *S. enterica*, et Inv-Mxi de *Shigella* spp.. Pour *S. enterica*, ce système est codé par un îlot de pathogénicité 1 (SPI-1). De nouveaux membres de cette famille incluent les SST3 Ysa de *Y. enterocolitica* (Inv-Spa), d'*E. coli* (Eiv-Epa), de *Burkholderia* spp. (Inv-Spa), par exemples. Sa structure est similaire au SST3 de la famille Ysc (Figure 3.3). Les représentants de cette famille l'utilisent pour activer leur entrée dans les cellules, en particulier les cellules non phagocytaires.

- La famille **SscA-Esc**

L'archétype de cette famille est le SST3 de type Esc d'EPEC et EHEC. Il leur permet d'adhérer aux entérocytes et d'effacer les microvilli, puis de rentrer dans les cellules et d'y survivre. Cette famille comporte aussi le second SST3 de *S. enterica*, codé par l'îlot de pathogénicité SPI-2 et appelé SscA. Il lui permet la mise en place de la seconde partie de son infection : la survie dans les macrophages en empêchant le trafic des endosomes et la maturation du phagosome.

Les *Yersinia* spp. portent les gènes codant pour ce même système, mais, du moins dans *Y. pestis*, il n'est pas fonctionnel. La structure de ces SST3 est un peu différente de celle des familles précédentes. L'aiguille est dans ce cas prolongée d'un long filament flexible (formé de l'unité EspA pour *E. coli*) (Figure 3.3).

- Les **familles Hrc-Hrp1 et Hrc-Hrp2**

Les SST3 des pathogènes de plantes (*P. syringae* par exemple) sont groupés au sein de ces deux familles. Ils se caractérisent par un injectisome bien conservé arborant un long pilus flexible au lieu d'une aiguille ce qui permet à ces bactéries de transpercer les parois végétales (environ 200 nm de long) et d'atteindre les cellules pour injecter leurs toxines (Figure 3.3). La diversité et le nombre d'effecteurs de ces systèmes sont très importants ce qui dériverait de la spécification de chaque espèce bactérienne pour l'infection d'une espèce de plante.

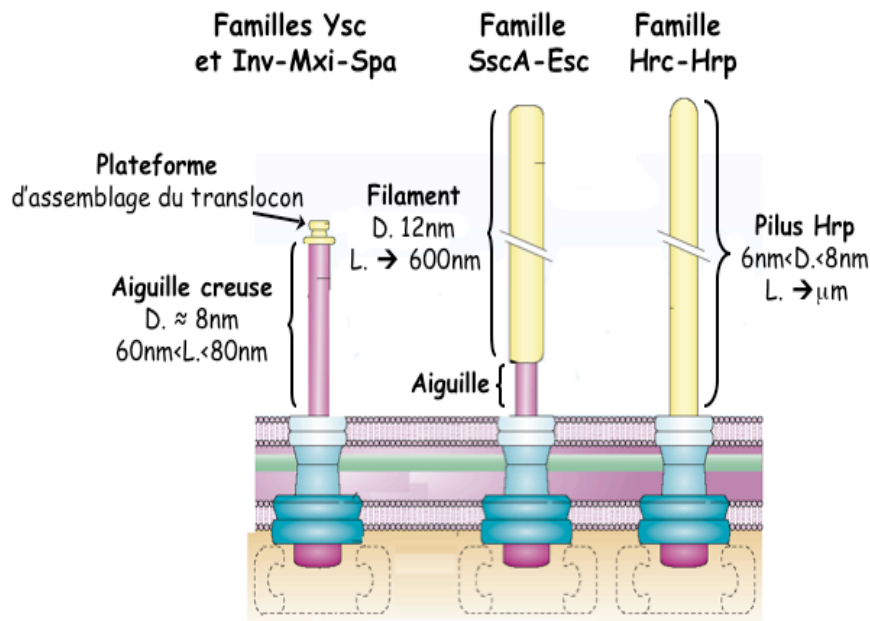


Figure 3.3 : Schéma représentant la structure des SST3 des 4 principales familles (D'après Cornelis, 2006).

L'aiguille est creuse, de longueur bien définie et surmontée d'une plateforme pour l'assemblage du translocon dans le cas des injectisomes des familles Ysc et Inv-Mxi-Spa. L'aiguille est très courte et surmontée d'un long filament flexible pour les injectisomes de la famille SscA-Esc. Les injectisomes des pathogènes de plante (Hrc-Hrp) n'ont pas d'aiguille mais un long pilus. D. : diamètre, L. : longueur.

- La **famille des *rhizobiae***

Les membres de cette famille sont des bactéries symbiotiques (*Rhizobium* spp.) qui, après infection des racines des légumineuses et grâce au SST3, entraînent la formation de nodules où elles vont réduire l'azote.

- La **famille des *chlamydiae***

Les *chlamydiae* sont des pathogènes intracellulaires stricts qui pénètrent dans les cellules sous une forme inactive. Dans la cellule, ils deviennent actifs et dépendants du métabolisme cellulaire. Ils vivent dans une vacuole qui a subi des transformations. Leur SST3, connu depuis peu, est impliqué dans le maintien d'un état permissif des cellules.

2. Description de l'injectisome

L'injectisome est un système complexe constitué de plus de 25 protéines différentes qui s'assemblent en une base ancrée dans les membranes bactériennes, et une aiguille qui la surplombe (Figure 3.4) (Cornelis, 2006). Il a été montré récemment qu'une partie du translocon est lui aussi présent au sommet de l'injectisome et formerait une plateforme

pour l'insertion du pore de translocation dans les membranes des cellules eucaryotes. Le translocon, composé de cette plateforme, et des protéines formant le pore dans les membranes des cellules hôtes, sera présenté dans le chapitre 4.

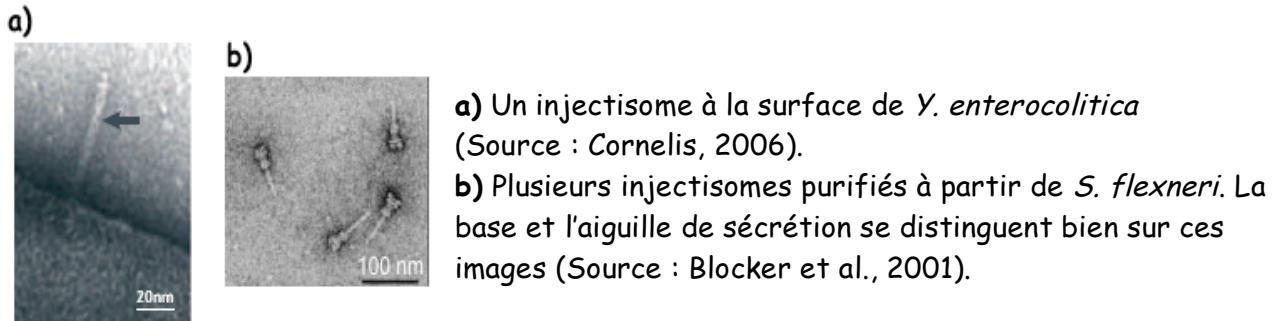


Figure 3.4 : Photos de microscopie électronique injectisomes.

2.1 La base du SST3

2.1.1 Description de la structure

La base de l'injectisome est constituée de deux ensembles d'anneaux ancrés dans la double membrane bactérienne ainsi que d'un cylindre creux qui traverse le périplasme.

Les injectisomes de *S. flexneri* et d'EPEC ont été purifiés (Blocker *et al.*, 2001), (Sekiya *et al.*, 2001). Chez les EPEC, celui-ci est constitué d'un corps basal d'environ 310 Å de haut. Ce dernier est composé de deux anneaux ancrés dans la membrane interne et de deux anneaux dans la membrane externe de 180 et 160 Å de diamètre, respectivement. Elle est surmontée d'une structure, faisant le lien entre la base et l'aiguille, constituée par la polymérisation d'une seule protéine, EscF. Celle-ci est elle-même surmontée d'un long filament composé de la protéine EspA (Sekiya *et al.*, 2001). Chez *S. flexneri*, l'observation en cryo-microscopie d'injectisomes a conduit à la résolution à 17 Å de ces structures en faisant la moyenne de projections d'images en 2D (Figure 3.5 a et b) (Blocker *et al.*, 2001). Pour la reconstitution en trois dimensions, une symétrie cylindrique a été appliquée en se basant sur l'homologie entre la base du flagelle et celle du SST3. L'injectisome comprend une base, un anneau double dans la membrane externe et l'aiguille qui entre dans la structure qui traverse les membranes jusqu'à la partie supérieure de la base (Figure 3.5 c et d). Un canal creux d'environ 2 à 3 nm de diamètre la traverse de tout son long. L'analyse par séquençage N terminal a permis de déterminer que les anneaux de la membrane externe sont constitués de

MxiD, une protéine faisant partie de la famille des sécrétines. Il est à noter que la symétrie des sécrétines est de 10 ou de 12 et qu'elles s'organisent en deux anneaux superposés, ce qui pourrait aussi être le cas des deux anneaux de MxiD. MxiJ et MxiG sont prédits comme étant des composés de membranes internes et les auteurs proposent qu'ils constituent la partie basse de la base. L'aiguille est composée de la protéine MxiH. Un mutant n'exprimant pas *mxiH* présente des injectisomes dépourvus d'aiguilles (Blocker *et al.*, 2001).

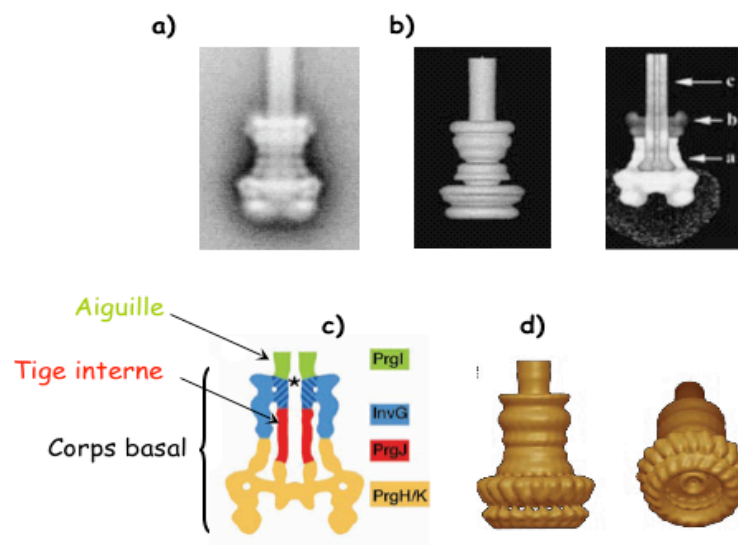


Figure 3.5 : Modélisation des bases du SST3 de *S. flexneri* (Blocker *et al.*, 2001) et de *S. typhimurium* (Source : Marlovits *et al.*, 2004).

Modélisation à partir des données de MET de la base du SST3 de *S. flexneri* (Blocker *et al.*, 2001).

a) Image bidimensionnelle moyenne d'injectisome après purification à une résolution de 17 Å. b) Représentation en trois dimensions de l'injectisome, basée sur une symétrie cylindrique. Les trois parties distinctes sont indiquées sur la représentation de droite : a = base, b = double anneau de la membrane externe, c = aiguille).

Modélisation à partir des données de cryomicroscopie de la base du SST3 de *S. typhimurium* (Marlovits *et al.*, 2004).

c) Composants de la base et de l'aiguille. d) Représentation tridimensionnelle, basée sur une symétrie rotationnelle de l'ordre de 20, à une résolution de 17 Å. La tige interne formée par la protéine PrgJ est creuse comme le montre la reconstitution à droite.

Après la purification et l'observation par microscopie électronique des injectisomes de *S. typhimurium* (Kubori *et al.*, 1998), un modèle tridimensionnel de cette base a été proposé à une résolution de 17 Å (Figure 3.5) (Marlovits *et al.*, 2004).

Elle apparaît comme une structure cylindrique de 300 Å de haut et 240 Å de large et comprend le corps basal, constitué de deux anneaux ancrés dans la membrane interne (PrgH et PrgK) et des deux anneaux de la membrane externe (InvG). Elle est creuse et est traversée par un canal central (d'environ 2,8 nm de diamètre) formé de la protéine PrgJ qui sert d'ancrage à l'aiguille, elle même constituée d'un assemblage de sous unités de PrgI. Mis à part PrgH toutes les autres protéines sont très conservées parmi les autres bactéries ayant un SST3. Le rôle de certains de leurs homologues a été déterminé comme étant similaire à celui des unités formant la base du SST3 de *S. typhimurium* (Blocker *et al.*, 2001 ; Sekiya *et al.*, 2001).

2.1.2 Assemblage du sécréton

Un modèle d'assemblage de l'injectisome de *S. typhimurium* a été proposé (Kubori *et al.*, 2000 ; Sukhan *et al.*, 2001). La première étape consiste en l'assemblage de la base. Toutes les protéines formant le corps basal sont dotées d'un peptide signal qui leur permettent d'être prises en charge par le système Sec pour leur transport dans le périplasme. Dans un premier temps, après sécrétion par le système Sec, les anneaux PrgH, PrgK se formeraient dans la membrane interne. La formation des anneaux InvG dans la membrane externe serait favorisée par la présence de la structure déjà en place. De plus, la lipoprotéine InvH, non essentielle à l'assemblage, stabiliserait la formation de cette structure. Il est proposé qu'une muramidase (IagB ?) jouerait aussi un rôle pour aider l'association entre les anneaux externes et internes du système en créant des trous dans la couche de peptidoglycane. La fin de l'assemblage de la base initierait le début de la polymérisation, de la tige interne PrgJ et de l'aiguille PrgI. Ce n'est qu'une fois l'injectisome complet assemblé que le système pourrait changer de spécificité et permettre la sécrétion des effecteurs.

Il faut noter que le système, une fois la base assemblée, devient compétent à la sécrétion et que celle-ci est hiérarchisée. Ce sont d'abord les protéines formant l'aiguille puis le translocon et enfin les effecteurs qui sont sécrétés. Ce phénomène dépendrait de plusieurs facteurs que nous allons présenter (règle moléculaire, chaperones et ATPase).

2.1.3 L'ATPase

Le processus d'assemblage de l'injectisome implique que les sous-unités formant l'aiguille sont polymérisées à partir de la base vers le sommet et passent donc, au même titre que les effecteurs, à travers le canal de sécrétion. Pour ceci, elles ont besoin d'énergie, mais aussi d'être partiellement dépliées pour passer à travers ce canal étroit. Ce rôle est rempli par une ATPase très conservée entre les systèmes mais aussi avec l'ATPase du flagelle (Tableau 1). Sa localisation, cytoplasmique et en interaction avec la membrane interne, a conduit à l'hypothèse que cette protéine serait à la base du SST3. Par exemple, l'ATPase du phytopathogène *P. syringae*, HrcN, a pu être isolée et purifiée à partir des membranes internes de cette bactérie (Muller *et al.*, 2006). Elle forme un dodécamère mis en évidence par cryo-microscopie à une résolution de 16 Å. Ce complexe s'assemble en deux anneaux hexamériques d'HrcN empilés face contre face. C'est une structure cylindrique qui présente un canal interne de 2 à 4 nm de diamètre qui est de taille similaire au diamètre du canal du SST3. Les auteurs proposent un modèle d'assemblage de ce complexe dans la base du SST3 dont la structure a été décrite chez *S. thyphimurium* (Figure 3.6). Le modèle tridimensionnel de HrcN s'ajuste parfaitement au sein de la base et le canal à l'intérieur de l'ATPase est en prolongement du canal de la tige interne et de l'aiguille.

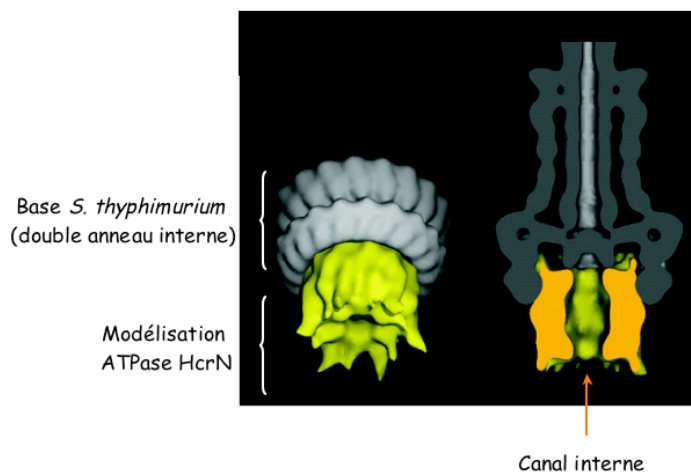


Figure 3.6 : Modélisation par cryomicroscopie de l'ATPase HrcN superposée au modèle tridimensionnel de la base de *S. thyphimurium*.

(Source : Muller *et al.*, 2006).

L'ATPase HrcN, représentée en vert, s'ajuste dans la cavité formée par les anneaux internes de la base de *S. thyphimurium* (gris).

Plusieurs rôles ont été proposés pour cette ATPase. Un modèle du processus de fonctionnement en trois étapes a été proposé : dans un premier temps, le complexe substrat/chaperone est lié à l'ATPase (Figure 3.7 a). Puis celle-ci va détacher le complexe et libérer la chaperone (Figure 3.7 b). Ensuite, l'ATPase déplierait le substrat et conduirait à sa sécrétion (Akeda and Galan, 2005 ; Galan, 2008) (Figure 3.7 c).

L'étude de l'ATPase InvC de *S. enterica* a permis d'observer que sa localisation est en périphérie du cytoplasme bactérien, en contact avec la membrane interne (Akeda and Galan, 2005). Les auteurs ont montré qu'InvC est capable de reconnaître les effecteurs du SST3 en association avec leur chaperone. Ceci a été démontré pour l'association avec le complexe effecteur SptP et sa chaperone SicP (Akeda and Galan, 2005). Cette interaction est indépendante de l'hydrolyse de l'ATP et elle se fait par un domaine d'association aux chaperones situé en C terminal de l'ATPase. Les chaperones présentent leur substrat déplié uniquement sur une petite région et l'ATPase le décroche et le déplie en entier. InvC, en présence d'ATP, est capable de libérer l'effecteur SptP de sa chaperone SicP. Puis elle est déplié l'effecteur ce qui a été mis en évidence par le suivi de la perte de l'activité enzymatique de SptP. Enfin, l'ATPase conduit à la sécrétion de l'effecteur déplié. En effet, si la partie N terminale de SptP est fusionnée à la GFP (green fluorescent protein) qui est une protéine très compacte, aucun dépliement de ce substrat n'est observé ce qui conduit à un défaut de sécrétion de la protéine de fusion (Akeda and Galan, 2005).

Le processus de sécrétion dépend aussi de la force protomotrice. En effet, il a été montré chez *Y. enterocolitica* que si la force protomotrice est inhibée, la sécrétion des Yops est abolie. Il en est de même pour le flagelle, qui, en absence de force protomotrice, en particulier de sa composante électrique, ne peut être assemblé (Koushik et al., 2008 ; Minamino et al., 2008).

Il est proposé que l'ATPase et la force protomotrice agissent en concert : la première cible les substrats au canal de sécrétion, les déplie et commence leur insertion dans le canal tandis que la seconde contribue à la conduite des substrats le long de l'aiguille jusqu'à la sortie dans le milieu extracellulaire (Figure 3.7) (Wilharm *et al.*, 2004 ; Galan, 2008 ; Koushik et al., 2008 ; Minamino et al., 2008).

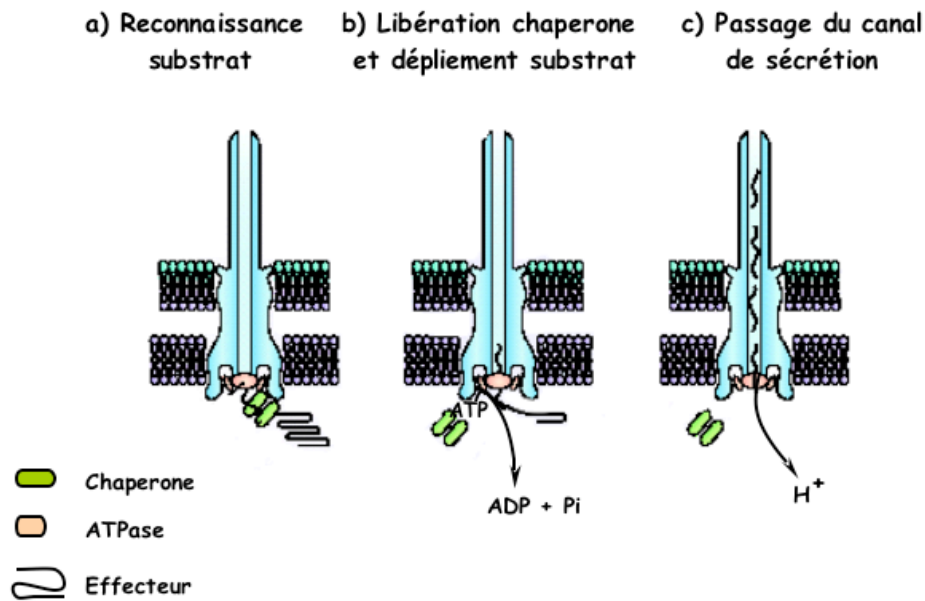


Figure 3.7 : Schéma présentant le processus sécrétoire et son énergétique (Source : Galan, 2008).

L'injectisome est représenté en bleu, ancré dans les deux membranes bactériennes.

L'interaction entre l'ATPase et le complexe chaperone/substrat présume un rôle dans la hiérarchisation de la sécrétion (Akeda and Galan, 2005). Les caractéristiques des ATPases du SST3 ressemblent à celles des ATPases AAA+ et ces deux familles pourraient présenter des fonctionnements similaires (Akeda and Galan, 2005 ; Galan and Wolf-Watz, 2006). Les ATPases AAA+ sélectionnent leurs substrats en reconnaissant un petit peptide signal peu conservé et peu structuré localisé aux extrémités terminales de la protéine cible. Ainsi, c'est peut être un mécanisme similaire qui permet aux ATPases du SST3 de sélectionner les substrats qui sont envoyés dans le système (Galan and Wolf-Watz, 2006). En effet, les protéines sécrétées ont une séquence signal localisée parmi leurs 20 à 30 premiers acides aminés qui sont nécessaires et suffisants pour la prise en charge par le SST3 (Cornelis, 2006). Contrairement au peptide signal de la machinerie Sec, il n'est pas clivé pendant la sécrétion. Ces séquences n'ont aucune homologie c'est pourquoi elles sont controversées dans leur rôle de signal de sécrétion. Une équipe propose que le signal résiderait en fait dans la partie 5' des ARNm codant pour les protéines sécrétées par le STT3 (Anderson and Schneewind, 1997). Ce serait une structure tridimensionnelle particulière de cette région de l'ARNm qui interagirait avec l'appareil de sécrétion, permettant sa traduction et la sécrétion de l'effecteur. Cette hypothèse suggère néanmoins que la sécrétion des effecteurs soient co-

traductionnelle ce qui ne semble pas être le cas car ces derniers sont stockés dans le cytoplasme bactérien en liaison avec leur chaperone avant infection.

2.2 L'aiguille de sécrétion

2.2.1 Description générale de l'aiguille de sécrétion

C'est une structure formée par la polymérisation d'une petite sous unité (<10 kDa) : PrgI chez *S. enterica* (Kubori *et al.*, 2000), MxiH chez *S. flexneri* (Blocker *et al.*, 2001), YscF chez *Y. pestis* (Hoiczyk and Blobel, 2001) et PscF (une protéine de 9 kDa) chez *P. aeruginosa* (Pastor *et al.*, 2005). Les composants de l'aiguille du SST3 sont conservés entre les différentes espèces bactériennes pathogènes d'animaux : les orthologues partagent une homologie de séquence protéique d'environ 50%. Celle-ci concerne principalement leur domaine C terminal, domaine qui joue un rôle très important dans leur capacité de polymérisation (Deane *et al.*, 2006 ; Quinaud *et al.*, 2007).

Les structures formées par la polymérisation de PscF ont une longueur d'environ 50 nm, un diamètre externe de 8 nm. De plus, elles sont creuses, et leur canal interne mesure environ 2 nm de diamètre (Pastor *et al.*, 2005). La longueur des aiguilles est invariable au sein d'une espèce bactérienne, mais elle varie toutefois entre 50 et 80 nm selon l'espèce. Ses paramètres hélicoïdaux ont pu être déterminés pour les aiguilles de *S. flexneri* (Cordes *et al.*, 2003). Ces données ont été obtenues par mesures de diffraction aux rayons X des fibres et par leurs analyses par microscopie électronique à transmission à une résolution de 16 Å. L'aiguille de *S. flexneri* mesure environ 50 nm de long, 7 nm de diamètre externe et 2 à 3 nm de diamètre interne. Un tour d'hélice est formé par 5,6 sous unités et son pas est de 24 Å. Ces paramètres sont similaires à ceux des hélices formant la tige, le crochet, et le filament du flagelle. Cette observation est surprenante compte tenu du fait que la flagelline, sous unité composant le flagelle, a un poids moléculaire de l'ordre de 45 kDa, soit environ 4 à 5 fois supérieur à celui des composants de l'aiguille du SST3. Ceci peut s'expliquer par le fait que la flagelline est formée de 4 domaines : D0 à D3. Le domaine D0 contient les hélices α N terminale et C terminale de la flagelline. Il s'assemble pour former le tube interne du flagelle qui présente les mêmes caractéristiques hélicoïdales que l'aiguille du SST3. Le domaine D1, quant à lui, forme un tube externe et les domaines D2 et D3 constituent l'extérieur du filament (Yonekura *et al.*, 2003). Ainsi, la structure de la sous unité formant l'aiguille semble représenter le minimum requis pour l'assemblage d'une telle hélice. La

flagelline a acquis des domaines supplémentaires entre ses extrémités N et C terminales qui sont propres aux fonctions du filament flagellaire (Cordes *et al.*, 2003).

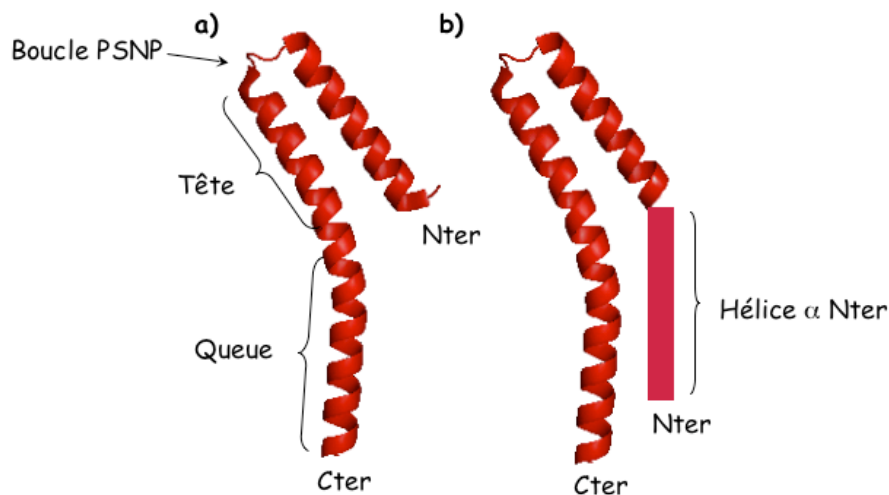
La protéine YscF présente des caractéristiques antigéniques protectrices. En effet, des études ont montré que l'immunisation active de souris contre YscF les protégeraient en partie (efficacité dans environ 60% des cas) contre l'infection par *Y. pestis* (Swietnicki *et al.*, 2005). Les protéines formant l'aiguille représentent donc une cible vaccinale potentielle.

2.2.2 Assemblage de l'aiguille chez *S. flexneri*

Une fois la base du SST3 assemblée dans la double membrane bactérienne, le système est compétent pour la sécrétion. Le passage des unités par le système Sec n'est plus nécessaire et il est réalisé par la base. Celle-ci va donc sécréter les protéines formant l'aiguille qui vont polymériser de sa base vers son sommet.

Structure du monomère de MxiH

La structure d'une forme monomérique de MxiH a été résolue par cristallographie aux rayons X à une résolution de 1,9 Å ce qui a permis de comprendre en partie les mécanismes d'assemblage des aiguilles du SST3 (Deane *et al.*, 2006). Les 5 acides aminés C terminaux de la protéine ont été tronqués afin d'obtenir une forme monomérique. MxiH se replie en deux longues hélices α anti-parallèles qui sont connectées par un coude composé des acides aminés Pro-Ser-Asn-Pro (boucle PSNP) (Figure 3.8 a). L'hélice C terminale est séparée en deux domaines par une région charnière, et les deux parties de l'hélice sont désignées comme la tête et la queue. Les 5 derniers acides aminés qui ont été supprimés pour la détermination de la structure sont prédits comme étant aussi repliés en hélice α .



**Figure 3.8 : Structure tridimensionnelle du monomère de MxiH
(Source : Deane *et al.*, 2006 ; Code PDB 2CA5)**

a) Monomère tronqué de MxiH (moins 5 acides aminés en C terminal). La fin de l'hélice N terminale n'est pas représentée. **b)** Monomère tronqué de MxiH avec prédiction de la structure du domaine N terminal en hélice α .

La structure de la partie N terminale n'a pas pu être résolue car ce domaine n'est pas visible sur la carte de densité électronique : il est flexible bien que prédit comme étant hélicoïdal par des programmes de prédiction de structures secondaires (Figure 3.8 b). Ce phénomène pourrait être dû soit à l'absence des 5 acides aminés C terminaux de MxiH qui sont nécessaires au repliement de cette région, ou à la structuration de cette hélice qui n'est réalisée que lors de l'assemblage de l'aiguille.

Modèle d'assemblage du monomère en hélice de type III

La structure du monomère de MxiH a été superposée (Deane *et al.*, 2006) de la manière la plus optimale sur la carte de densité électronique de l'aiguille de *S. flexneri* (Cordes *et al.*, 2003) (Figure 3.9). La modélisation obtenue montre qu'un monomère de MxiH est entouré de 7 autres unités identiques (Figure 3.9 b). Son axe majeur est en ligne avec l'axe majeur de l'aiguille. La queue de la partie C terminale est enfouie vers le cœur tandis que la tête pointe vers la surface. Cette partie C terminale interagit avec 3 unités voisines (figure 3.9 c) par des interactions hydrophobes. La boucle PSNP interagit avec la partie C terminale de la sous unité surplombante (Figure 3.9 c) et oriente la partie N terminale vers l'intérieur de la structure (Figure 3.9 a). La structure globale de cet assemblage présente un vide dans la carte de densité électronique qui correspond probablement à l'emplacement de la partie N terminale. Elle peut être parfaitement

complée par ajout de ce domaine sous forme d'hélice α comme sa séquence le prédit (Figure 3.9 c). Ainsi la partie N terminale borderait l'intérieur de l'aiguille.

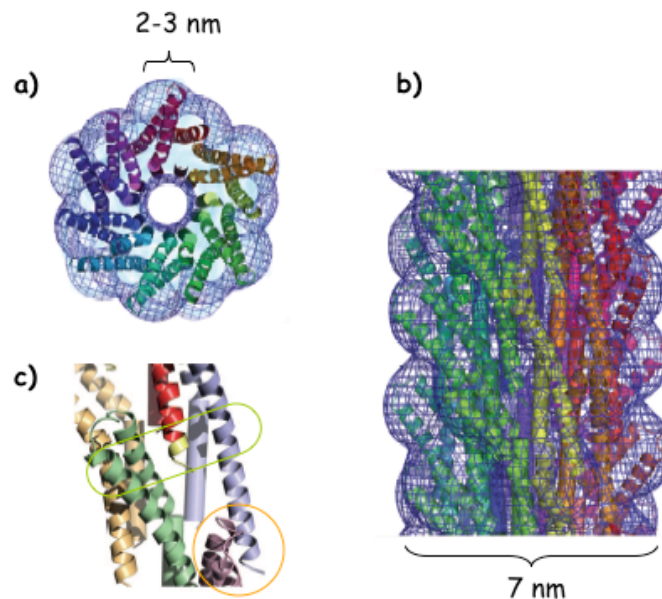


Figure 3.9 : Modélisation de l'assemblage de l'aiguille de *S. flexneri* (Source : Deane *et al.*, 2006).

a) Vue du dessus. L'assemblage forme une structure creuse d'environ 2 à 3 nm de diamètre. La carte de densité électronique est représentée par le nuage bleu.

b) Vue de face de l'aiguille. Son diamètre externe est de 7 nm. **c)** Zoom sur l'assemblage de 5 unités de MxiH, chaque monomère étant représenté d'une couleur différente. La zone entourée en vert montre que la partie C terminale d'un monomère interagit avec 3 unités adjacentes. La partie entourée en orange, montre que la partie PSNP d'une unité interagit avec la partie C terminale de l'unité surplombante.

2.2.3 Régulation de la taille de l'aiguille

Les aiguilles ont une longueur fixe chez une espèce bactérienne donnée et varie peu d'une espèce à l'autre (entre 50 et 80 nm). Cette taille est en général la distance que doit couvrir l'aiguille pour être assez longue pour injecter les toxines dans les cellules hôtes. Par exemple, chez *Y. enterocolitica*, il a été montré que la taille de l'aiguille correspondait à l'espace entre une bactérie et la cellule hôte, imposé par l'interaction entre l'adhésine bactérienne YadA et son récepteur cellulaire (Mota *et al.*, 2005). Chez *S. flexneri*, c'est la couche de lipopolysaccharide qui détermine la taille des aiguilles (West *et al.*, 2005). Le LPS permet à la bactérie de se protéger contre le système immunitaire de l'hôte mais il est plus long que le SST3. Une souche sauvage est capable de glycosyler ses LPS entraînant une diminution de deux fois leur taille tout en

gardant leur fonction. L'aiguille de sécrétion est alors assez longue pour agir dans ces conditions (West *et al.*, 2005).

Pour former des aiguilles qui sont de longueurs fixes, il existe un mécanisme de régulation important. Deux modèles sont proposés pour expliquer ce phénomène.

Théorie de la règle moléculaire

La protéine YscP de *Yersinia* spp. contrôle la taille des aiguilles chez ces bactéries (Journet *et al.*, 2003). Par microscopie électronique à transmission il a été observé que la longueur des aiguilles varie en fonction de la taille de YscP. En effet, des délétions ou des additions de séquences dans le domaine central de la protéine conduit à la formation d'aiguilles plus courtes ou plus longues, respectivement. Une corrélation a pu être établie entre le nombre de résidus constituant ce domaine et la longueur des aiguilles. Les domaines C et N terminaux de YscP sont, quant à eux, essentiels à ce contrôle et ont été proposés comme étant les sites de liaison de la protéine avec la base cytoplasmique et les unités de l'aiguille, respectivement. En effet, YscP est associé aux aiguilles qui viennent d'être synthétisées.

Deux modèles sont proposés pour le mode de fonctionnement de YscP (Figure 3.10 a et b). Un modèle où elle est ancrée à la base et au sommet de l'aiguille et s'étire au cours de la polymérisation jusqu'à atteindre un maximum, signal d'arrêt de la polymérisation (Figure 3.10 a). Comme le canal de sécrétion est étroit, il est possible que la présence de la règle moléculaire empêche le passage des unités YscF.

Un second modèle a été proposé plus tard après les travaux réalisés sur l'étude du contrôle de la longueur du crochet du flagelle par FliK (Moriya *et al.*, 2006). Les auteurs proposent que FliK est sécrété par intermittence pendant la polymérisation du crochet et forme un pont moléculaire reliant la base à l'extrémité en polymérisation. Ainsi, FliK mesure la longueur du crochet formé et ce n'est que quand la protéine est bien étirée que le changement de substrat est réalisé.

Comme c'est le cas pour FliK, homologue de YscP pour le flagelle, il est proposé que YscP pourrait être sécrété par intermittence dans le milieu externe où il servirait de sonde pour évaluer l'avancée de la polymérisation (Figure 3.10 b). Dans les deux modèles, c'est seulement quand YscP est entièrement étirée que le signal permettant l'arrêt de la polymérisation et le changement de substrat serait envoyé à la base (Figure 3.10 c). Aucune donnée ne permet à ce jour de trancher entre ces deux modèles.

P. aeruginosa code pour une protéine PscP, homologue à YscP, qui pourrait remplir la même fonction.

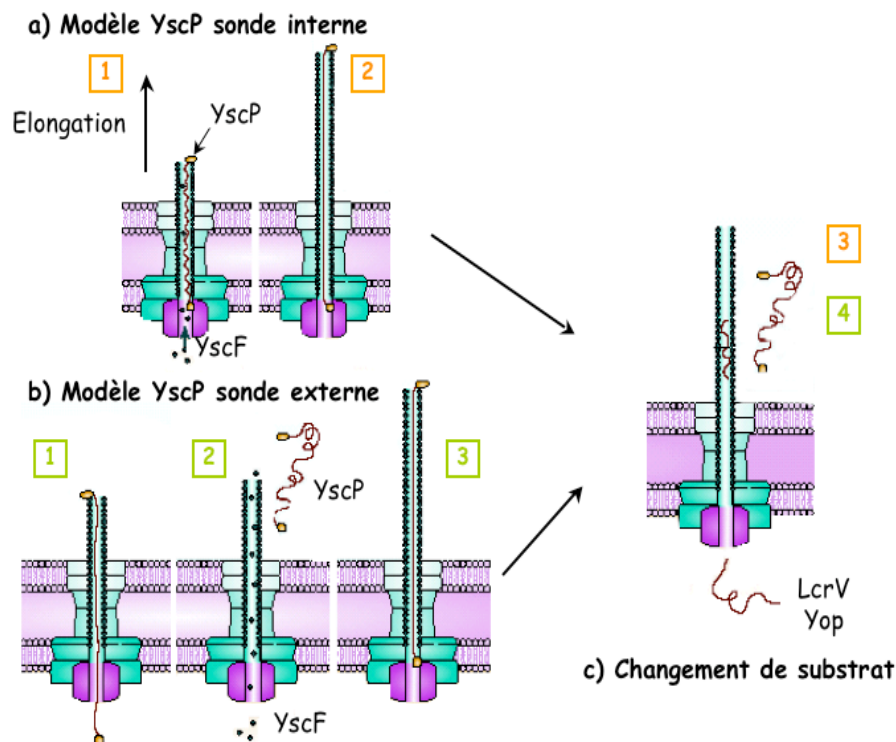


Figure 3.10 : Modèle du contrôle de la taille des aiguilles chez *Y. enterocolitica* : la règle moléculaire YscP (D'après : Cornelis, 2006).

Théorie de la polymérisation simultanée de la tige interne et de l'aiguille

Le SST3 de type Inv-Mxi-Spa a un système de contrôle de la taille de l'aiguille différent (Marlovits *et al.*, 2006). La délétion chez *S. typhimurium* d'InvJ, l'orthologue de YscP, conduit à la synthèse d'aiguilles anormalement longues. L'étude de la structure des injectisomes des bactéries n'exprimant pas InvJ a mis en évidence que la base n'est pas la même : son intérieur ne contient pas la tige interne ni la structure qui permet de l'ancrer. InvJ stabilise donc l'ancrage de la tige interne, phénomène essentiel à la formation d'aiguilles de taille définie. Ce phénomène dépendrait de la stoechiométrie entre les unités formant l'aiguille (PrgI) et les composants de la tige interne (PrgJ). Les auteurs proposent un modèle où, une fois la base prête à ancrer la tige interne, la polymérisation de PrgJ se fait simultanément à celle de l'aiguille (Figure 3.11). Quand la tige interne a fini de polymériser, l'aiguille a atteint une taille fonctionnelle. Un signal est envoyé à la base pour engendrer le changement de substrat. Ce modèle implique que les proportions entre PrgI et PrgJ sont régulées de façon stricte. Une

bactérie surproduisant le composant de l'aiguille (PrgI) forme des aiguilles anormalement longues, phénomène aussi observé chez *S. flexneri* (Tamano *et al.*, 2000). Une bactérie surproduisant PrgJ, quant à elle, présente des aiguilles de petite taille mais fermement ancrées dans les membranes.

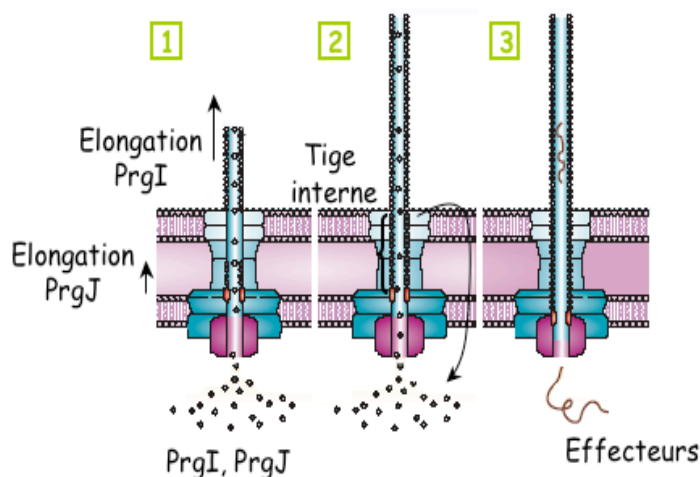


Figure 3.11 : Modèle du contrôle de la taille des aiguilles chez *S. typhimurium* (D'après : Cornelis, 2006).

L'injectisome est donc une structure multi-protéique complexe ancrée dans les membranes bactériennes par sa base et surmontée d'une structure protubérante de taille définie. Le système est creux et permet la sécrétion par ce canal des unités formant l'aiguille puis d'autres protéines : les translocateurs et les effecteurs. Outre les composants structuraux, ce système complexe nécessite pour son fonctionnement une panoplie de protéines annexes telles que les chaperones ou les protéines dédiées à la régulation transcriptionnelle des gènes codant pour cette structure.

3. Les chaperones

Comme nous l'avons vu précédemment, l'ATPase, qui est supposée conservée à la base du SST3 permet le dépliement des substrats et leur export dans la machinerie de sécrétion avec une certaine hiérarchisation. Ce phénomène nécessite une famille de protéines exclusivement cytoplasmiques qui jouent plusieurs rôles : elles apportent les substrats, dont le dépliement est amorcé à l'ATPase et empêchent l'interaction prématurée entre les différents composants du SST3. En effet, les chaperones interagissent de manière spécifique avec un ou plusieurs effecteur(s), translocateur(s) ou

le composant des aiguilles (Tableau 1). Les bactéries mutantes n'exprimant pas une chaperone voient la sécrétion de leur substrat spécifique abolie (Stebbins and Galan, 2003) et sa stabilité intracellulaire perdue. Par exemple, si PcrH n'est pas exprimée, la sécrétion des Pops est diminuée après induction du SST3, mais la concentration en Pops intracellulaire est aussi drastiquement diminuée (Broms *et al.*, 2003). De même, PscF est co-stabilisé par ces deux chaperones PscG et PscE, et l'absence d'une de ces deux protéines abolie le maintien de PscF dans le cytoplasme bactérien (Quinaud *et al.*, 2005 ; Quinaud *et al.*, 2007).

Après la sécrétion du translocateur ou de l'effecteur, la chaperone reste dans le cytoplasme sous forme libre. Dans certains cas, elle serait alors responsable de l'activation des gènes codant pour leurs substrats spécifiques. C'est le cas par exemple de LcrH de *Yersinia* spp., chaperone des Yops, qui, lorsqu'elle n'interagit plus avec YopD joue un rôle d'activateur de la transcription de gènes de l'opéron de translocation (Chapitre 4, paragraphe 1) (Francis *et al.*, 2001).

3.1 Les chaperones de classe I

Leurs substrats sont les effecteurs. En général, chaque chaperone de cette famille interagit spécifiquement avec un effecteur, mais certaines font exception et peuvent interagir avec plusieurs. Par exemple, la chaperone CesT d'*E. coli* interagit au moins avec huit effecteurs (Thomas *et al.*, 2007). Ces protéines sont en général codées par les gènes adjacents aux séquences codant pour leur substrat spécifique. Ce sont de petites molécules (< 15 kDa) qui ont un pI acides (de 4 à 5) (Cornelis, 2006 ; Galan and Wolf-Watz, 2006). Grâce à la résolution de la structure tridimensionnelle par rayons X de certaines chaperones seules, telles que CesT (EPEC) (Luo *et al.*, 2001) ou SigE (*S. enterica*) (Luo *et al.*, 2001), ou en complexe avec leur effecteur spécifique, telles que, SycE avec YopE (*Y. pseudotuberculosis*) (Birtalan and Ghosh, 2001) ou SicP avec SptP (*S. enterica*) (Stebbins and Galan, 2001), un certain nombre d'observations ont pu être faites. Bien que leurs séquences ne soient pas conservées, les chaperones sont organisées en 5 feuillets β et 3 hélices α . Elles interagissent avec leur substrat sous forme de dimère. Celui-ci présente des patchs hydrophobes, où les effecteurs se lient puis s'étendent sur la surface de la chaperone. L'affinité de la liaison est très forte et pour la défaire, l'énergie apportée par l'ATPase est nécessaire (Akeda and Galan, 2005).

Les chaperones de type I maintiennent les effecteurs dans une conformation où une partie est dépliée (le domaine qui se lie à la chaperone). Ceci permet de les conserver

dans la cellule prêts à la sécrétion. En effet, après contact avec la cellule hôte, ceux-ci doivent pouvoir être exportés rapidement (Stebbins and Galan, 2003).

3.2 Les chaperones de classe II

Elles sont spécifiques des protéines translocatrices formant le pore dans les membranes cellulaires hôtes. Ce sont par exemple la protéine PcrH, liant les translocateurs PopB et PopD de *P. aeruginosa*, ou LcrH, liant YopB et YopD de *Y. enterocolitica* (Cornelis, 2006). PcrH lie les deux translocateurs de *P. aeruginosa* et les maintiens dans un état partiellement déplié propice à leur sécrétion et à leur insertion dans la membrane (Faudry *et al.*, 2006). LcrH lie les deux translocateurs de *Y. enterocolitica* simultanément. Par mutagenèse de LcrH, il a été montré que les sites d'interaction de YopB et de YopD sont différents. YopB interagit au niveau d'une cavité prédite sur le face supérieure de LcrH tandis que YopD interagirait au niveau de la face inférieure (Edqvist *et al.*, 2006).

La structure tridimensionnelle de LcrH (SycD) a été déterminée par cristallographie aux rayons X à une résolution de 2 Å (Büttner *et al.*, 2008). Cette chaperone se replie en une série de six hélices α qui sont alignées de manière anti-parallèles. Ceci constitue un motif de type TPR (TetraTricoPeptide). De plus, LcrH dimérise par association de deux sous-unités face à face au niveau de leurs deux premières hélices α N terminales. Par mutagenèse dirigée, il a été montré que si la dimérisation est abolie, les translocateurs hydrophobes ne sont pas sécrétés. Le dimère de LcrH s'étend en longueur et offre une face concave et une face convexe où sont certainement réalisées les interactions avec ses substrats.

Les translocateurs sont très hydrophobes et toxiques pour les bactéries. L'interaction avec leur chaperone de classe II dans le cytoplasme bactérien permet d'inhiber cette toxicité et d'empêcher l'interaction précoce entre les deux translocateurs.

3.3 Les chaperones de classe III

Elles se lient aux composants destinés à polymériser, comme les sous-unités formant l'aiguille de sécrétion et ainsi empêche la polymérisation prématurée de ces structures dans le cytoplasme bactérien. Un exemple appartenant à cette classe de chaperones sont les protéines PscE et PscG de *P. aeruginosa* qui co-stabilisent l'unité formant l'aiguille : PscF (Quinaud *et al.*, 2005). La structure tridimensionnelle de ce complexe

révèle un assemblage des deux chaperones formant une cavité hydrophobe dans laquelle vient s'insérer l'hélice C terminale de PscF, empêchant ainsi sa polymérisation (Quinaud *et al.*, 2007).

4. Régulation du SST3

4.1 Régulation spécifique : couplage sécrétion/synthèse

Certaines bactéries, comme *Salmonella* spp. et *Shigella* spp., accumulent les effecteurs dans la cellule avant le contact avec la cellule cible. D'autres pathogènes, comme *P. aeruginosa* et *Yersinia* spp., synthétisent fortement les effecteurs de type III à la suite d'un contact avec les cellules eucaryotes cibles. Une signalisation contact-dépendante est alors indispensable *in vivo* pour induire l'expression du SST3 et la sécrétion des protéines effectrices. *In vitro*, l'induction peut être mimée par la déplétion en Ca²⁺ du milieu de culture mais aussi par la présence de sérum (Vallis *et al.*, 1999).

Chez *P. aeruginosa*, les gènes codant pour les protéines associées à la sécrétion, la translocation et la régulation du SST3 sont organisés en 5 opérons localisés dans le chromosome. Ceux codant pour les effecteurs et leurs chaperones sont situés ailleurs sur le chromosome et sur un îlot de pathogénicité pour *exoU*. Tous les gènes du SST3 sont sous le contrôle d'un facteur de transcription spécifique : ExsA. Il fait partie de la famille des AraC/XylC et se fixe en amont des promoteurs de chaque opéron sur une séquence consensus pour activer leur transcription. ExsA régule notamment la transcription de l'opéron *exsCEBA*, et par là autorégule sa propre expression (Brutinel *et al.*, 2008). Les autres acteurs ExsC, ExsD et ExsE interviennent dans la régulation par ExsA et permettent le couplage des activités de sécrétion et de synthèse des protéines spécifiques du SST3. Le schéma proposé de ce mécanisme est le suivant (Dasgupta *et al.*, 2004) (Figure 3.12) :

En conditions de répression du système, l'anti-activateur ExsD séquestre ExsA et inhibe ainsi la transcription des gènes (Zheng *et al.*, 2007). Ceci est possible car la protéine ExsE s'accumule dans le cytoplasme bactérien où elle séquestre l'anti-anti-activateur ExsC (Rietsch *et al.*, 2005 ; Zheng *et al.*, 2007) (Figure 3.12 a). Lorsqu'un signal de sécrétion est perçu, ExsE est transloquée dans la cellule hôte (Urbanowski *et al.*, 2007) et libère ExsC qui va alors interagir avec l'anti-activateur ExsD (Zheng *et al.*, 2007). ExsA se retrouve alors libre dans le cytoplasme, où il va pouvoir induire la

transcription des gènes du SST3 (Figure 3.12 b). Il s'ensuit l'activation de la sécrétion et l'augmentation du nombre d'injectisomes présents à la surface de la bactérie.

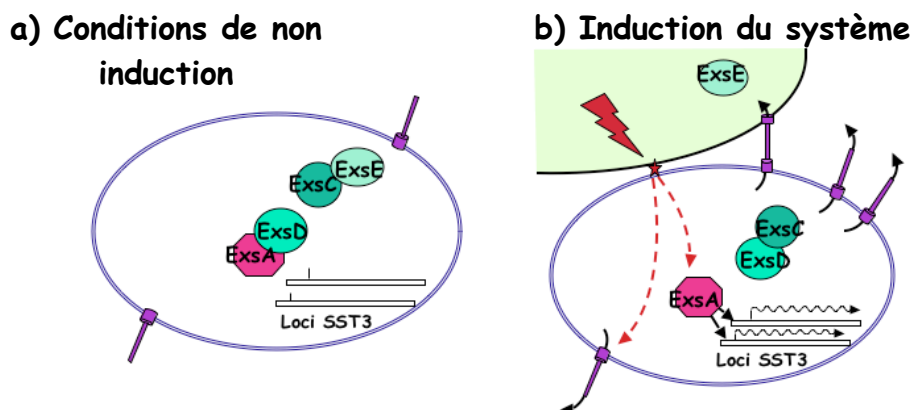


Figure 3.12 : Modèle du couplage transcription du SST3/sécrétion.
a) En absence de signal inducteur. b) Après perception du signal d'induction.

4.2 Régulation globale des facteurs de virulence

Il est nécessaire pour les bactéries pathogènes de coordonner l'action de ses différents facteurs de virulence en s'adaptant à l'environnement et au type d'infection qui est développé. Chez *P. aeruginosa* cette régulation est très complexe et intègre de nombreux systèmes en réponse à différents stimuli (Yahr and Wolfgang, 2006).

Plusieurs systèmes de régulation de l'expression des facteurs de virulence semblent jouer un rôle dans la modulation de l'expression du SST3 :

Selon les conditions environnementales, un **système à deux composants**, le système GacS (senseur membranaire)/GacA (régulateur de réponse) joue un rôle majeur dans la balance entre infections aiguës et chroniques. En effet, il permet de contrôler les facteurs de virulence exprimés et permet soit l'activation de l'expression du SST3 ou la formation de biofilms, respectivement. Ce système peut être plus finement modulé par l'action d'autres senseurs telles que les histidines kinases RetS (Regulator of Type III Secretion) ou LadS (Ventre *et al.*, 2006).

Un autre système de régulation globale est orchestré par l'**AMPc** (Adénosine MonoPhosphate cyclique). Chez *P. aeruginosa*, la concentration en calcium extracellulaire serait sentie par l'adénylate cyclase cytoplasmique CyaA, et l'adénylate

cyclase membranaire, CyaB. Leur activation conduirait à la production d'AMPc qui agirait avec un facteur de régulation global, Vfr (décrit comme un régulateur du QS, de la production des pili de type IV et du SST2) et induirait l'expression des gènes du SST3 (Wolfgang *et al.*, 2003).

Le système de **QS** est lui aussi impliqué dans la régulation globale de l'expression des facteurs de virulence. Celui-ci induirait la répression de l'expression du SST3 lors de la croissance bactérienne en biofilm (Filloux *et al.*, 1998 ; Hogardt *et al.*, 2004).

Des **conditions de stress** pour la bactérie conduisent aussi à la répression du SST3. Ainsi, quand la concentration en cuivre externe est élevée, une inhibition est mise en place *via* PtrA (Pseudomonas type III repressor A) (Ha *et al.*, 2004). En cas de dommages sur l'ADN bactérien, c'est PtrB, un produit d'un gène activé par le système SOS, qui va conduire à l'inhibition du système (Wu and Jin, 2005).

Ces différentes voies de régulation s'interconnectent très probablement au niveau de l'activateur transcriptionnel spécifique du SST3 : ExsA.

4.3 Rôle de l'aiguille dans la régulation de la sécrétion

Elle pourrait être un des senseurs du signal de sécrétion et pourrait le propager à la base du SST3. En effet, la sécrétion des effecteurs est réalisée, *in vivo*, uniquement par les aiguilles qui sont en contact avec les cellules hôtes (Rosqvist *et al.*, 1994).

Des mutations affectant la capacité de l'aiguille à sentir ou à répondre aux signaux d'induction ont été mises en évidence sur MxiH de *S. flexneri* (Kenjale *et al.*, 2005) et sur YscF de *Y. pseudotuberculosis* (Torruellas *et al.*, 2005 ; Davis and Mecsas, 2007).

Pour MxiH, certains mutants ont un phénotype de sécrétion constitutive des effecteurs et cette dernière n'est plus inductible (Kenjale *et al.*, 2005).

Pour YscF, les translocateurs et les effecteurs sont sécrétés constitutivement (Davis and Mecsas, 2007). Ceci montre que l'aiguille joue un rôle important dans la régulation de l'induction de la sécrétion des translocateurs et des effecteurs.

L'étude des mutants de MxiH et de YscF (Kenjale *et al.*, 2005 ; Torruellas *et al.*, 2005 ; Davis and Mecsas, 2007) a mis en évidence quatre zones importantes pour la régulation de l'induction du SST3 *via* l'aiguille de sécrétion (Blocker *et al.*, 2008) (Figure 3.13 a). Un modèle est proposé où l'aiguille peut se trouver dans deux configurations

distinctes : une fermée où la sécrétion n'est pas possible et une ouverte où les effecteurs peuvent être libérés (figure 3.13 b). La déplétion en calcium ou le contact cellulaire induirait un changement de conformation de l'aiguille qui passerait du mode fermé au mode ouvert. Le signal serait généré à son sommet et serait relayé à la base par de faibles changements structuraux des unités la composant (Figure 3.13 b).

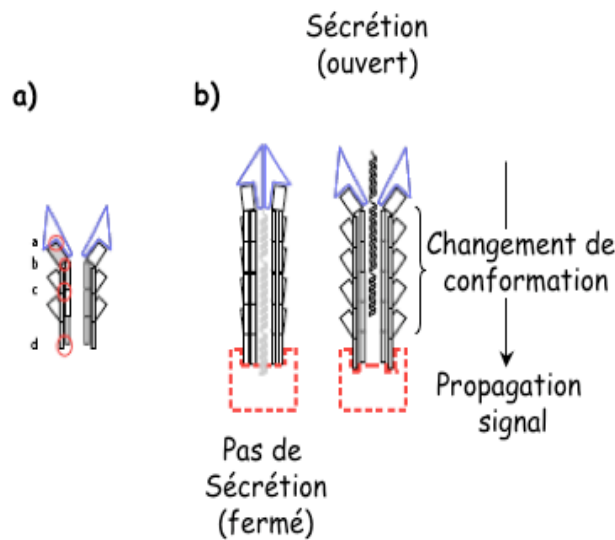


Figure 3.13 : Modèle de la régulation de la sécrétion par l'aiguille.
(Source : Blocker et al., 2008).

a) Régions déterminées par études phénotypiques de mutants, qui jouent un rôle dans la régulation de la sécrétion par l'aiguille. Les zones sont entourées d'un cercle rouge et représentent : a - zone d'interaction entre la protéine au sommet de l'aiguille et les unités formant cette dernière, b - zone d'interaction intramoléculaire de l'unité formant l'aiguille, c - zone d'interaction entre les unités de l'aiguille et d - zone d'interaction entre la base du SST3 et les composants de l'aiguille. **b)** Schéma hypothétique de la transduction du signal le long de l'aiguille. En position fermée, il n'y a pas de sécrétion des effecteurs. Après induction et propagation du signal, l'injectisome passe dans une configuration où la sécrétion est possible.

Tous les mécanismes de l'induction de la sécrétion ne sont pas encore compris. L'aiguille semble y jouer un rôle important en partenariat avec une protéine localisée à son sommet avant infection et qui fait partie du translocon. Nous allons maintenant décrire plus en détail la composition du translocon et les divers rôles qu'il joue au cours de l'infection SST3 dépendante.

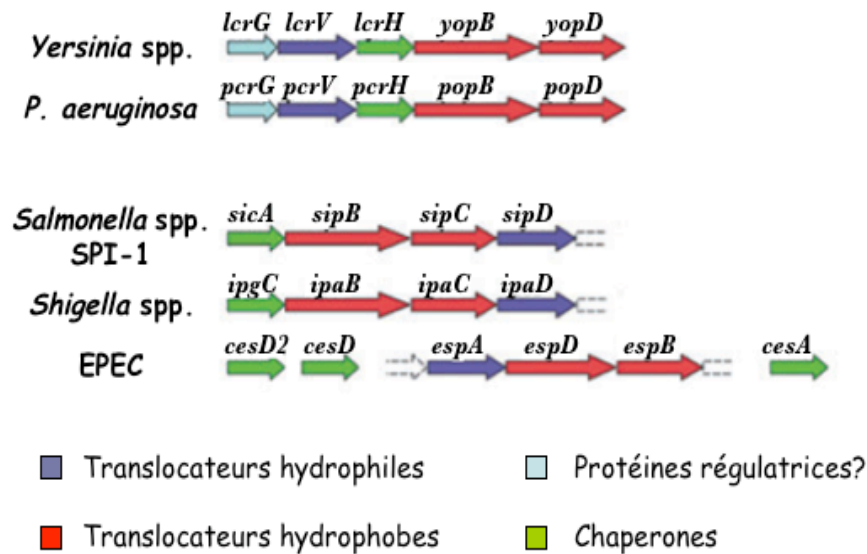


Figure 4.1 : Opérons de translocation de plusieurs injectisomes (Source : Mueller et al., 2008).

L'organisation des opérons de translocation est sensiblement la même au sein des diverses familles d'injectisomes. Les deux translocateurs hydrophobes (rouge) sont pris en charge par une ou plusieurs chaperone(s) (vert). Le translocateur hydrophile (bleu) est nécessaire à la formation du translocon. Dans la famille Ysc, une protéine en plus est présente (bleu clair). Elle interagit avec le translocateur hydrophile dans le cytoplasme.

Chapitre 4

Le translocon du SST3, les antigènes V de *P. aeruginosa* et de *Y. pestis*

L'injectisome tel qu'il a été décrit dans le chapitre 3 ne permet pas l'injection des toxines dans le cytoplasme des cellules hôtes. Cette fonction nécessite la présence de trois protéines supplémentaires, communes aux différents SST3 décrits à ce jour et qui ont été nommées, de part leur fonction, "translocateurs". Deux protéines translocatrices sont hydrophobes et forment un pore dans la membrane des cellules hôtes pour le passage des toxines. La troisième protéine, quant à elle, est hydrophile et ne s'insère pas dans les membranes. Sa présence est toutefois nécessaire à la formation du pore de translocation.

1. L'opéron de translocation

Dans tous les SST3 décrits, les trois translocateurs sont codés au niveau d'un même opéron (Figure 4.1). Cet opéron, *pcrGVH-popBD* chez *P. aeruginosa* et *lcrGVH-yopBD* chez *Y. pestis*, codent également pour une protéine chaperone des deux translocateurs hydrophobes (PcrH et LcrH ou SycD : Specific yop chaperone) et une protéine interagissant dans le cytoplasme bactérien avec le translocateur hydrophile (PcrG et LcrG) (Allmond *et al.*, 2003 ; Bergman *et al.*, 1991). L'organisation de l'opéron et la fonction de chacun des translocateurs sont assez conservées (Figure 4.1).

Chez *Yersinia* spp., l'opéron de translocation code aussi pour une protéine impliquée dans la **régulation de la sécrétion des effecteurs (LcrG)**. Elle empêche la sécrétion des effecteurs en conditions non induites. En effet, LcrG sous forme libre est localisée à l'entrée du canal de sécrétion et le bouche. Après induction, LcrV va s'accumuler dans le cytoplasme bactérien et interagir avec LcrG. Lorsque la concentration en LcrV sera suffisante pour titrer LcrG, cette dernière sera déplacée de l'entrée du canal. Ceci permet la sécrétion de LcrV puis des Yops (Figure 3.14 c) (Matson and Nilles, 2001).

L'homologue de cette protéine chez *P. aeruginosa*, PcrG, interagit avec PcrV dans le cytoplasme bactérien, mais ne semble pas avoir cette fonction de régulation (Allmond *et al.*, 2003 ; Nanao *et al.*, 2003).

D'autres interactions mises en évidence parmi les protéines codées par l'opéron sont les interactions entre **les translocateurs hydrophobes et leur chaperone** (Allmond *et al.*, 2003). Ainsi les chaperones PcrH de *P. aeruginosa* et LcrH de *Y. pestis* interagissent avec une stoechiométrie 1 :1 avec PopB/PopD et YopB/YopD, respectivement, dans le cytoplasme bactérien (Bergman *et al.*, 1991 ; Allmond *et al.*, 2003 ; Broms *et al.*, 2003a). Les translocateurs PopB/YopB et PopD/YopD sont des protéines avec, respectivement, deux et une région transmembranaire putative (Francis *et al.*, 2001 ; Faudry *et al.*, 2007). L'association entre PopD et PcrH se fait au niveau du domaine N terminal de PopD et une partie de son domaine hydrophobe conduisant à l'enfouissement de ce dernier dans la chaperone (Faudry *et al.*, 2007). Ces interactions sont donc nécessaires à la stabilisation des translocateurs hydrophobes qui sont maintenus sous forme monomérique. De plus, l'interaction PcrH-PopD maintient la protéine PopD dans une conformation particulière partiellement dépliée (Faudry *et al.*, 2007) ce qui pourrait augmenter l'efficacité de sa sécrétion.

La conservation entre les opérons *lcrVGHyopBD* et *pcrVGHpopBD* est si importante que PcrH et LcrH sont fonctionnellement interchangeable. Un mutant n'exprimant pas *lcrH* peut être complété par *pcrH* et récupérer ses capacités à injecter les toxines du type III dans le cytoplasme de cellules hôtes (Broms *et al.*, 2003b).

Des propriétés similaires de liaison entre les chaperones des translocateurs hydrophobes ont été mises en évidence chez *S. typhimurium* (SicA avec SipB/SipC) et chez *S. flexneri* (IpgC avec IpaB/IpaC) (Osiecki *et al.*, 2001).

Chez *Y. pestis*, **LcrH**, en plus de son rôle de chaperone, a une fonction dans la **régulation de la synthèse des Yops** (Francis *et al.*, 2001). En effet, les souches mutantes n'exprimant pas *lcrH* synthétisent des Yops constitutivement, alors que dans une souche sauvage, les Yops ne sont synthétisés qu'après réception du signal d'induction. Une souche mutante n'exprimant pas *yopD* présente le même phénotype vis-à-vis de la synthèse des Yops, tandis qu'une souche n'exprimant pas *yopB* conserve un phénotype sauvage. LcrH agit donc en régulateur négatif de la synthèse des Yops lorsqu'il est en complexe avec YopD. Un signal d'induction va conduire à la sécrétion de YopD libérant LcrH qui joue alors un rôle d'activateur de la synthèse.

Contrairement à LcrH, PcrH, lui ne remplit aucun rôle de régulation (Broms *et al.*, 2003a).

L'étude des souches mutantes pour la chaperone ou les translocateurs hydrophobes a mis en évidence un défaut d'injection des toxines. De plus ces translocateurs ont des domaines prédits comme transmembranaires ce qui a conduit à l'hypothèse que ces protéines forment un pore dans les membranes des cellules hôtes pour le passage des toxines.

2. Rôle des translocateurs hydrophobes

2.1 Formation de pores dans les cellules hôtes

Mise en évidence des pores par osmoprotection

Plusieurs études de la formation de pores dans les cellules par le SST3 ont consisté à protéger les cellules eucaryotes de la lyse par des composés osmoprotecteurs.

La formation de pores de translocation par *Y. pseudotuberculosis* a été mise en évidence par protection de la lyse d'érythrocytes par des osmoprotecteurs polysaccharidiques. Ils ont une taille comprise entre 1,2 et 3,5 nm (Hakansson *et al.*, 1996).

Chez *S. flexneri*, l'infection d'érythrocytes a permis d'observer que les trois translocateurs IpaB, IpaC et IpaD étaient nécessaires à la formation de pores d'une taille estimée à 2,6 nm de diamètre interne. De plus, ils sont composés des deux translocateurs hydrophobes, IpaB et IpaC, qui ont été détectés dans les membranes des cellules après infection (Blocker *et al.*, 1999).

En testant divers composés osmoprotecteurs, dans des modèles d'infection de macrophages et d'érythrocytes, la taille des pores formés par *P. aeruginosa* a pu être estimée entre 2,8 et 3,5 nm (Dacheux *et al.*, 2001). Leur formation dans ce modèle est dépendante de la présence des protéines PcrV, PopB et PopD.

Des pores d'une taille comprise entre 3 et 5 nm de diamètre interne ont été mesurés par osmoprotection et isolés à partir de membranes d'érythrocytes infectés par EPEC. Leur composition a été définie comme contenant EspB et EspD, les deux translocateurs hydrophobes (Ide *et al.*, 2001).

Mise en évidence des pores par fuite de fluorochromes

La formation de pores de translocation par *Y. enterocolitica* a été mise en évidence par l'utilisation de différents marqueurs fluorescents. Le test est basé sur la perméabilisation de la membrane par le pore de translocation permettant ou non l'entrée ou la sortie du marqueur de la cellule. Celui-ci, devient fluorescent après clivage par les estérases intracellulaires et est relargué dans le milieu extracellulaire après infection, confirmant la présence de pores. Inversement des marqueurs fluorescents dans le milieu extérieur, sont importés ou non dans les cellules après la formation de pores. En infectant les cellules chargées en fluorochrome, avec des souches n'exprimant pas certaines protéines du SST3, la formation du pore a été déterminée comme dépendante de YopB et YopD (Neyt and Cornelis, 1999). Ceci a été vérifié sur des liposomes purifiés après leur incubation avec *Y. enterocolitica* (Tardy *et al.*, 1999).

La mesure de la fuite de molécules fluorescentes suite à la formation de pores a aussi été utilisée *in vitro* sur des liposomes. Dans ce cas, ce sont des membranes artificielles qui ont été mises en contact avec un mélange stoechiométrique des protéines PopB et PopD purifiées. Des dextrans marqués par un fluorochrome ont été chargés à l'intérieur des liposomes dans des conditions de concentration telle que la fluorescence est atténuée. La formation de pores dans les liposomes favorise la fuite du fluorochrome dans le milieu extérieur, le diluant et entraînant l'augmentation de la fluorescence. Ceci a permis de mettre en évidence que les translocateurs purifiés sont capables de former des pores dans les liposomes d'une taille comprise entre 3,4 et 6,1 nm (Faudry *et al.*, 2006).

Formation de pores sur des modèles membranaires (liposomes)

Ce modèle a été utilisé pour pallier à la difficulté d'observer les pores directement à la surface des cellules (Tardy *et al.*, 1999 ; Faudry *et al.*, 2006).

Les structures insérées dans les liposomes, soit composées de PopB ou de PopD seuls et des deux protéines en mélange stoechiométrique, ont été observées par microscopie électronique à transmission (Schoehn *et al.*, 2003). Elles forment des anneaux dans les membranes de 8 nm de diamètre externe et 4 nm de diamètre interne. La purification des protéines insérées dans les liposomes montre que les anneaux sont composés des

deux protéines lorsque le mélange stoechiométrique a été utilisé. De plus, la protéine PcrV, translocateur hydrophile, n'interagit pas avec le pore, ni ne forme de telles structures dans ce modèle. Les auteurs ont proposé un modèle de formation des pores de translocation de *P. aeruginosa* (Figure 4.2).

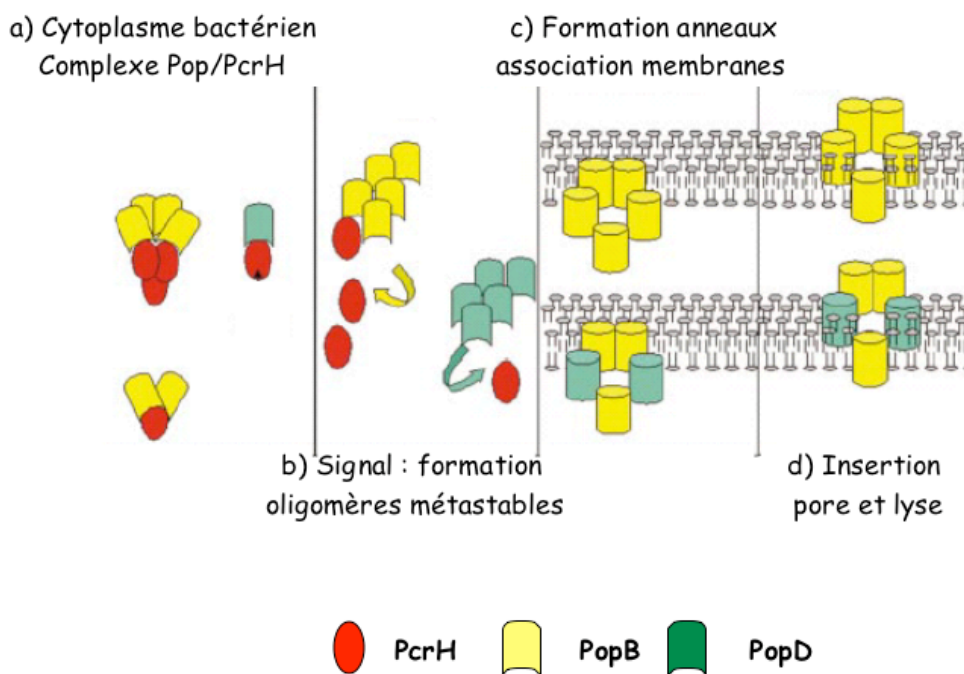


Figure 4.2 : Modèle de la formation du translocon par PopB et PopD chez *P. aeruginosa* (Source : Schoehn *et al.*, 2003).

a) La chaperone PcrH interagit avec PopB et avec PopD dans le cytoplasme bactérien. Le complexe PopB/PcrH forme des oligomères métastables tandis que PcrH/PopD forme un dimère simple. **b)** Le signal d'induction de la sécrétion qui, *in vivo* pourrait provenir de l'ATPase, est mimé *in vitro* par une diminution du pH. Celui-ci conduit à la sécrétion des Pops après libération de leur chaperone. Les Pops sécrétés forment entre eux des oligomères instables. **c)** Les Pops s'associent en homo ou hétéro-oligomères, formant des structures en anneaux. Ce phénomène se produit lors de l'interaction des Pops avec les radeaux lipidiques des membranes. **d)** L'anneau s'insère dans les membranes formant le pore de translocation et conduit à la lyse des liposomes.

L'utilisation de ce modèle a permis d'observer d'autres phénomènes (Faudry *et al.*, 2006). La capacité de former des pores est inhérente à chacun des translocateurs mais le mélange des deux permet d'augmenter considérablement cette efficacité : PopB et PopD agissent en synergie. En utilisant divers types de liposomes, les auteurs ont pu déterminer que le cholestérol n'était pas nécessaire à la formation de pores chez *P. aeruginosa* mais que les phospholipides, en particulier la phosphatidylsérine, le sont (Faudry *et al.*, 2006).

Quelles que soient la technique utilisée et l'espèce bactérienne étudiée, il a été observé que le pore formé dans les membranes eucaryotes contient chacun des translocateurs hydrophobes à une stoechiométrie qui est encore inconnue. De même, le nombre de sous unités de l'hétéroooligomère n'a pas pu être déterminé. Les tailles de ses structures sont sensiblement comparables et le diamètre interne est similaire à la taille du canal de sécrétion interne à l'aiguille (2,5 nm de diamètre en moyenne).

2.2 Caractéristiques du pore de translocation

La fonction principale du pore formé par les deux translocateurs hydrophobes est le passage des toxines à travers les membranes des cellules infectées. Les souches mutantes n'exprimant pas ces protéines ou leurs chaperones sont en effet incapables de transloquer les toxines dans les cellules (Bergman *et al.*, 1991 ; Francis *et al.*, 2001 ; Osiecki *et al.*, 2001 ; Broms *et al.*, 2003a).

L'homologie entre les translocateurs appartenant aux mêmes familles d'injectisome, est assez forte. Des études de complémentation de mutants, déficients pour l'expression d'un des translocateurs hydrophobes, ont été menées chez diverses bactéries. Ainsi, par exemple, *popB* ou *popD* sont capables de compléter une souche de *Y. pseudotuberculosis* qui n'exprime pas *yopB* ou *yopD*, respectivement (Frithz-Lindsten *et al.*, 1998). Mais ces observations ne s'appliquent pas entre les diverses familles d'injectisomes.

Au sein de la famille des injectisomes Inv-Mxi-Spa, les complémentations fonctionnelles sont aussi possibles mais de manière peu efficace : *sipB* de *S. typhimurium* complète un mutant *ipaB* par exemple (Hermant *et al.*, 1995).

Les études sur le pore de translocation ont montré que le translocateur hydrophile n'était pas inséré dans les membranes des cellules eucaryotes. Mais il est indispensable à la translocation. Les mutants n'exprimant pas ce facteur ne sont, en effet, pas capables d'injecter des toxines dans les cellules (Blocker *et al.*, 1999 ; Ide *et al.*, 2001 ; Osiecki *et al.*, 2001 ; Dacheux *et al.*, 2001 ; Schoehn *et al.*, 2003 ; Faudry *et al.*, 2006).

Les nouvelles données concernant ce translocateur, notamment sa localisation au sommet de l'aiguille, fait de lui un candidat "d'adaptateur" entre l'aiguille et le pore.

3. Le translocateur hydrophile

L'intérêt pour cette protéine a commencé il y a une cinquantaine d'années lorsque le caractère antigénique de LcrV de *Y. pestis* a été découvert (Burrows, 1956). En effet, cette protéine induit chez les souris une réaction immunitaire les protégeant contre la peste (Burrows, 1956). Ces propriétés antigéniques ont été mises en évidence pour d'autres orthologues de cette protéine.

3.1 Structure des translocateurs hydrophiles

Afin d'essayer de comprendre la fonction de cette protéine, ses domaines structuraux ont été définis par mesures biophysiques (analyses spectrométriques) et des structures tridimensionnelles ont été résolues par cristallographie aux rayons X. Ces données obtenues pour divers orthologues du translocateur hydrophile ont permis d'émettre des modèles et des hypothèses sur leurs fonctions.

Domaines structuraux : classement en différentes familles

L'analyse par des techniques de spectroscopies d'IpaD de *S. flexneri*, SipD de *S. typhimurium*, BipD de *Burkholderia pseudomallei*, LcrV de *Y. enterocolitica* et PcrV de *P. aeruginosa* ont permis d'apporter des informations quant à la structure et l'organisation en domaines des translocateurs hydrophiles (Espina *et al.*, 2006a ; Espina *et al.*, 2007 ; Markham *et al.*, 2008).

Ils ont été classés en deux familles : la famille IpaD comprenant IpaD, SipD et BipD, et la famille LcrV comprenant LcrV et PcrV. Ce classement repose principalement sur les propriétés de stabilité conformationnelle de ces protéines (Espina *et al.*, 2007 ; Markham *et al.*, 2008).

L'étude des structures secondaires a mis en évidence la haute teneur en hélices α de toutes ces protéines ainsi que la présence d'une torsade d'hélices ("coiled-coil") intramoléculaire. Ces observations ont été confirmées pour les protéines dont la structure tridimensionnelle a été déterminée (voir paragraphe suivant).

Les molécules de la famille IpaD présentent deux domaines de repliement indépendants : le domaine N terminal peu stable et le domaine C terminal très stable

qui contient le coiled-coil et qui est très conservé (Espina *et al.*, 2007 ; Markham *et al.*, 2008).

La famille LcrV comprend des molécules qui ne présentent pas deux domaines de repliement. La stabilité de ces protéines dépend fortement du pH : celle-ci augmente lorsque le milieu devient plus basique (Espina *et al.*, 2007 ; Markham *et al.*, 2008).

Structures cristallographiques

Plusieurs structures tridimensionnelles de ces protéines ont été résolues.

EspA est une protéine du SST3 de la famille SscA-Esc d'*E. coli*, orthologue de LcrV. Malgré une séquence protéique peu conservée par rapport à LcrV, EspA semble avoir une fonctionnalité similaire à cette dernière, ce qui est vérifié par la structure tridimensionnelle résolue (Yip *et al.*, 2005). Elle a été cristallisée en présence de sa chaperone intracellulaire, CesA. EspA polymérise en un long filament qui se positionne à l'extrémité de l'aiguille de sécrétion de type III des EPEC et EHEC. La présence de la chaperone a permis de la maintenir sous forme monomérique lors de la cristallogénèse. La protéine EspA comporte deux longues hélices α antiparallèles, situées aux extrémités de la molécule et reliées par une région peu structurée. Les deux hélices s'assemblent pour former une torsade d'hélices (coiled-coil) et cette propriété semble importante pour la polymérisation d'EspA. En effet, la chaperone CesA maintient EspA sous forme monomérique en empêchant la formation de ce coiled-coil (Yip *et al.*, 2005).

Les protéines **IpaD** de *S. flexneri* et **BipD** de *B. pseudomallei* ont aussi été étudiées et leur structure tridimensionnelles obtenues à une résolution de 3 et 2,8 Å, respectivement (Johnson *et al.*, 2007). Bien qu'IpaD et BipD ne partagent que 26% d'identité de séquence, principalement au sein de l'hélice α C terminale qui est conservée à 60%, leurs structures sont très proches. Les deux protéines présentent un long coiled-coil intramoléculaire entre une hélice interne, α_3 , et l'hélice C terminale α_7 . A chaque extrémité du coiled-coil, des domaines sont retrouvés. Un domaine N terminal, composé de deux hélices α pour IpaD et de trois hélices α et deux feuillets β pour BipD, est replié à un bout du coiled-coil. A l'autre extrémité, un domaine C terminal est replié et comporte trois feuillets β antiparallèles, trois hélices α et deux autres feuillets β pour IpaD ainsi que BipD (Figure 4.3 a et b).

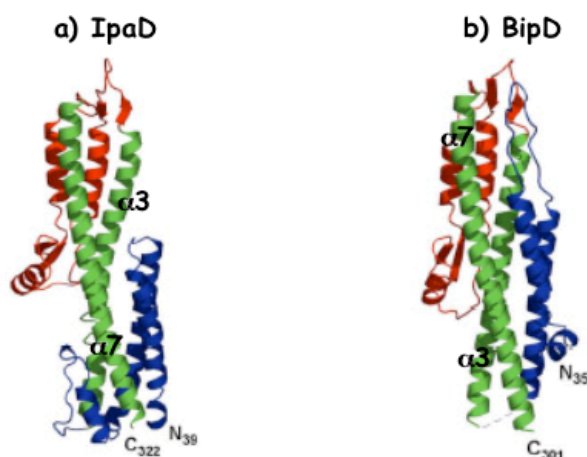


Figure 4.3 : Structure tridimensionnelle des translocateurs hydrophiles de *S. flexneri* et *B. pseudomallei* (Source : Johnson *et al.*, 2007).

Les domaines, C terminal représenté en rouge et N terminal représenté en bleu, sont repliés à chacune des extrémités d'une torsade centrale entre les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 7$ (coiled-coil) représentées en vert. **a)** Structure d'IpaD de *S. flexneri*. **b)** Structure de BipD de *B. pseudomallei*.

Le domaine N terminal d'IpaD est sensible à la protéolyse. Les auteurs proposent qu'il joue un rôle de chaperone intramoléculaire, dont la fonction serait de maintenir la protéine dans une configuration particulière. En effet, son absence conduit à une certaine flexibilité du coiled-coil et à l'oligomérisation en solution d'IpaD, observée lors d'expériences de chromatographie d'exclusion de taille (Johnson *et al.*, 2007).

La structure tridimensionnelle d'un autre dimère de BipD a été également résolue (Erskine *et al.*, 2006). Le monomère comporte aussi un coiled-coil intramoléculaire central et deux domaines aux extrémités. Le dimère se forme par interaction entre deux monomères *via* l'extrémité de l'hélice C terminale. Mais ce ne sont que des interactions non spécifiques de type liaison de Van der Waals qui permettent la formation de ce dimère, mettant en doute la pertinence biologique de cette structure.

La structure d'un triple mutant de **LcrV** (K40A/D41A/K42A) a été décrite à une résolution de 2,2 Å (Derewenda *et al.*, 2004). La protéine est en forme d'haltère avec deux domaines globulaires de part et d'autre d'un long coiled-coil (Figure 4.4 a et b). Le domaine globulaire N terminal contient six hélices α et deux feuillets β et le domaine globulaire central est composé de quatre hélices α et quatre feuillets β (Figure 4.4 b). Les hélices $\alpha 7$ et $\alpha 12$ sont antiparallèles et forment le coiled-coil. Elles interagissent par un mécanisme similaire à une fermeture éclair ("leucine zipper") qui met en jeu des interactions hydrophobes au niveau d'un motif conservé riche en leucines présent sur chacune des hélices. L'hélice 12 présente aussi un coude la séparant en deux régions, l'une contenant le motif leucine zipper, et l'autre parfaitement amphiphile à l'extrémité C terminale.

Les régions précédant les deux domaines globulaires qui les lie au coiled-coil, ont une structure très flexible (Figure 4.4 a). La région reliant l'hélice $\alpha 12$ C terminale et le domaine globulaire central est une région charnière. Sa flexibilité permettrait l'ouverture du coiled-coil en séparant les hélices $\alpha 7$ et $\alpha 12$ par l'entraînement de l'hélice $\alpha 12$. Il existerait donc plusieurs conformations de LcrV, dont une fermée (figure 4.4) et une ouverte (Derewenda *et al.*, 2004). L'étude de l'interaction entre LcrV et LcrG a mis en évidence que la liaison entre ces deux protéines s'effectue entre l'hélice $\alpha 7$ de LcrV et une hélice α N terminale de LcrG (Nilles, 2004 ; Hamad and Nilles, 2007). Ceci implique la formation d'un coiled-coil intermoléculaire (Matson and Nilles, 2001). En effet, des mutations ponctuelles au niveau de l'hélice N terminale de LcrG, ou au niveau de l'hélice $\alpha 7$ de LcrV abolissent l'interaction entre les deux molécules (Hamad and Nilles, 2007). Si l'interaction entre LcrV et LcrG est possible, ceci suggère bien que LcrV est capable de se trouver dans une conformation ouverte où son coiled-coil interne est séparé.

LcrV et PcrV présentent 41% d'identité de séquence dont 89% au sein de leur hélice C terminale. En se basant sur la structure de LcrV et sur les homologies entre les séquences des deux protéines une prédiction de la structure de PcrV a pu être réalisée (Quinaud *et al.*, non publié). Celle-ci est similaire à LcrV, en forme d'haltère avec deux domaines globulaires s'axant autour d'un coiled-coil formé par les hélices $\alpha 7$ et $\alpha 12$.

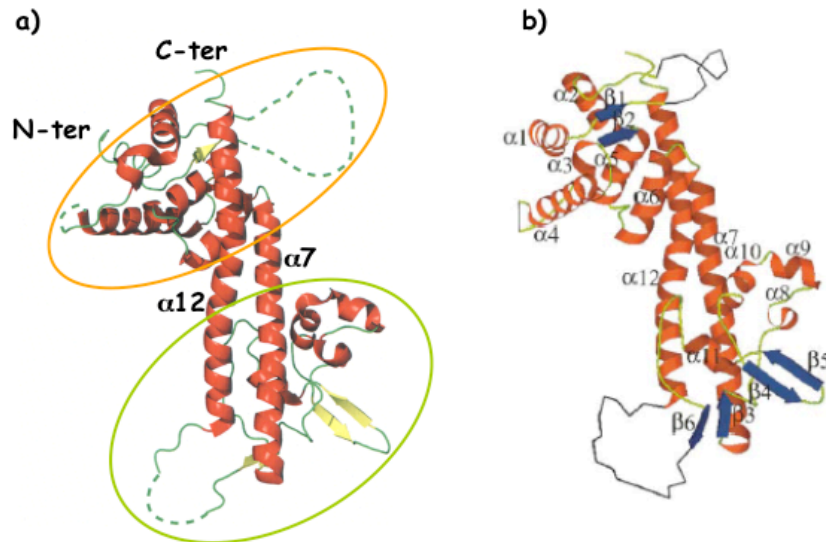


Figure 4.4 : Structure tridimensionnelle du translocateur hydrophile de *Y. pestis* (Source : Derewenda *et al.*, 2004).

a) La molécule a une forme d'haltère s'axant autour d'un coiled-coil central entre les hélices $\alpha 7$ et $\alpha 12$. Le domaine globulaire N terminal est entouré en orange et le domaine globulaire central en vert. Deux régions flexibles dont la structure n'a pas pu être déterminée font le lien entre chacun des domaines globulaires et le coiled-coil (trait vert pointillé). **b)** Représentation de la structure tridimensionnelle avec spécification de l'emplacement des hélices α et feuilletts β .

La structure globale de LcrV/PcrV et des translocateurs hydrophiles IpaD/BipD est assez similaire. Le coiled-coiled intramolécule est très conservé, et concerne une hélice α interne et l'hélice α C terminale pour toutes les protéines dont la structure a été résolue. C'est une structure qui est rarement observée au sein des protéines procaryotes. Mais, de façon surprenante, de nombreuses protéines du SST3 présentent un coiled-coil soit prédit, soit résolu. Ceci concerne des protéines qui interagissent avec d'autres partenaires protéiques (facteurs de transcription) ou avec elles-mêmes (protéine formant l'aiguille) ainsi que des protéines agissant dans le milieu eucaryote (certaines toxines) (Delahay and Frankel, 2002). Ainsi, ce coiled-coil si conservé parmi les translocateurs hydrophiles doit jouer un rôle important dans leur fonction. Il met toujours en jeu l'hélice α C terminale qui est la partie la plus conservée au niveau de la séquence protéique entre les différents orthologues.

De plus, des domaines sont retrouvés aux deux extrémités distales du coiled-coil intramolécule. Dans le cas de LcrV/PcrV ces domaines occupent un volume important tandis que pour BipD/IpaD, ils n'occupent que peu de place. Ces

différences de taille entraînent une variation de la structure des complexes qui peuvent être formés par ces molécules. C'est ainsi que, comme les domaines de LcrV sont plus volumineux, une structure visible en microscopie électronique à transmission (MET) a pu être visualisée pour la première fois au sommet des aiguilles de type III de *Y. enterocolitica* et a permis de déterminer la localisation du translocateur hydrophile avant l'infection.

3.2 Localisation du translocateur hydrophile

Lors d'études destinées à éclaircir les fonctions de LcrV, deux équipes différentes ont mis en évidence que cette protéine est présente à la surface des bactéries, et ce avant infection de cellules eucaryotes (Fields *et al.*, 1999 ; Pettersson *et al.*, 1999). Par marquage immunofluorescent et à l'or, LcrV a été observé : il s'organise en foyers distincts à la surface des bactéries mais n'est pas injecté dans le cytoplasme des cellules eucaryotes infectées.

Formation d'un complexe au sommet de l'aiguille de sécrétion

La localisation de LcrV avant l'infection a pu être observée à plus haute résolution en 2005 par visualisation d'une structure au sommet des aiguilles de sécrétion de type III de *Y. enterocolitica* (Mueller *et al.*, 2005). En effet, les aiguilles de la souche sauvage présentent à leur sommet une structure globulaire qui comprend trois parties : une tête, un col et une base (Figure 4.5 a). De plus, le canal creux de l'aiguille de sécrétion semble se prolonger au sein de cette structure. Elle n'est présente qu'à l'extrémité distale des aiguilles (Figure 4.5 a). Des anticorps dirigés contre LcrV permettent de ponter deux à deux les aiguilles purifiées, et ce par l'extrémité présentant le complexe globulaire, confirmant la nature du complexe.

Une souche n'exprimant pas *lcrV* mais complémentée pour l'expression de *pcrV* arbore des aiguilles ayant un complexe à leur sommet similaire à celui formé par LcrV (Figure 4.5 b). Il présente toutefois une base moins large, ce qui peut s'expliquer par la différence de taille entre PcrV (32 kDa) et LcrV (37 kDa). Ceci suggère que les aiguilles de *P. aeruginosa* portent à leur sommet un complexe formé de la protéine PcrV.

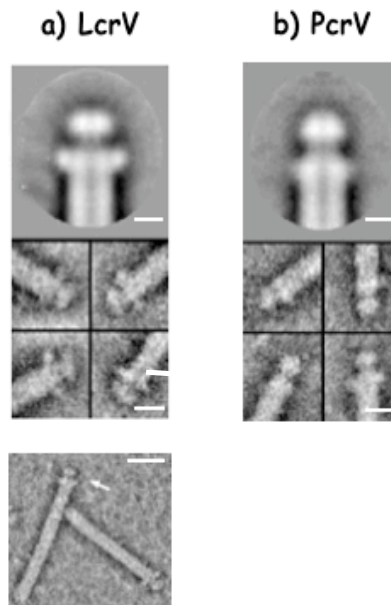


Figure 4.5 : Complexe formé par LcrV au sommet des aiguilles de *Y. enterocolitica* (Source : Mueller *et al.*, 2005).

Images de microscopie électronique à balayage d'aiguilles purifiées à la surface de différentes souches de *Y. enterocolitica* et colorées négativement.

a) En haut : Moyenne de projections d'images de complexes formés par une souche sauvage. Les trois parties (tête, col et base) se distinguent facilement. Echelle : 5 nm. Au milieu : exemples d'images indépendantes qui ont permis de produire la structure moyenne du dessus. Echelle : 10 nm. En bas : Image de l'aiguille avec le complexe LcrV à l'extrémité distale de l'aiguille. Echelle : 20 nm. **b)** En haut : Moyenne de projections d'images de complexes formés par une souche mutante n'exprimant pas *lcrV* complétée pour l'expression de *pcrV*. Les trois parties observées sur une aiguille sauvage sont retrouvées mais la base est moins large. Echelle : 5 nm. En bas : exemples d'images indépendantes qui ont permis de produire la structure moyenne du dessus. Echelle : 10 nm.

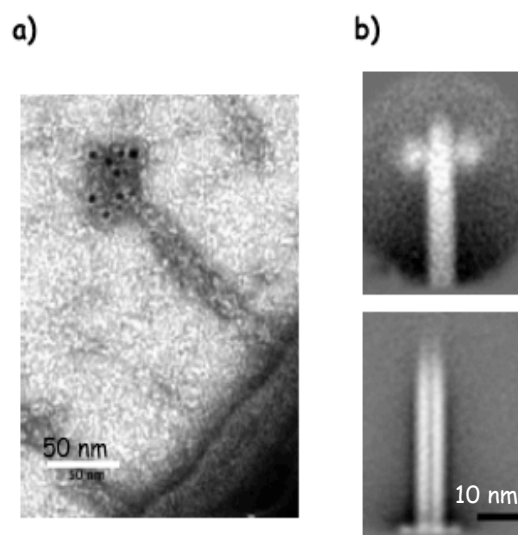
La stœchiométrie du complexe a été évaluée (Broz *et al.*, 2007). L'analyse par MET a permis de déterminer la masse par unité de longueur des aiguilles d'une souche sauvage de *Y. enterocolitica*. Connaissant le poids moléculaire de YscF, les auteurs ont déterminé que l'aiguille contient 139 ± 19 unités d'YscF.

La quantification de YscF et LcrV dans les purifications d'aiguilles a permis d'observer que la stœchiométrie LcrV/YscF est de 1 pour 32 ± 7 . Ainsi, le complexe LcrV au sommet de l'aiguille contient $4,3 \pm 1,1$ molécules de LcrV (Broz *et al.*, 2007).

IpaD, le translocateur hydrophile de *S. flexneri* a également été observé au sommet des aiguilles. Cette protéine a pu être observée après marquage immunfluorescent ou marquage à l'or (Figure 4.6 a) (Espina *et al.*, 2006b). IpaD n'est retrouvée qu'à

l'extrémité distale de l'aiguille après rasage de ces dernières de la surface des bactéries. L'étude de la localisation de mutants de cette protéine où, soit des domaines N terminaux, soit des domaines C terminaux, sont tronqués, a mis en évidence que la localisation distale d'IpaD est dépendante de la présence du domaine C terminal (40 derniers acides aminés) (Espina *et al.*, 2006b).

Les images de microscopie électronique n'ont pas permis d'observer une structure particulière sur ces aiguilles. Cependant, lorsque les bactéries induites sont traitées par un agent pontant et les aiguilles partiellement purifiées (solubilisation des membranes bactériennes en détergeant) avant observation en MET, une structure présentant deux densités globulaires peut être observée (Figure 4.6 b) (Sani *et al.*, 2007).



**Figure 4.6 : IpaD est situé au sommet des aiguilles de *S. flexneri*.
(Source : Espina *et al.*, 2006b et Sani *et al.*, 2007).**

- a)** Observation par marquage à l'or d'IpaD sur les aiguilles à la surface de *S. flexneri*.
b) En haut : Projection moyenne d'une centaine d'images d'IpaD au sommet d'aiguilles purifiées de *S. flexneri*. Une densité perpendiculaire à l'axe est observée à l'extrémité distale de l'aiguille. En bas : Projection moyenne d'une centaine d'images d'aiguilles purifiées à partir d'une souche n'exprimant pas *ipaD*.

Composition du complexe distal

Dans le cas de *Yersinia* spp., seul le translocateur hydrophile LcrV, dans l'état actuel des connaissances, semble présent au sommet des aiguilles avant l'infection des cellules eucaryotes.

Pour *Shigella* spp., d'autres expériences ont montré qu'IpaB était aussi associé à la surface des bactéries avant infection. En effet, le phénotype d'un mutant n'exprimant pas *ipaB* est le même que celui d'un mutant n'exprimant pas *ipaD* : la sécrétion des effecteurs est constitutive. Il est même proposé qu'IpaD et IpaB s'assemblent pour "boucher" l'aiguille en absence de stimulation (Johnson *et al.*, 2007). Par marquage à l'or et observation en MET, la localisation d'IpaB en clusters à la surface des bactéries a été observée (West *et al.*, 2005). D'autres auteurs n'ont toutefois pu observer la présence d'IpaB colocalisé avec IpaD, qu'en présence de sels biliaires (Olive *et al.*, 2007).

La présence d'IpaB dans le complexe situé au sommet des aiguilles a été confirmée par purification des aiguilles par chromatographie d'exclusion de taille (Veenendaal *et al.*, 2007). La composition des différentes fractions de purification a été analysée et les protéines MxiH (aiguille), IpaD et IpaB co-éluent, prouvant leur interaction. Ceci est vrai au sommet des aiguilles de *S. flexneri* car des anticorps dirigés contre l'une ou l'autre des protéines sont capables de ponter deux à deux des aiguilles purifiées, phénomène observé en MET. De plus, IpaD est présent à une quantité estimée à 10 fois supérieure à celle d'IpaB. Les auteurs proposent un modèle dans lequel le complexe au sommet des aiguilles de type III de *S. flexneri* est composé de quatre unités d'IpaD qui interagissent avec une molécule d'IpaB (Johnson *et al.*, 2007 ; Veenendaal *et al.*, 2007). IpaB a donc une localisation distale dépendante d'IpaD. Il jouerait le rôle de senseur des cellules eucaryotes et relayerait un signal à IpaD en leur présence. Celui-ci conduirait à la sécrétion du second translocateur hydrophobe, IpaC qui s'assemblerait avec IpaB pour former le pore de translocation (Veenendaal *et al.*, 2007). Les aiguilles de sécrétion d'une souche exprimant un double mutant de la protéine formant l'aiguille, MxiH P44A/Q51A, purifiées et analysées après chromatographie par exclusion de taille, présentent une copurification de protéines MxiH, IpaD, IpaB et IpaC. La quantité d'IpaC recrutée est très importante et sa localisation au sommet de l'aiguille a été observée par pontage d'aiguilles *via* un anticorps anti-IpaC. Ces observations prouvent que le troisième translocateur est capable d'être recruté au sommet de l'aiguille (Veenendaal *et al.*, 2007).

Orientation du complexe et modélisation

L'orientation de la protéine au sommet de l'aiguille a été examinée en exploitant le fait que les deux domaines globulaires de LcrV sont volumineux mais ont des tailles

variables chez ses orthologues (Broz *et al.*, 2007). En effet, ils sont moins volumineux chez PcrV et plus volumineux chez AcrV, orthologue de LcrV chez *Aeromonas salmonicida*. Quatre hybrides entre ces orthologues ont été créés (Figure 4.7 a). Pour déterminer leur orientation au sommet des aiguilles, les auteurs ont utilisé les différences de volume et de forme des complexes distaux formés au sommet des aiguilles de *Y. enterocolitica* (Broz *et al.*, 2007) (Figure 4.7 b). Ils proposent que la base est composée du domaine globulaire N terminal tandis que le domaine central forme la tête du complexe.

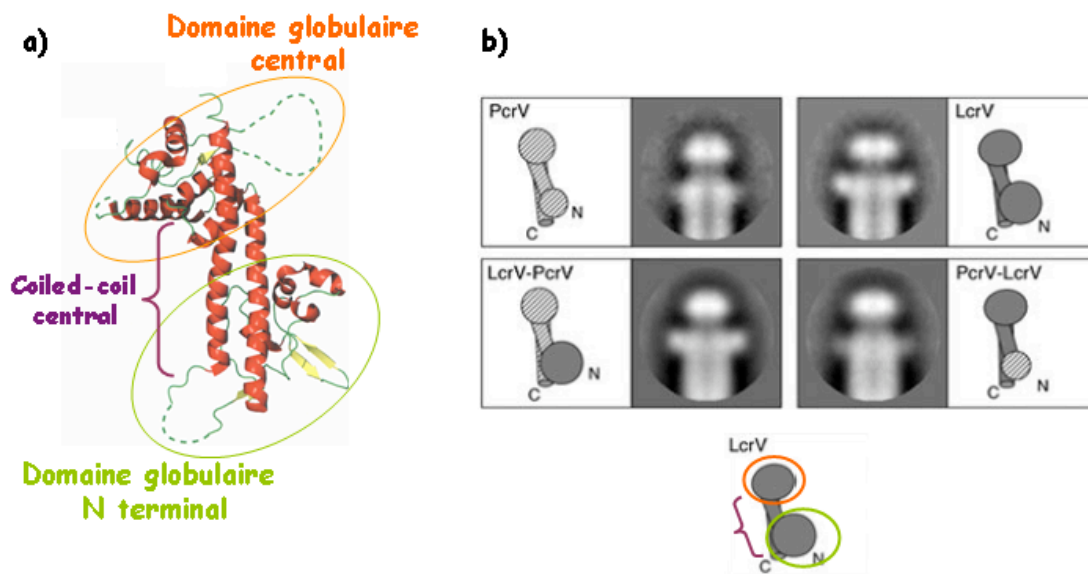


Figure 4.7 : Analyse de la structure des complexes de différents orthologues de LcrV et de protéines hybrides (Source : Broz *et al.*, 2007).
a) Schématisation des domaines de LcrV. Le domaine globulaire N terminal est encerclé en vert, le domaine globulaire central en orange, et le coiled-coil est indiqué par une accolade violette. C'est le domaine globulaire N terminal qui est échangé avec les orthologues PcrV et AcrV pour la formation des hybrides. Tout le reste de la molécule est d'origine. **b)** Moyenne d'images de MET à balayage des structures formées par LcrV, PcrV et leurs hybrides. Sur le côté sont schématisés les hybrides. La base du complexe PcrV (en haut à gauche) est plus étroite que celle du complexe LcrV (en haut à droite). L'hybride LcrV-PcrV (en bas à gauche) présente une base similaire à LcrV tandis que PcrV-LcrV (en bas à droite) ressemble à la base PcrV.

Connaissant l'orientation de LcrV au sommet de l'aiguille, la structure cristallographique du monomère et le nombre de sous unités moyen du complexe, une **modélisation d'une structure pentamérique de LcrV** a été proposée (Broz *et al.*, 2007 ; Figure 4.8 a). Cette modélisation implique l'application d'une symétrie

circulaire au monomère de LcrV, symétrie en 5 points par rapport à l'axe z. Celle-ci pourrait s'avérer incompatible avec la symétrie hélicoïdale de l'aiguille de sécrétion modélisée à partir de la structure de MxiH (Deane *et al.*, 2006), et avec laquelle ce complexe semble interagir directement.

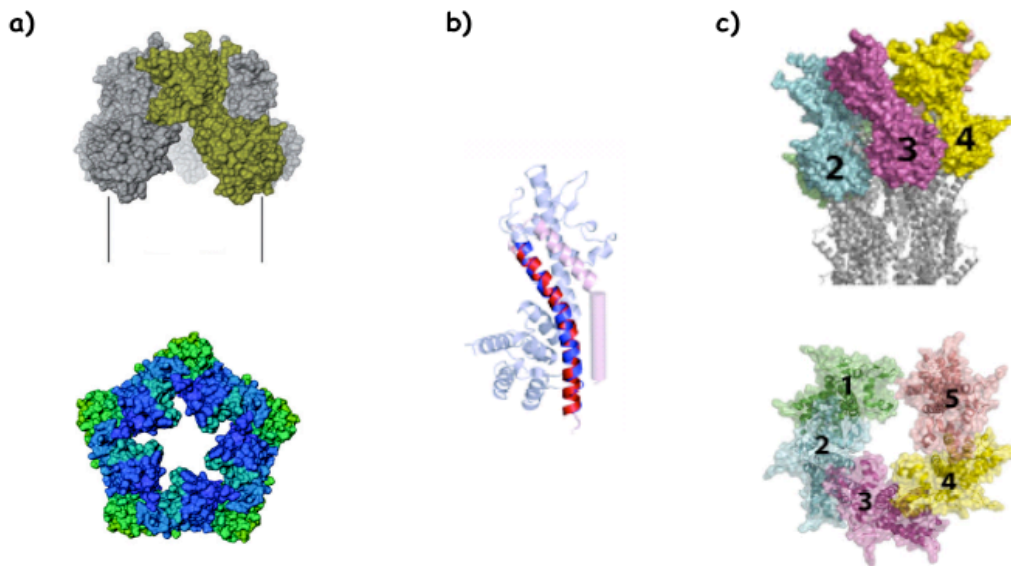


Figure 4.8 : Modélisations du complexe de LcrV.

a) Modélisation proposée après étude de l'orientation de LcrV au sommet des aiguilles (Source : Broz *et al.*, 2007). Au-dessus : Vue de face. Les traits noirs verticaux schématisent l'aiguille de sécrétion, un monomère est coloré en vert et les autres sont grisés. Au-dessous : Vue de dessus. Le pentamère est ouvert et présente un canal central d'environ 2,5 nm de diamètre. **b)** Superposition de la structure de LcrV, représentée en bleuté (Derewenda *et al.*, 2004) et de la structure de MxiH (Deane *et al.*, 2006) représentée en rosé. Les hélices C terminales de LcrV (en bleu) et de MxiH (en rouge) ont une structure similaire et sont superposées (Source : Deane *et al.*, 2006). **c)** Modélisation proposée avec l'étude de la structure de MxiH et la modélisation de l'aiguille de sécrétion de *S. flexneri* (Deane *et al.*, 2006). Au-dessus : Vue de profil du pentamère. Trois sous unités sont visibles qui sont colorées et représentées sur la structure de l'aiguille MxiH représentée en gris. Au-dessous : Vue de dessus du pentamère de LcrV en interaction avec l'aiguille MxiH (Source : Blocker *et al.*, 2008).

Hormis le nombre de sous unités et l'orientation des monomères de LcrV, ce modèle est différent de celui proposé un an auparavant lors de la modélisation de la structure de l'aiguille de *S. flexneri* (Deane *et al.*, 2006). Les auteurs avaient proposé une modélisation du **complexe LcrV au sommet de l'aiguille** en se basant sur l'homologie structurale forte entre les séquences C terminales de LcrV (hélice $\alpha 12$) et de MxiH (Figure 4.8 b). En effet, il avait été montré qu'IpaD interagit au sommet de

l'aiguille *via* son domaine C terminal (Espina *et al.*, 2006b ; Veenendaal *et al.*, 2007). La superposition des deux structures a donc été réalisée en polymérisant les unités LcrV sur l'aiguille MxiH. Ainsi, LcrV est incrémenté de la même manière que des unités de MxiH, avec une symétrie hélicoïdale dont les paramètres sont similaires à ceux de l'aiguille de sécrétion. Ceci conduit à la formation d'un complexe fermé qui contient 5 unités de LcrV pour être bien adapté à la taille de l'aiguille (Figure 4.8 c).

Après la résolution de la structure d'**IpaD de *S. flexneri***, une modélisation du complexe formé au sommet de l'aiguille a été proposé (Johnson *et al.*, 2007). Cette organisation est quelque peu différente du complexe LcrV. Elle est basée sur la résolution de la structure d'un dimère d'IpaD. Un pentamère a pu être construit par superposition itérative de dimères (Figure 4.9 a). Il n'est pas possible stériquement de produire une forme plus importante que le pentamère. Cette forme permet l'enfouissement de tous les domaines hydrophobes. Comme pour LcrV, le domaine globulaire N terminal est orienté du côté de l'aiguille de sécrétion (Johnson *et al.*, 2007).

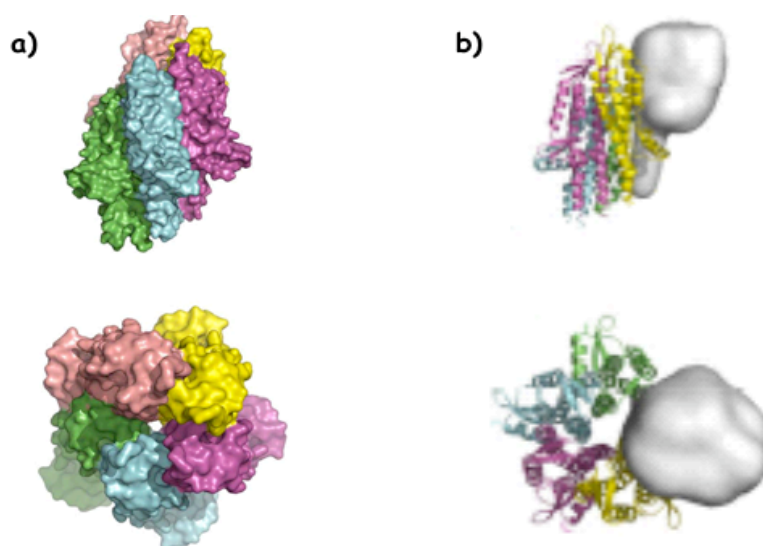


Figure 4.9 : Modélisation du complexe IpaD.

a) Modélisation d'un pentamère d'IpaD. Au-dessus est représentée une vue de côté et au-dessous, une vue du dessus. Chaque unité du pentamère est représentée en une couleur différente. Les unités sont incrémentées vers le haut de 4,6 Å et subissent une rotation de 72,2°. La forme proposée correspond à un état où le complexe est fermé (Source : Johnson *et al.*, 2007). **b)** Modélisation d'un hétéropentamère de quatre unités d'IpaD et d'une unité d'IpaB. Au-dessus est représentée une vue de côté et au-dessous, une vue du dessus. Chaque unité d'IpaD est représentée en une couleur différente, tandis qu'une prédiction de la structure d'IpaB est représenté en un domaine globulaire grisé. Ce complexe est aussi une forme fermée (Source : Blocker *et al.*, 2008).

Deux équipes ont proposé que ce **complexe soit mixte entre IpaD et IpaB** qui formeraient un bouchon au sommet de l'aiguille (Johnson *et al.*, 2007 ; Veenendaal *et al.*, 2007). La stœchiométrie proposée est de quatre molécules d'IpaD pour une molécule d'IpaB. Il est intéressant de noter que dans la structure prédite, et ceci dû à l'incrémentation en hauteur des sous unités d'IpaD, l'interface entre la dernière molécule d'IpaD et la première est différente des autres interfaces d'interaction du pentamère. Il est possible d'imaginer que cette place finale soit occupée, non par une molécule d'IpaD, mais par une molécule d'IpaB (Johnson *et al.*, 2007) (Figure 4.9 b).

Ces données montrent que le translocateur hydrophile se situe à une position stratégique et ce avant l'infection. Il semble y avoir des similitudes entre le fonctionnement des translocateurs hydrophiles des familles LcrV et IpaD (localisation, orientation, structure globale). Des différences sont tout de même notées (composition du complexe, fonction de chacun des domaines), qui pourraient être dues à la spécificité d'infection de chaque souche bactérienne.

3.3 Fonctions du translocateur hydrophile

Plateforme d'insertion d'un pore dans les membranes des cellules hôtes

La virulence de *Y. pseudotuberculosis* dépend de l'expression de *lcrV*. En effet, des souches mutantes n'exprimant pas *lcrV* ne sont pas capables d'injecter les toxines du SST3 (Pettersson *et al.*, 1999). La complémentation pour l'expression de protéines LcrV mutantes portant de petites délétions sur leurs extrémités C terminales n'est pas fonctionnelle. Ceci montre que la partie C terminale de LcrV est nécessaire à sa fonction dans l'injection des toxines (Pettersson *et al.*, 1999).

Ces mêmes observations ont été réalisées par une autre équipe (Fields *et al.*, 1999) sur des modèles d'infection de cellules. Les domaines C et N terminaux de LcrV sont nécessaires à la translocation des toxines.

LcrV est indispensable à la lyse de globules rouges, et son rôle est donc corrélé avec la capacité à former des pores dans ces cellules (Holmstrom *et al.*, 2001).

Malgré l'homologie entre les protéines PcrV et LcrV, PcrV n'est pas capable de compléter efficacement l'activité hémolytique d'une souche mutante n'exprimant pas *lcrV*. L'utilisation d'osmoprotectants a permis de définir la taille des pores formés

en présence de LcrV a environ 3 nm de diamètre tandis que ceux formés en présence de PcrV ne font qu'environ 2 nm. Les auteurs proposent donc que LcrV et PcrV sont des déterminants essentiels de la formation des pores et qu'ils jouent un rôle dans la définition de leur taille (Holmstrom *et al.*, 2001).

LcrV et PcrV ne montrent pas de spécificité vis à vis de leurs effecteurs natifs (Yops ou Exos) mais vis à vis de leurs translocateurs hydrophobes (Broms *et al.*, 2003b). Lorsque c'est l'opéron *lcrGVH_{yop}BD* qui n'est plus exprimé et complété par l'opéron entier *pcrGVH_{pop}BD*, la formation de pores est efficace (capacité d'hémolyse importante) et les pores formés ont une taille comparable aux pores formés par l'opéron natif.

Chez *P. aeruginosa*, PcrV est aussi nécessaire à la translocation des toxines, phénomène qui a été montré pour la translocation d'ExoU et d'ExoY qui est abolie en absence de PcrV (Sawa *et al.*, 1999). Comme chez *Yersinia* spp., les souches mutantes n'exprimant pas *pcrV* ne sont pas capables d'injecter des toxines dans les cellules (Goure *et al.*, 2004). La purification des membranes d'érythrocytes infectés par différentes souches de *P. aeruginosa* (une souche sauvage et une souche n'exprimant pas *pcrV*) et l'étude des protéines insérées dans ces membranes par western blot a mis en évidence que ce sont PopB et PopD qui forment le pore membranaire. PcrV, quant à lui, n'est jamais présent dans les membranes des cellules infectées. Par contre, son expression est nécessaire à l'insertion de PopD dans les membranes. PopB est inséré en absence ou en présence de PcrV, mais en absence de PopD, il ne forme pas de pore de translocation fonctionnel (Goure *et al.*, 2004). Ainsi PcrV joue un rôle dans l'insertion et/ou la stabilisation du pore de translocation.

Un rôle similaire a été attribué à IpaD de *S. flexneri*. L'insertion de pores de translocation requiert les trois translocateurs : IpaB, IpaC et IpaD (Blocker *et al.*, 1999). Des souches n'exprimant pas *ipaD* ou *IpaB* ne sont, en effet, pas capables de lyser les érythrocytes. Une souche n'exprimant pas *ipaC* quant à elle est toujours capable d'insérer un peu d'IpaB dans les membranes des cellules hôtes expliquant une capacité résiduelle à l'hémolyse. Mais ce phénomène se produit de manière très peu efficace. Après purification des membranes de cellules infectées, IpaB et IpaC ont été détectées. IpaD, quant à lui, n'est pas inséré. IpaB et IpaC forment un pore de taille définie, phénomène qui requiert la présence d'IpaD. Le modèle proposé est que l'aiguille de sécrétion serait nécessaire à la présentation des protéines Ipa, dans une conformation un peu dépliée, à la surface des membranes eucaryotes ce qui permettrait leur insertion

efficace et la formation du pore de translocation (Blocker *et al.*, 1999). Un rôle direct d'IpaD dans la formation du pore a été mis en évidence : il est nécessaire à l'insertion d'IpaB et d'IpaC dans les membranes des cellules hôtes (Picking *et al.*, 2005).

Ces données combinées avec la localisation distale du complexe formé par le translocateur hydrophile au sommet de l'aiguille, suggèrent un rôle de plateforme d'assemblage, ou de chaperone extracellulaire au pore de translocation.

Senseur du contact cellulaire

Les modélisations des complexes formés par LcrV et IpaD au sommet des aiguilles de sécrétion (ce chapitre, paragraphe 3.2) suggèrent qu'il existe deux formes distinctes de cette structure. Une forme fermée, proposée par la modélisation d'un pentamère d'IpaD ou d'un hétéro-pentamère d'IpaD et d'IpaB (Johnson *et al.*, 2007), et une forme ouverte, proposée par la modélisation d'un pentamère de LcrV au sommet du modèle de l'aiguille de *S. flexneri* (Deane *et al.*, 2006). Ce dernier modèle arbore un canal central qui correspond au diamètre de l'aiguille et du pore de translocation (2,5 nm). Le modèle fermé ne permettrait pas le passage de molécules et expliquerait la théorie du "bouchon" formé par IpaB et IpaD chez *S. flexneri*. Ce bouchon pourrait être soit ouvert soit détaché lors du contact cellulaire ce qui permettrait la sécrétion des effecteurs. Ainsi, la structure formée par les translocateurs au sommet de l'aiguille pourrait avoir un rôle de senseur du contact cellulaire et transmettre des informations à l'aiguille qui seront véhiculées à la base du SST3 et dans le cytoplasme bactérien (Blocker *et al.*, 2008).

Régulation de la sécrétion des effecteurs

La plupart des translocateurs hydrophiles ont aussi un rôle dans la régulation de la sécrétion des effecteurs.

LcrV remplit un rôle important dans la régulation de l'expression de l'opéron *lcrGVHyopBD* de part son interaction avec la protéine LcrG (ce chapitre, paragraphe 1). L'interaction entre ces deux protéines permet de contrôler la corrélation entre la synthèse des effecteurs et leur sécrétion lors d'une induction du SST3 (Matson and Nilles, 2001).

LcrV a aussi un rôle de protéine régulatrice dans le cadre de la réponse à une concentration en calcium dans le milieu extracellulaire faible, ceci en concert avec la protéine LcrH codée par le même opéron (Price *et al.*, 1991 ; Bergman *et al.*, 1991). Les espèces appartenant à la famille *Yersinia* spp. ont une croissance normale à 26°C et à 37°C. Par contre à cette dernière température, en absence de calcium dans le milieu, la croissance est limitée à la faveur de l'expression des gènes de virulence du SST3. L'opéron *lcrGVH* fait partie des gènes dont l'expression dépend de la faible concentration extracellulaire en calcium. LcrH régule négativement l'expression de ces gènes (à 37°C en présence de calcium) tandis que LcrV lève la répression par LcrH à 37°C en absence de calcium, conduisant à l'expression des gènes de virulence. De plus, LcrV va engendrer le phénomène de limitation de la croissance des bactéries lors de l'expression de ces gènes. En effet, une souche mutante n'exprimant pas *lcrV* est capable d'avoir une croissance forte en absence de calcium contrairement à la souche sauvage. De plus, l'expression des translocateurs et effecteurs (YopB, YopD et YopJ) y est considérablement réduite (Price *et al.*, 1991 ; Bergman *et al.*, 1991). Ainsi, LcrV joue aussi un rôle de régulateur positif de l'expression de gènes de virulence, contrecarrant l'action répressive de LcrH. Le mécanisme moléculaire de ces deux phénomènes n'est, à ce jour, pas encore compris.

Malgré les homologies entre LcrV et PcrV, cette fonction dans la régulation de l'expression des gènes du SST3 n'est toutefois pas remplie par ce dernier chez *P. aeruginosa* (Goure *et al.*, 2004).

Chez *S. flexneri*, IpaD joue un rôle dans la régulation de la sécrétion des effecteurs et le contrôle du taux de sécrétion lorsque le SST3 est induit. Des souches n'exprimant pas *ipaB* et *ipaD* sécrètent une quantité de protéines Ipa plus importante que la souche sauvage (Menard *et al.*, 1994). L'augmentation de la sécrétion est due à une augmentation du taux de protéines transférées du cytoplasme bactérien vers le milieu extérieur et non à leur surexpression (Menard *et al.*, 1994).

L'induction de la sécrétion est réalisée par l'interaction avec les cellules hôtes ou mimée artificiellement par le colorant rouge congo. Les deux mutants *ipaD* et *ipaB* conduisent à un phénotype de sécrétion constitutive d'IpaC en présence ou en absence d'induction du SST3. Il est proposé qu'IpaD forme un bouchon avec IpaB qui empêche la sécrétion des effecteurs en dehors de l'infection (Picking *et al.*, 2005).

L'avancée des connaissances sur la position de ces deux protéines au sommet de l'aiguille concorde avec cette hypothèse.

Rôle dans l'immunité

La protéine LcrV est capable de moduler la réponse immunitaire de l'hôte et par là, possède une activité anti-inflammatoire (Sing *et al.*, 2002). Cette caractéristique permet aux espèces *Yersinia* spp. d'échapper à la réponse immunitaire par détournement de la réponse immune innée. Cette propriété n'est, quant à elle, pas retrouvée pour PcrV (Sing *et al.*, 2002). Ceci pourrait expliquer la différence entre la virulence de *Y. pestis* et celle de *P. aeruginosa*. En effet, en échappant au système immunitaire, *Y. pestis* est très virulente et se propage rapidement tandis que *P. aeruginosa* n'est capable d'infecter que lorsque le système immunitaire de l'hôte est déficient.

La région N terminale de LcrV contient un motif qui est reconnu par les récepteurs CD14 et TLR2 (Sing *et al.*, 2002). L'interaction entre LcrV et ces récepteurs à la surface des macrophages conduit à l'induction de la production de la cytokine IL-10, qui joue un rôle anti-inflammatoire, et à l'inhibition de la production du TNF- α et de l'IFN- γ , cytokines pro-inflammatoires (Nedialkov *et al.*, 1997 ; Sing *et al.*, 2002). Ainsi, par le biais de cette protéine et de son interaction avec des récepteurs jouant des rôles importants dans l'organisation de la réponse immunitaire *via* l'inflammation, *Yersinia* spp. est capable de tromper le système immunitaire de l'hôte lui permettant de se répandre rapidement dans l'organisme.

3.4 LcrV/PcrV, candidats vaccinaux

Les caractéristiques antigéniques de la protéine LcrV ont été mises en évidence dans les années 50 lorsqu'il a été montré qu'elle induit chez les souris une réponse immune les protégeant contre la peste (Burrows, 1956).

Depuis, de nombreuses études ont été réalisées sur l'utilisation de cette propriété afin de développer une immunothérapie dirigée contre LcrV qui protégerait contre l'infection à *Y. pestis*. En effet, l'immunisation passive et active protège des modèles cellulaires et animaux de l'infection par cette bactérie (Motin *et al.*, 1994 ; Hill *et al.*, 1997 ; Hill *et al.*, 2006 ; DeBord *et al.*, 2006). Par exemple, l'immunisation passive par injection d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux (notamment le MAb 7.3) dirigés contre la protéine LcrV protège les modèles animaux d'infections létales à *Y. pestis*

(Motin *et al.*, 1994 ; Hill *et al.*, 1997 ; Hill *et al.*, 2006). Les anticorps protecteurs dirigés contre LcrV, par le blocage de cette protéine, semblent avoir deux champs d'action : inhibition de la translocation des toxines de *Y. pestis* dans les cellules (en empêchant l'insertion d'un pore de translocation fonctionnel) et protection de l'intégrité du système immunitaire de l'hôte (Pettersson *et al.*, 1999 ; Sing *et al.*, 2002). Des expériences par immunisation active de souris par différentes formes tronquées de LcrV ont permis de déterminer que la région protectrice majeure de LcrV est comprise entre les acides aminés 135 et 245 (Figure 41, Hill *et al.*, 1997). L'étude par immunisation passive par l'anticorps monoclonal MAb7.3 a montré que son épitope est compris entre les acides aminés 135 à 275 (Hill *et al.*, 1997).

De même, la protéine PcrV présente des propriétés antigéniques. Une immunisation passive par injection d'anticorps dirigés contre PcrV, ou active en injectant de la protéine recombinante, permet de protéger des souris et des modèles cellulaires contre des doses létales de *P. aeruginosa* (Sawa *et al.*, 1999). La survie des souris est alors considérablement augmentée. Ceci est vrai dans des modèles d'infection pulmonaires mais aussi d'infections de tissus brûlés (Sawa *et al.*, 1999 ; Neely *et al.*, 2005). L'immunisation contre PcrV conduit à l'inhibition de l'injection des toxines dans les cellules, en empêchant l'insertion de PopD dans les membranes et ainsi protège les cellules immunitaires qui ne sont plus détruites. Ainsi, l'action anti-phagocytaire de *P. aeruginosa* est bloquée, la réponse inflammatoire est diminuée, les bactériémies sont minimisées et le choc septique est empêché (Frank *et al.*, 2002 ; Neely *et al.*, 2005 ; Sawa *et al.*, 1999). Ces effets pourraient aussi être très utiles dans le cadre des infections chroniques des poumons par cette bactérie et ce par rehaussement du phénomène de clairance des bactéries au niveau de l'épithélium pulmonaire et par prévention de réactions inflammatoires trop importantes au niveau de ces tissus (Sawa *et al.*, 1999).

Des anticorps polyclonaux dirigés contre PcrV sont immunoprotecteurs. Un anticorps monoclonal protecteur, le MAb166, a été produit (Frank *et al.*, 2002). L'épitope reconnu par le Mab 166 est situé entre les acides aminés 144 et 257 (Frank *et al.*, 2002) et se superpose à celui de LcrV qui est compris entre les résidus 135 à 275 (Hill *et al.*, 1997), Figure 4.10). Ces régions protectrices comprennent le domaine globulaire central de LcrV et de PcrV, ainsi que l'hélice $\alpha 7$ qui est impliquée dans le coiled-coil intramoléculaire.

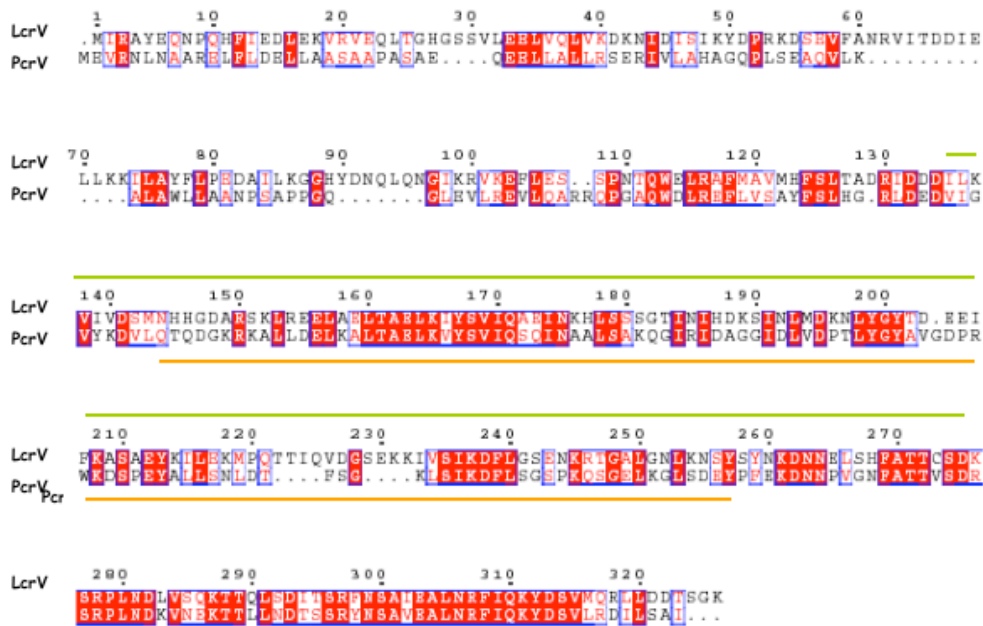


Figure 4.10 : Épitopes protecteurs de LcrV et de PcrV.

Alignement des séquences protéiques de LcrV et PcrV par le programme ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) et mises en forme à l'aide du serveur ESPript (Gouet *et al.*, 1999). Au dessus de la séquence de LcrV, l'épitope protecteur est surligné en vert, celui de PcrV est souligné en orange.

LcrV et PcrV sont nommés “antigènes V” ou “antigènes protecteurs” de part leur propriété antigénique que nous venons de décrire.

Il est intéressant de noter que dans le cas de PcrV, l'anticorps monoclonal protecteur, le Mab166, apporte une protection moins efficace que les anticorps polyclonaux. Pour établir une immunothérapie optimale contre *P. aeruginosa*, il faudrait déterminer d'autres épitopes protecteurs pour produire des anticorps monoclonaux dont l'efficacité de protection serait plus importante ou complémentaire au MAb166 pour les utiliser en cocktail dans le cadre de traitements contre l'infection à *P. aeruginosa*.

Sur le même modèle, il a été montré que des anticorps polyclonaux dirigés contre IpaD sont capables de protéger partiellement les érythrocytes contre l'infection par *S. flexneri* (Espina *et al.*, 2006b). Ces anticorps sont aussi capables de bloquer en partie l'invasion des cellules par la bactérie, ce qui a été observé par des expériences d'invasion de cellules HeLa en présence d'anticorps polyclonaux dirigés contre IpaD (Sani *et al.*, 2007). Il est à noter que, dans ce cas, le mécanisme d'action des anticorps protecteurs n'est pas encore déterminé.

Chapitre 5

Cadre et objectifs du projet de thèse

Les antibiotiques classiques sont de moins en moins efficaces pour le traitement des infections provoquées par certaines espèces bactériennes parmi lesquelles un grand nombre sont virulentes pour l'Homme. Ceci est dû à l'apparition de souches multirésistantes et à la transmission des éléments conférant ces résistances entre espèces bactériennes ainsi qu'au sein même de chaque espèce, phénomène favorisé par l'utilisation massive des antibiotiques.

De nouvelles stratégies de lutte contre les bactéries sont donc envisagées et certaines ciblent les facteurs de virulence. Dans le cadre de ces études, la recherche pour le développement d'immunothérapies contre les infections à *P. aeruginosa* et à *Y. pestis* a pour but d'altérer le fonctionnement du SST3. Pour cela, les antigènes V de ces deux espèces sont des candidats de choix. En effet, de par leur localisation à la surface de la bactérie et leur fonction de chaperones extracellulaires nécessaires à la formation de pores de translocation, elles sont indispensables à la virulence dépendante de l'activité du SST3.

Les stratégies développées sont soit l'utilisation de protéines recombinantes à injecter pour produire une immunisation de type active, soit la production d'anticorps monoclonaux pour une immunisation passive (Sawa and Wiener-Kronish, 2004). Un anticorps monoclonal dirigé contre PcrV (Frank *et al.*, 2002) et plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre LcrV (Hill *et al.*, 1997) sont connus comme étant protecteurs contre l'infection à *P. aeruginosa* et à *Y. pestis*, respectivement. Mais leur efficacité est encore trop faible pour leur utilisation en traitement contre l'infection ou en prophylaxie.

Les données concernant les antigènes V ne sont pas suffisantes et une connaissance plus approfondie notamment au niveau des mécanismes moléculaires de sa fonction permettrait de mieux cibler l'immunothérapie. En effet, par exemple, si les domaines indispensables au fonctionnement de la protéine sont connus, il serait intéressant de tester prioritairement l'efficacité d'anticorps dirigés contre ces régions.

L'objectif de cette thèse a été de déterminer quels sont les partenaires des antigènes V et de caractériser au niveau moléculaire la nature des interactions mises en évidence.

Pour ceci, plusieurs approches étaient possibles : une approche systématique où tous les composants du SST3 seraient testés pour leur interaction avec PcrV. La mise en place de techniques comme le double hybride ou des immunoprécipitations *in vivo* en utilisant un anticorps anti-PcrV auraient permis une telle approche.

La seconde façon d'aborder la question était une étude rationnelle, en se basant sur les données bibliographiques. C'est cette seconde approche que nous avons choisie. En effet, au début de cette thèse, il a été montré que LcrV forme une structure particulière au sommet des aiguilles de type III (Mueller *et al.*, 2005). Ceci, en plus de résultats sur la fonctionnalité des antigènes V obtenus dans le laboratoire (Goure *et al.*, 2004), suggère que cette protéine, à la surface de la bactérie, interagit avec l'aiguille de sécrétion, avec elle-même pour former un complexe multimérique et peut être aussi avec le pore de translocation qui est formé dans les membranes des cellules hôtes.

Dans ce travail, nous avons abordé les questions suivantes :

- PcrV et LcrV sont-elles capables de s'assembler en complexe multimérique ?
- PcrV interagit-t-elle directement ou non avec la sous-unité formant l'aiguille (PscF) ?

Pour répondre à ces deux questions nous avons émis l'hypothèse que ces protéines devaient se replier concomitamment pour interagir entre elles. En effet, *in vivo*, PscF et PcrV transitent par le canal de sécrétion sous forme dépliée et ne se replient qu'à sa sortie, position où les interactions que nous cherchons à mettre en évidence ont lieu.

Pour chacune des interactions, nous nous sommes aussi demandé :

- quel(s) est (sont) le(s) domaine(s) de la protéine V qui est (sont) impliqué(s) ?
- quel pourrait être le mécanisme d'assemblage des complexes mis en évidence ?

Pour aborder ces questions nous nous sommes basé sur des résultats de la littérature démontrant la nécessité d'un domaine particulier d'IpaD dans son interaction avec l'aiguille de *S. flexneri* afin d'orienter nos recherches (Espina *et al.*, 2006b ; Deane *et al.*, 2006 ; Veenendaal *et al.*, 2007).

Seconde partie

Matériel et méthodes

Chapitre 6

Techniques de biologie moléculaire

1. Souches et plasmides

Les souches bactériennes, les plasmides, les oligonucléotides ainsi que les stratégies de clonage utilisés pour les expériences réalisées dans le chapitre 9 (partie 1 : Oligomérisation de PcrV et de LcrV), sont décrits dans la partie “Experimental procedures” du manuscrit Gebus *et al.*, 2008.

Les souches et les plasmides qui n’ont pas été décrits et qui sont utilisés dans les chapitres 9 (partie 2 : Assemblage de PcrV sur les aiguilles de *P. aeruginosa*) et 10, sont présentés dans le tableau 2. Les oligonucléotides utilisés pour les clonages décrits ci-dessous sont présentés dans le tableau 3.

Toutes les souches de *P. aeruginosa* utilisées dérivent de la souche CHA, un isolat clinique d’un patient atteint de la mucoviscidose (Toussaint *et al.*, 1993 ; Dacheux *et al.*, 1999) qui est considéré comme la souche sauvage de référence de ce travail.

Une souche d’*E. coli* Top10 a été utilisée pour les expériences de clonage avec le kit comportant le vecteur à bouts francs pTOPO (Invitrogen). Toutes les surproductions de protéines ont été réalisées dans la souche *E. coli* BL21Star (DE3) (Invitrogen).

Souche ou plasmide	Particularités	Référence
Souches <i>P. aeruginosa</i>		
CHA	Souche mucoïde isolée des voies broncho-pulmonaires d'un patient atteint de mucoviscidose.	(Toussaint <i>et al.</i> , 1993)
CHAA Δ F	Souche CHA avec une délétion interne du gène <i>pscF</i> .	(Pastor <i>et al.</i> , 2005)
CHAA Δ fliC	Souche CHA avec une cassette gentamycine insérée ans le gène <i>fliC</i> : mutant non flagellé.	(Pastor <i>et al.</i> , 2005)
Souches <i>E. coli</i>		
TOP10	Cellules traitées chimiquement pour être compétentes à la transformation.	Invitrogen
BL21 (DE3)	F <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)gal dmc</i> (DE3)	Invitrogen
Plasmides		
Expression dans <i>P. aeruginosa</i>		
pIApG	Ap ^R , fusion transcriptionnelle entre le promoteur de l'opéron <i>pcrGVHpopBD</i> (pG) et le gène <i>gfpmut3</i> .	(Goure <i>et al.</i> , 2004)
pIApG- <i>pcrV</i>	Clonage <i>XbaI/HindIII</i> de <i>pcrV</i> dans pIApG, sous le contrôle de pG.	(Goure <i>et al.</i> , 2004)
pIApG-pB24	<i>pcrV</i> , amplifié à partir de l'ADN génomique de la souche <i>P. aeruginosa</i> PAO1 et inséré dans pB24, a été réamplifié à partir de ce plasmide et cloné par <i>NdeI/HindIII</i> dans pIApG sous contrôle de pG.	(Broz <i>et al.</i> , 2007) Ce travail
pIApG-pB25	<i>acrV</i> , amplifié à partir de l'ADN génomique de la souche <i>A. salmonicida</i> JF2267 et inséré dans pB25, a été réamplifié à partir de ce plamide et cloné par <i>NdeI/PstI</i> dans pIApG sous contrôle de pG.	(Broz <i>et al.</i> , 2007) Ce travail
pIApG-pB30	Fragment PCR de <i>lcrV₁₋₁₄₅/pcrV₁₂₄₋₂₉₄</i> amplifié à partir de pB30 cloné par <i>NdeI/HindIII</i> dans pIApG sous contrôle de pG.	(Broz <i>et al.</i> , 2007) Ce travail
pIApG-pB31	Fragment PCR de <i>pcrV₁₋₁₂₃/lcrV₁₄₆₋₃₂₄</i> amplifié à partir de pB31 cloné par <i>NdeI/HindIII</i> dans pIApG sous contrôle de pG.	(Broz <i>et al.</i> , 2007) Ce travail
pIApG-pB34	Fragment PCR de <i>lcrV₁₋₁₄₅/acrV₁₄₆₋₃₆₁</i> amplifié à partir de pB34 cloné par <i>NdeI/PstI</i> dans pIApG sous contrôle de pG.	(Broz <i>et al.</i> , 2007) Ce travail
pIApG-pB35	Fragment PCR de <i>acrV₁₋₁₄₃/lcrV₁₄₆₋₂₉₄</i> amplifié à partir de pB35 cloné par <i>NdeI/HindIII</i> dans pIApG	(Broz <i>et al.</i> , 2007) Ce travail

	sous contrôle de pG.	
pIApG-pB42	lcrV , amplifié à partir du plasmide pYV de la souche <i>Y. enterocolitica</i> E40 et cloné dans pB42, a été réamplifié à partir de ce plasmide et cloné par <i>NdeI/PstI</i> dans pIApG sous contrôle de pG.	(Broz <i>et al.</i> , 2007) Ce travail
pIApG- <i>pscF</i>	Clonage <i>NdeI/HindIII</i> de <i>pscF</i> dans pIApG, sous le contrôle de pG.	(Pastor <i>et al.</i> , 2005)
Expression dans <i>E. coli</i>		
pTOPO	Kn ^R , vecteur de sous-clonage à bouts francs.	Invitrogen
pET-Duet1	Ap ^R , Premier site de clonage multiple avec étiquette 6His en N terminal et second site de clonage multiple avec étiquette S en C terminal.	Novagen
pET-Duet1 - <i>pscF_{His6}-pcrV</i>	Insertion <i>NcoI/EcoRI</i> de <i>pscF_{His6}</i> dans le premier site de clonage multiple de pET-Duet1- <i>pcrV</i> ([Gebus, 2008 #63]) sans conservation de l'étiquette 6His.	Ce travail
pET-Duet1 - <i>pscF_{His6}-pcrVΔCter</i>	Insertion <i>NcoI/EcoRI</i> de <i>pscF_{His6}</i> dans le premier site de clonage multiple de pET-Duet1- <i>pcrVΔCter</i> (Gebus <i>et al.</i> , 2008) sans conservation de l'étiquette 6His.	Ce travail
pET-22b	Ap ^R , plasmide de surexpression, étiquette 6His en C terminal.	Novagen
pET-22b- <i>pscF</i>	Fragment PCR de <i>pscF</i> cloné par <i>NdeI/XhoI</i> dans pET-22b.	(Quinaud <i>et al.</i> , 2005)
pET-22b- <i>pscFV_{CterHis6}</i>	Fragment PCR de <i>pscF₁₋₆₅/pcrV₂₆₀₋₂₉₅</i> cloné <i>NdeI/HindIII</i> dans pET-22b en conservant l'étiquette 6His.	Ce travail

Tableau 2 : Récapitulatif des souches et plasmides utilisés pour cette étude.

Amorce	Séquence
Matériel et Méthodes 2.1	
CG_pG_APst	5' <u>ACTGCAGCAAATTGCGCCAAGAATGTC</u> 3'
CG_pG_VNde	5' <u>ACATATGGCAGAAGTCAGAAACC</u> 3'
CG_pG_VHind	5' <u>AAAGCTTCTAGTACGCGCTGAGAATG</u> 3'
CG_pG_ANde	5' <u>ACATATGTCAAGCACAAATCCCTG</u> 3'
CG_pG_LcrVNde	5' <u>ACATATGGCAATTAGAGCCTACG</u> 3'
CG_pG_LcrVHind	5' <u>AAAGCTTACCTCGTGTTCATCTAGCAG</u> 3'
Matériel et Méthodes 2.2	
CG_msPscF_A24V	5' <u>CCTTGTTTCGCTGCGTTCACCTGCTCCTTCAGG</u> 3'
CG_masPscF_A24V	5' <u>CCTGAAGGAGCAGGTGAACGCAGCGAACAAGG</u> 3'
CG_msPscF_A27V	5' <u>GACTGCCTTGTTCACTGCGTTGGCCTGC</u> 3'
CG_masPscF_A27V	5' <u>GCAGGCCAACGCAGTGAACAAGGACGTC</u> 3'
CG_msPscF_N28S	5' <u>CGTTGACGTCCTTGCTCGCTGCGTTGGC</u> 3'
CG_masPscF_N28S	5' <u>GCCAACGCAGCGAGCAAGGACGTCAACG</u> 3'
CG_maPscF_D30A	5' <u>CGTCGTTGACGGCCTTGTTTCGCTGCGTT</u> 3'
CG_masPscF_D30A	5' <u>AACGCAGCGAACAAGGCCGTCAACGACG</u> 3'
CG_maPscF_D45A	5' <u>CCGCCGGGTTGGCGGCATTGTCGGTCCCCT</u> 3'
CG_masPscF_D45A	5' <u>AGGGGACCGACAATGCCGCCAACCCGGCGG</u> 3'
CG_msPscF_P47A	5' <u>GCTCGGCCAGCAGCGCGGGCGTTGTCGGCATTG</u> 3'
CG_masPscF_P47A	5' <u>CAATGCCGACAACGCCGCGCTGCTGGCCGAGC</u> 3'
CG_msPscF_Q54A	5' <u>CTTGTTGATCTTGTGGGCCAGCTCGGCC</u> 3'
CG_masPscF_Q54A	5' <u>GGCCGAGCTGGCCCAACAAGATCAACAAG</u> 3'
CG_msPscF_R75A	5' <u>CCTTGCATCAGGTCGGCCAGCGCACGGGTC</u> 3'
CG_masPscF_R75A	5' <u>GACCCGTGCGCTGGCCGACCTGATGCAAGG</u> 3'
CG_msPscF_D76A	5' <u>GCCTTGCATCAGGGCGCGGACCGCACG</u> 3'
CG_masPscF_D76A	5' <u>CGTGCGCTGCGCCGACCTGATGCAAGC</u> 3'
Matériel et Méthodes 2.3	
CG_FNcoI	5' <u>ACCATGGCGCAGATATTCAACC</u> 3'
CG_FEcoRI	5' <u>AGAATTCCTCAGTGGTGGTGGTGGTG</u> 3'
Matériel et Méthodes 2.3	
FNde	5' <u>CCATATGGCGCAGATATTCAACCC</u> 3'
asF65Vktt	5' <u>CGTTGAGCAGGGTGGTCTTGTGTAGATGACCGACCA</u> 3'
sVktt	5' <u>CAAGACCACCCCTGCTCAACGACA</u> 3'
asVXhoI	5' <u>CTCGAGGATCGCGCTGAGAATGTCG</u> 3'
Matériel et Méthodes 2.4	
V70DUp	5' <u>CAACATCAACTCGACGGACACCCGTGCGCTGCGC</u> 3'
V70Down	5' <u>GCGCAGCGCACGGGTGTCCGTCGAGTTGATGTTG</u> 3'
L74DUp	5' <u>CGGACACCCGTGCGGACCGCGACCTGATGC</u> 3'
L74Down	5' <u>GCATCAGGTCGCGGTCCGCGACGGGTGTCCG</u> 3'
M78DUp	5' <u>GCGGACCGCGACCTGACCAAGGCATCCTGCAGAAG</u> 3'

M78DDown	5' CTTCTGCAGGATGCCTTGGT <u>CC</u> AGGTCGCGGTCCGC 3'
L276D_sans	5' TCGGCGGTTCGAGGCG <u>GACA</u> ACCGCTTCATCCAG 3'
L276D_as	5' CTGGATGAAGCGGTTG <u>TCC</u> GCCTCGACCGCCGA 3'

Tableau 3 : Récapitulatif des oligonucléotides utilisés pour cette étude.

Les sites de restrictions ou les bases non complémentaires insérés dans les amorces sont soulignés.

2. Stratégies de clonage

2.1 Vecteurs de complémentation de *P. aeruginosa* CHAΔV

Les gènes codant pour *pcrV*, *lcrV*, *acrV*, *lcrV*₁₋₁₄₅/*pcrV*₁₂₄₋₂₉₄, *pcrV*₁₋₁₂₃/*lcrV*₁₄₆₋₃₂₄, *lcrV*₁₋₁₄₅/*acrV*₁₄₆₋₃₆₁ et *acrV*₁₋₁₄₃/*lcrV*₁₄₆₋₂₉₄ ont été amplifiées par la polymérase BD Advantage (Clontech) à partir des vecteurs pBAD/*MycHisA* permettant leur expression respective dans *Y. enterocolitica* (Tableau 1 de Broz *et al.*, 2007). Les amorces utilisées pour les PCR sont CG_pG_VNde et CG_pG_VHind, CG_pG_LcrVNde et CG_pG_LcrVHind, CG_pG_ANde et CG_pG_APst, CG_pG_LcrVNde et CG_pG_VHind, CG_pG_VNde et CG_pG_LcrVHind, CG_pG_LcrVNde et CG_pG_APst, CG_pG_ANde et CG_pG_LcrVHind, respectivement. Les produits de PCR obtenus ont été sous-clonés dans le vecteur pTOPO puis vérifiés par séquençage double brin. Les fragments de digestion *NdeI*/*HindIII* de *pcrV*, *lcrV*, *lcrV*₁₋₁₄₅/*pcrV*₁₂₄₋₂₉₄, *pcrV*₁₋₁₂₃/*lcrV*₁₄₆₋₃₂₄ et *NdeI*/*PstI* de *acrV*, *lcrV*₁₋₁₄₅/*acrV*₁₄₆₋₃₆₁ et *acrV*₁₋₁₄₃/*lcrV*₁₄₆₋₂₉₄ ont été insérés dans le vecteur pIApG à la place du gène *gfpmut3*, sous contrôle du promoteur pG (Goure *et al.*, 2004). Ces clonages ont généré les plasmides pIApG-pB24 (*pcrV*), pIApG-pB42 (*lcrV*), pIApG-pB30 (*lcrV*₁₋₁₄₅/*pcrV*₁₂₄₋₂₉₄), pIApG-pB31 (*pcrV*₁₋₁₂₃/*lcrV*₁₄₆₋₃₂₄), pIApG-pB25 (*acrV*), pIApG-pB34 (*lcrV*₁₋₁₄₅/*acrV*₁₄₆₋₃₆₁) et pIApG-pB35 (*acrV*₁₋₁₄₃/*lcrV*₁₄₆₋₂₉₄), respectivement. Ceux-ci ont été transformés dans la souche mutante de *P. aeruginosa* CHAΔV comme décrit antérieurement (Chuanchuen *et al.*, 2002).

2.2 Vecteurs d'expression des mutants de PscF dans *P. aeruginosa*

Les vecteurs permettant l'expression des dix mutants de PscF étudiés par complémentation de la souche *P. aeruginosa* CHAΔF (Pastor *et al.*, 2005) ont été créés par mutagenèse dirigée sur le plasmide pIApG-*pscF* (Pastor *et al.*, 2005). Le kit "QuickChange mutagenesis" (Stratagene) a été utilisé selon le protocole du fournisseur pour générer les mutants A24V, A27V, N28S, D30A, D45A, P74A, Q54A, P47A/Q54A, R75A et D76A en utilisant la matrice pIApG-*pscF* et les amorces listées dans le tableau 3. Les plasmides pIApG-*pscF* mutés ont été transformés dans la souche CHAΔF pour des études phénotypiques selon le protocole décrit antérieurement (Chuanchuen *et al.*, 2002).

2.3 Vecteurs d'expression dans *E. coli*

Pour la co-expression de PscF et de PcrV

La construction des vecteurs pET-Duet1-*pcrV* et pET-Duet1-*pcrV*Δ*Cter* est décrite dans la partie “Experimental procedures” du manuscrit Gebus *et al.*, 2008. Ces gènes ont été clonés dans le second site multiple de clonage de ce vecteur et l'étiquette S a été éliminée lors de l'insertion des séquences codantes.

Le fragment d'ADN codant pour *pscF_{His6}* a été amplifié par PCR en utilisant la polymérase BD Advantage (Clontech), le vecteur pET-22b-*pscF* comme matrice (Quinaud *et al.*, 2005) et les amorces CG_FNcoI et CG_FEcoRI. Le produit de PCR généré a été sous-cloné dans le vecteur pTOPO et vérifié par séquençage double brin. Le fragment de digestion *NcoI/EcoRI* a été inséré dans le premier site multiple de clonage des vecteurs pET-Duet1-*pcrV* et pET-Duet1-*pcrV*Δ*Cter* générant les plasmides pET-Duet1-*pscF_{His6}-pcrV* et pET-Duet1-*pscF_{His6}-pcrV*Δ*Cter*. Les plasmides ont ensuite été transformés dans une souche d'*E. coli* BL21 (DE3) pour la surexpression des protéines selon le protocole recommandé par le fournisseur.

Pour l'expression de la protéine hybride FV_{Cter}

La séquence codant pour la protéine hybride PscF₁₋₆₅-PcrV₂₆₀₋₂₉₅ a été générée par SOE-PCR (Splicing by Overlap Extension).

Le fragment codant pour *pscF₁₋₆₅* a été amplifié par PCR en utilisant la polymérase Vent (BioLabs) à partir du vecteur pIApG-*pscF* (Pastor *et al.*, 2005) et les amorces FNde et asF65Vktt générant un fragment dont une partie de la séquence terminale est identique au début de la séquence de *pcrV₂₆₀₋₂₉₅*. Celle dernière a été amplifiée par PCR à partir de la matrice pIApG-*pcrV* (Goure *et al.*, 2004) en utilisant la polymérase Vent et les amorces sVktt et asVXhoI.

Les deux produits de PCR obtenus ont été purifiés à partir d'un gel d'acrylamide 5% par diffusion sur la nuit à 37°C de l'ADN contenu dans le gel dans une solution de TE/NaCl (10 mM Tris/Hcl pH 7,6, 1 mM EDTA pH 8,0, 1 M NaCl). Après ce traitement, ils ont été utilisés comme matrice d'une troisième PCR réalisée avec les amorces FNde et asVXhoI et la polymérase Vent. Le produit de PCR a ensuite été sous-cloné dans pTOPO et vérifié par séquençage double brin. Le fragment de digestion *NdeI/XhoI* a été inséré dans le vecteur pET-22b (Novagen) en amont de

l'étiquette 6His générant le plasmide pET-22b-*pscFV_{CterHis6}*. Celui-ci a été transformé dans une souche d'*E. coli* BL21 (DE3) pour la surexpression de l'hybride selon le protocole recommandé par le fournisseur.

2.4 Mutagenèse dirigée sur les vecteurs d'expression dans *E. coli*

Pour la co-expression de PscF mutants et de PcrV

Une simple, une double et une triple mutation de *pscF* ont été générées par mutagenèse dirigée sur le plasmide pET-Duet1-*pscF_{His6}-pcrV*. Pour cela, le kit "QuickChange mutagenesis" (Stratagene) a été utilisé selon le protocole du fournisseur. La simple mutation D76A a été créée en utilisant les amorces CG_msPscF_D76A et CG_masPscF_D76A.

La double mutation P47A/Q54A a été générée en deux temps : en premier lieu c'est la simple mutation P47A qui a été créée par l'utilisation des amorces CG_msPscF_P47A et CG_masPscF_P47A, puis la seconde mutation a été réalisée sur le plasmide muté grâce aux amorces CG_msPscF_Q54A et CG_masPscF_Q54A.

La triple mutation V70D/L74D/M78D, quant à elle, a été générée en trois temps sur le même modèle que la double mutation : en premier lieu ce sont les amorces V70Dup et V70Down qui ont été utilisées sur le plasmide pET-Duet1-*pscF_{His6}-pcrV*, puis L74Dup et L74Down sur le plasmide simplement muté, et enfin M78DUp et M78DDown sur le plasmide doublement muté.

Toutes les mutations ont été vérifiées par séquençage double brin, et pour les mutants multiples, cette vérification a été réalisée entre chaque étape de mutagenèse.

Les trois plasmides pET-Duet1-*pscF_{His6}-pcrV* mutants ont été transformés dans une souche d'*E. coli* BL21 (DE3) pour la surexpression des protéines selon le protocole recommandé.

Chapitre 7

Microbiologie et biologie cellulaire

1. Conditions de culture

Les cultures liquides de *P. aeruginosa* ont été réalisées en milieu Luria-Bertani (LB) à 37°C et sous agitation à 300 rpm. Le milieu gélosé PIA (Pseudomonas Isolation Agar ; DIFCO) a été utilisé pour cultiver et sélectionner *P. aeruginosa* à 37°C.

Lorsque le maintien d'un plasmide conférant une résistance à l'ampicilline était nécessaire, de la carbénicilline a été ajoutée au milieu de culture à une concentration de 500 µg/ml et 300 µg/ml en milieu gélosé et liquide, respectivement.

2. Tests de la fonctionnalité du SST3

Les tests de **cytotoxicité envers les macrophages** et de mesures de l'**hémolyse**, ainsi que le protocole de **purification des membranes des érythrocytes** ont été décrits dans la partie "Experimental procedures" du manuscrit Gebus *et al.*, 2008.

Pour estimer la capacité de **translocation des toxines** de différentes souches de CHAΔV ou CHAΔF complémentées pour l'expression de protéines PcrV et PscF mutantes, nous avons utilisé un test d'infection de fibroblastes de souris NIH 3T3. Ceux-ci ont été donnés au laboratoire par le Docteur R. Scaife (Scaife *et al.*, 2003) et ont la particularité de surexprimer de l'actine-β-GFP (Green Fluorescent Protein) notée GFA. Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM (Gibco) complété de 10% de sérum de veau foetal inactivé (SVF, Gibco) et d'un mélange pénicilline/streptomycine à 100 unités/ml et 100 µg/ml (Gibco), respectivement. Le soir avant infection, les cellules ont étéensemencées dans une chambre à quatre puits à fond en verre (Lab-Teck I chamber, Nunc), dans du milieu DMEM/SVF ne contenant pas d'antibiotiques. Des précultures des souches bactériennes à tester ont été agitées sur la nuit dans du LB contenant de la carbénicilline si nécessaire et diluées le lendemain à une densité optique à 600 nm (DO₆₀₀) de 0,1 dans du LB sans antibiotiques. La croissance des bactéries a été prolongée pendant environ 3 heures jusqu'à ce qu'elles atteignent une DO₆₀₀ de 1,0. Les cellules 3T3 GFA ont été infectées à un MOI (Multiplicity Of Infection) de 10. Après quatre heures, les modifications de

la morphologie cellulaire ont été observées sous un microscope inversé à fluorescence (DM IRE 2, Leica). La translocation des toxines est considérée comme effective lorsque le réseau d'actine est désorganisé, phénomène dû à l'action des exotoxines ExoS et ExoT.

3. Test de l'intégrité du SST3

3.1 Capacité de synthèse et de sécrétion

Chaque souche mutante a été testée pour vérifier si elle est capable de former un SST3 fonctionnel et ainsi écarter l'éventualité qu'un défaut observé pour leur virulence ne provienne d'un manque à former ce système. Pour ceci, la synthèse et la sécrétion des translocateurs et effecteurs ont été vérifiées.

Des précultures des souches CHAΔV et CHAΔF exprimant les protéines PcrV et PscF sauvages et mutantes ont été cultivées dans du LB contenant de la carbénicilline. Elles ont ensuite été diluées à une DO₆₀₀ de 0,1 dans du milieu LB contenant 5 mM d'EDTA, pH 8,0 et 20 mM de MgCl₂ pour l'induction du SST3. L'incubation a été prolongée environ trois heures jusqu'à ce que les cultures atteignent une DO₆₀₀ de 1,0. Pour vérifier que la synthèse des translocateurs et effecteurs du SST3 est bien effective, 50 µl de culture ont été prélevés, centrifugés 1 minute à 6000g et le culot a été repris directement dans du bleu de charge (50 mM Tris/HCl pH 6,8, 4% p/v SDS, 10% v/v β-mercaptoéthanol, 0,04% p/v bleu de bromophénol) pour leur analyse. En parallèle, pour la sécrétion, 10 µl du surnageant de chacune des cultures ont été prélevés pour analyse. Les échantillons ont été déposés sur gel SDS/PAGE, migrés et transférés sur membrane de nitrocellulose. Les immunoblots ont été révélés en utilisant les anticorps primaires polyclonaux produits chez le lapin anti-PscF (Pastor *et al.*, 2005), anti-PcrV (Goure *et al.*, 2004), anti-PopB (Goure *et al.*, 2005), anti-PopD (Goure *et al.*, 2005) et anti-ExoS suivi de l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin conjugué à la HRP (Horseradish peroxydase, Sigma). Les membranes ont été développées en utilisant le kit de chimioluminescence "ECL" (Enhanced ChemioLuminescent, GE Healthcare).

3.2 Purification des aiguilles

Les souches CHA, CHAΔFliC, CHAΔV et CHAΔV complémentées pour l'expression de protéines PcrV mutantes ont été cultivées sur la nuit dans du LB à 37°C et sous agitation avec ou sans carbénicilline. Le lendemain, elles ont été diluées à une DO₆₀₀ de 0,1 dans 30 mL ou 500 mL de LB (selon que les observations aient été réalisées en western blot ou en MET, respectivement) contenant 5 mM d'EDTA pH 8,0 et 20 mM de MgCl₂. La croissance a été prolongée pendant environ 3 heures jusqu'à ce que les cultures atteignent une DO₆₀₀ de 1,0. Puis, les bactéries ont été centrifugées à 8000g pendant 10 minutes et à 4°C pour éliminer le surnageant de culture. Les culots ont été repris vigoureusement à 4°C dans 1/100^{ème} du volume initial de 50 mM Tris/Hcl, pH 7,5 pour détacher les aiguilles. Les bactéries ont été éliminées par centrifugation à 8000g pendant 10 minutes et le surnageant clarifié sur un filtre à 0,45 μm pour éliminer le reste des bactéries. Les aiguilles ont été précipitées par ultracentrifugation pendant 30 minutes à 20000g et à 4°C. Les culots obtenus ont été resuspendus dans 1/1000^{ème} du volume initial de 50 mM Tris/Hcl pH 7,5 et précipités dans une solution d'acide trichloroacétique à 10%. Les culots obtenus ont été lavés à l'acétone et analysés en western blot en utilisant les anticorps anti-PscF (Pastor *et al.*, 2005) et anti-PcrV (Goure *et al.*, 2004) suivis d'un anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à la HRP ou en MET pour CHAΔFliC.

3.3 Observation des aiguilles par MET

Directement sur la surface de la bactérie

Pour observer les aiguilles directement à la surface des bactéries, une préculture de la souche CHAΔFliC a été diluée à une DO₆₀₀ de 0,1 dans du LB contenant 5 mM d'EGTA pH 8,0 et 20 mM de MgCl₂. La croissance a été prolongée pendant environ 3 heures jusqu'à ce que la culture atteigne une DO₆₀₀ de 1,0. Les bactéries ont été centrifugées 5 minutes à 6000g et lavées dans du PBS 1X (Phospho Buffer Saline, pH 7,4). 1/200^{ème} de la culture a été déposé sur une grille de carbone/formvar (Electron Microscopy Science, Euromedex) et coloré à l'acide phosphotungstique 1% puis observé sur un microscope Philips CM12 à 100 kV, à un grossissement de 10000.

Sur des échantillons d'aiguilles purifiées

Pour vérifier l'intégrité du SST3, nous avons purifié les aiguilles à la surface des bactéries pour les observer en MET et voir si PcrV formerait un complexe à leur sommet. Pour ceci, nous avons dans un premier temps observé les aiguilles purifiées de la souche CHAΔFliC dont l'obtention a été décrite dans le paragraphe précédent (paragraphe 3.2). Celles-ci ont été déposées sur une grille de carbone/formvar et colorées à l'acétate d'uranyle 1% puis observées sur un microscope Philips CM12 à 100 kV, à un grossissement de 15000.

Chapitre 8

Techniques de biochimie

1. Purification des protéines

Les protocoles de purification des protéines PcrV sauvage et mutantes ainsi que de LcrV sont décrits dans la partie “Experimental procedures” du manuscrit Gebus *et al.*, 2008. La protéine mutante PcrV_{L262D/V273D} dont l’étude est abordée dans le chapitre 9 a été purifiée selon un protocole identique.

1.1 Co-purification de PscF_{His6} et de PcrV

L’expression de PcrV sans étiquette (témoin négatif de la co-purification) et les co-expressions de PscF_{His6} sauvage (ou mutants) et de PcrV ont été réalisées dans des cellules *E. coli* BL21Star (DE3) cultivées dans 900 ml de Terrific Both (12 g/l Bacto-tryptone, 24 g/l de Bacto-Yeast extract -extrait de levure-, 4% p/v de glycérol) tamponné par 100 ml d’une solution de phosphate de potassium (0,17M KH₂PO₄, 0,72 M de K₂HPO₄, pH 7,4). Les cultures ont été inoculées à une DO₆₀₀ de 0,1 puis l’expression des protéines a été induite à une DO₆₀₀ de 0,7 par ajout de 0,5 mM d’IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside). La croissance a ensuite été prolongée 3 heures à 37°C sous agitation à 210 rpm. Les bactéries ont ensuite été centrifugées à 6000g pendant 10 minutes, reprises dans du tampon 50 mM Tris/HCl, pH 8,8 contenant un cocktail d’inhibiteur de protéases (Complete, Roche), et lysées par trois passages consécutifs à la presse de French. Les débris cellulaires ont ensuite été éliminés par ultracentrifugation à 50000g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant de cette étape, contenant les protéines solubles, a été appliqué à une colonne échangeuse d’anions (HiTrapTMQHP 5 ml, GE Healthcare), préalablement équilibrée dans le tampon de lyse des bactéries. L’échantillon ne se fixant pas sur la colonne a été récupéré (“flow through”) et chargé sur une colonne d’affinité au nickel (HisTrapTMHP 5 ml, GE Healthcare) préalablement chargée en nickel (passage de 5 volumes d’une solution de 50 mM NiSO₄) et équilibrée dans du tampon 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM NaCl (IMAC). La colonne a ensuite été lavée par passage de 10 volumes de tampon IMAC contenant 20 mM d’imidazole, puis par 15 volumes d’IMAC contenant 50 mM d’imidazole. Enfin, les protéines fixées sur la colonne ont été éluées

par passage de 10 volumes d'IMAC contenant 200 mM d'imidazole, et, les fractions où les protéines PscF et PcrV co-éluent, ont été rassemblées et injectées sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille (HiLoad 16/60 SuperdexTM200, GE Healthcare). Cette colonne a été préalablement équilibrée dans 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl.

Les protéines éluées pendant les différentes étapes de purification ont été analysées par gel SDS-PAGE à 15% suivi d'une coloration au bleu de Coomassie ou d'un transfert sur membrane de nitrocellulose et immunomarquage. Pour ceci, les anticorps primaires anti-PscF (Pastor *et al.*, 2005) et anti-PcrV (Goure *et al.*, 2004) suivis de l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin conjugué à la HRP ont été utilisés. Les membranes ont été développées en utilisant le kit de chimioluminescence "ECL".

1.2 Purification de l'hybride FV_{Cter His6}

L'expression de l'hybride FV_{Cter His6} a été réalisée dans les mêmes conditions de culture décrites dans le paragraphe précédent. Les cultures ont été inoculées à une DO₆₀₀ de 0,1 et l'expression de la protéine induite par ajout de 0,5 mM d'IPTG à une DO₆₀₀ de 0,7. La croissance a été prolongée 3 heures à 37°C sous agitation à 210 rpm, puis les bactéries ont été récupérées par centrifugation à 6000g pendant 10 minutes. Le culot bactérien a été repris dans du tampon IMAC : 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM NaCl contenant un cocktail d'inhibiteur de protéases et lysé par trois passages consécutifs à la presse de French. Puis, la fraction soluble a été clarifiée par ultracentrifugation à 50000g pendant 30 minutes à 4°C et appliquée sur une colonne d'affinité au nickel (HisTrapTMHP 5 ml) préalablement chargée en nickel (passage de 5 volumes d'une solution de 50 mM NiSO₄) et équilibrée dans le tampon IMAC. La colonne a été lavée par passage consécutif de 10 volumes de tampon IMAC contenant 20 mM d'imidazole puis 15 volumes d'IMAC contenant 50 mM d'imidazole. La protéine hybride a été éluée par passage de 10 volumes d'IMAC contenant 200 mM d'imidazole et les fractions où elle est éluée ont été rassemblées et chargées sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille (HiLoad 16/60 SuperdexTM200), préalablement équilibrée dans 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl.

Les fractions contenant de la protéine ont été analysées par gel SDS-PAGE puis colorées au bleu de Coomassie ou transférées sur membrane de nitrocellulose et immunomarquées. Pour ceci, les anticorps primaires anti-PscF (Pastor *et al.*, 2005) et

anti-PcrV (Goure *et al.*, 2004) suivis de l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin conjugué à la HRP.

2. Caractérisation des protéines purifiées

2.1 Analyses biophysiques

L'analyse des structures tertiaires et secondaires de PcrV et des mutants de cette protéine a été réalisée par études biophysiques par dichroïsme circulaire (CD) en UVs proches et lointains, respectivement, selon le protocole décrit dans la partie "Experimental procedures" du manuscrit Gebus *et al.*, 2008. La structure tertiaire a également été suivie par mesure de la fluorescence des tryptophanes de la protéine (Gebus *et al.*, 2008).

Voici quelques explications concernant les principes de ces techniques.

La structure secondaire est suivie par dichroïsme circulaire (CD) dans les UV lointains, technique qui consiste en la mesure du spectre d'absorption de la lumière polarisée par la protéine entre 200 et 250 nm. Celle-ci permet de renseigner sur la composition de la protéine en hélices α , feuillets β et en structures désordonnées. Les spectres sont caractéristiques de ces structures secondaires. Pour PcrV, protéine fortement constituée d'hélices α , deux minima d'absorption de la lumière polarisée, caractéristiques de ce repliement, sont observés à 208 et 222 nm.

Le suivi de la structure tertiaire est réalisé par mesure du spectre d'absorption de la lumière polarisée par la protéine dans les UV proches (250 à 320 nm). L'intensité du signal recueilli renseigne sur la structure tertiaire : la présence d'un maximum ou d'un minimum d'absorption dans le spectre indique que les résidus aromatiques sont engagés dans des structures tertiaires stables. Dans le cas de PcrV, nous avons pu constater que dans des conditions natives, cette protéine présente un maxima d'absorption à 284 nm. La mesure par dichroïsme circulaire dans les UVs proches a été complétée par des mesures de la fluorescence intrinsèque des protéines. En effet, les protéines, par leurs résidus aromatiques, en particulier le tryptophane, présentent une émission de fluorescence intrinsèque lorsqu'elles sont excitées à une longueur d'onde de 280 nm. L'environnement dans lequel se situe(nt) le(s) tryptophane(s) excité(s) est important : en effet, selon qu'il(s) soi(en)t enfui(s) dans la protéine, en environnement hydrophobe ou accessible(s) au solvant, la longueur d'onde maximale de fluorescence

varie. Celle-ci se trouve décalée vers des longueurs d'ondes d'émission plus élevées lorsque les tryptophanes sont en milieu hydrophile (de l'ordre de 340-345 nm). En revanche, en milieu hydrophobe, les tryptophanes émettent à des longueurs d'onde plus faibles (de l'ordre de 335 nm). Ainsi, le suivi de la fluorescence des tryptophanes permet d'appréhender l'état de compaction des protéines et donc de suivre des modifications de leurs structures tertiaires.

2.2 Spectrométrie de masse

Spectrométrie de masse native

L'analyse des échantillons contenant des formes oligomériques de PcrV a été réalisée par spectrométrie de masse native afin de déterminer l'état multimérique de la protéine selon le protocole décrit dans la partie "Experimental procedures" du manuscrit Gebus *et al.*, 2008. L'échantillon a été vaporisé par une méthode douce, l'électronébulisation, ionisé et passé dans un champ électrique doux de type quadripolaire où il a été fragmenté. Puis, le rapport masse/charge (m/z) des fragments obtenus a été mesuré par la détermination du temps de vol pour chacun d'eux.

Spectrométrie de masse MS/MS

Afin de déterminer la composition de l'échantillon de PcrV_{L262D/V273D} en sortie de colonne de chromatographie d'exclusion de taille des fractions correspondant à des oligomères de cette protéine (fraction 3, chapitre 9, paragraphe 1.5), nous avons procédé à une analyse par spectrométrie de masse de type MS/MS de l'échantillon. Celle-ci a été réalisée par la plateforme LEDyP (Laboratoire d'Étude de la Dynamique des Protéomes) de l'iRTSV, au CEA de Grenoble. Pour cette étude, l'échantillon analysé a d'abord été déposé sur un gel SDS-PAGE (NuPAGE, 4-12% Bis-Tris, Invitrogen) et migré uniquement sur 0,5 mm. Celui-ci a été coloré au bleu de Coomassie (SimplyBlue™, Invitrogen) et la bande révélée dans les 0,5 mm a été découpée en quatre fragments. L'analyse a été réalisée par un système robotisé (Ultimate 3000, Dionex couplé à un Orbitrap, Therm Finnigan) après digestion à la trypsine et les spectres de masse (spectres MS/MS) ont permis l'identification des protéines contenues dans l'échantillon.

2.3 SEC-MALLS

L'analyse par SEC-MALLS (Size Exclusion Chromatography - Multi Angle Laser Light Scattering) a été réalisée au Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV) à Grenoble avec le Docteur Marguerite Rinaudo de l'équipe "Structures et fonctions des polysaccharides". L'échantillon à analyser a été injecté sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille (Superose 6™) équilibrée dans du tampon 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl. La séparation des protéines a été réalisée à 20°C à un débit de 0,5 ml/min. En sortie de colonne d'exclusion de taille, l'absorbance à 280 nm a été mesurée pour déterminer la concentration en chaque instant des différentes espèces séparées. En parallèle, une mesure de la diffusion de la lumière d'un faisceau laser a été relevée. Le faisceau laser émettant à 690 nm a une incidence perpendiculaire à l'échantillon sortant de la colonne et la diffusion est mesurée par un à douze détecteurs placés selon un angle variable autour du flux d'échantillon. Ces mesures ont été réalisées grâce à un détecteur DAWN-EOS (Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA). Pour chacun des angles où la lumière est diffusée, le signal observé est proportionnel à la concentration en protéine, à sa masse molaire et à une constante optique qui dépend de l'indice de réfraction spécifique de la solution. Dans le cas des protéines qui sont de petites molécules, cet indice de réfraction est supposé constant. En connaissant toutes ces données, les mesures de la diffusion et de la concentration de la protéine en sortie de colonne permettent de déterminer un poids moléculaire pour chaque espèce éluée. Ces calculs sont détaillés en annexe I (Vendrey *et al.*, 2005).

2.4 Analyse de la polymérisation par MET

L'analyse par MET des échantillons contenant des formes oligomériques de PcrV a été réalisée comme décrit dans la partie "Experimental procedures" du manuscrit Gebus *et al.*, 2008.

Les protéines PscF_{L70D/V76D/M78D} (PscF*) en association avec PcrV dont une fraction est éluée dans le volume mort de la colonne de chromatographie d'exclusion de taille (chapitre 10, paragraphe 1.2) ont été analysées par MET afin de vérifier que celles-ci n'agrègent pas mais que leur élution au volume observé est due à une polymérisation résiduelle de PscF*.

Il en est de même pour l'hybride FV_{CterHis6} élué dans le volume mort de la colonne d'exclusion de taille et pour lequel nous avons voulu vérifier la capacité de polymérisation (chapitre 10, paragraphe 1.3).

Chacun des échantillons a été déposé sur une grille de carbone/formvar (Electron Microscopy Science, Euromedex) à une concentration de 0,1 mg/ml et coloré à l'acétate d'uranyle 2% puis observé sur un microscope Philips CM12 à 100 kV, à un grossissement de 30000.

Troisième partie

Résultats et discussion

Chapitre 9

Mécanisme d'assemblage des antigènes V

Les résultats décrits dans ce chapitre ont pour la plupart été traités dans le manuscrit (Gebus *et al.*, 2008), auquel nous ferons référence et qui est intégré à la fin du chapitre.

La surproduction et la purification *in vitro* de PcrV étiquetée en N terminal par 6 histidines, permet d'isoler une forme monomérique de cette protéine (Schoehn *et al.*, 2003). LcrV est capable de former spontanément des dimères et même des oligomères de plus haut poids moléculaire (Lawton *et al.*, 2002 ; Hamad and Nilles, 2007). La forme oligomérique la plus abondante est le dimère, les autres formes n'ont pas été caractérisées plus en détail.

1. Oligomérisation de PcrV et de LcrV

Pour étudier la structure oligomérique et les régions de la protéine qui interviendraient dans le phénomène de multimérisation, nous avons choisi de modifier le protocole de purification de PcrV. Pour éliminer la possibilité que l'étiquette 6 histidines pourrait empêcher sa multimérisation spontanée, nous avons cloné la séquence codant pour la protéine dans un vecteur de surproduction qui nous a permis de la produire sans étiquette ("Experimental Procedures", (Gebus *et al.*, 2008). PcrV est surproduite puis purifiée en deux étapes : une colonne échangeuse d'anions suivie d'une colonne de chromatographie d'exclusion de taille ("Experimental Procedures", Gebus *et al.*, 2008). Son état monomérique a été évalué par cette seconde étape où elle est éluée à un volume qui correspond à celui d'une protéine globulaire d'environ 34 kDa (Figure 2a, (Gebus *et al.*, 2008). L'analyse en spectrométrie de masse native a confirmé son état monomérique (32354,6 Da contre 32461,0 Da prédits).

Les protéines qui sont acheminées à travers l'aiguille du système de sécrétion de type III, en raison de la taille étroite du canal (environ 3 nm de diamètre), ne peuvent pas l'être sous forme repliée. En effet, le canal n'est pas assez large pour accueillir des structures tertiaires, mais seules des structures secondaires comme les hélices α et les feuillets β peuvent y cheminer (Akeda and Galan, 2005 ; Deane *et al.*, 2006). Nous avons donc postulé que la protéine PcrV au cours de sa surproduction dans *E. coli* se repliait rapidement en monomères qui ensuite n'étaient plus capables d'interagir entre eux

pour former un complexe. Afin de trouver une solution pour mimer le passage de l'aiguille pour les monomères de PcrV, nous avons étudié les conditions permettant de modifier la conformation de la protéine.

1.1 Dépliement/repliement de PcrV

Cette étude a été réalisée grâce à des techniques de biophysique par suivi spectrométrique de l'évolution de la structure secondaire et de la structure tertiaire de la protéine sous diverses conditions afin de faire varier sa conformation.

Classiquement, les agents utilisés pour dénaturer les protéines sont : des agents chaotropiques comme l'urée ou la guanidine ou encore des conditions variables telles que le pH du tampon. Les tests de dénaturation de PcrV ont été réalisés par deux moyens différents : le chlorure de guanidium et la variation de pH. La réversibilité de la réaction (repliement de la protéine) a aussi été suivie dans chacun des cas.

Les mesures de dichroïsme circulaire en UVs lointains, UVs proches et de fluorescence des tryptophanes ont été mises en place pour suivre la structure de PcrV (pour plus de détails sur ces techniques, se référer au chapitre 8, paragraphe 2.1).

Pour l'émission de fluorescence des tryptophanes, nous avons vérifié le nombre et la position des tryptophanes de PcrV. Elle en compte trois (Trp⁶¹, Trp⁹² et Trp¹⁸⁶), qui en se basant sur la structure de LcrV (Derewenda *et al.*, 2004), sont situés pour les Trp⁶¹ et Trp¹⁸⁶ exposés au solvant. Le Trp⁹², quant à lui, est enfoui dans la zone hydrophobe d'interaction entre les hélices $\alpha 7$ et $\alpha 12$. Les mesures d'émission de fluorescence réalisées sont une moyenne de la contribution de chacun de ces tryptophanes. La longueur d'onde maximale d'émission de fluorescence est suivie pendant le traitement.

Nous présenterons aussi le suivi de la valeur corrigée de l'intensité d'émission de la fluorescence à 320 nm (signal mesuré à 320 nm – signal mesuré à 360 nm) lors du traitement. Il reflète de manière globale la variation des longueurs d'ondes d'émission de fluorescence. Plus ce rapport est petit, plus l'émission des tryptophanes se produit vers des longueurs d'onde faibles, et donc, plus ceux-ci sont exposés au solvant.

En CD dans les UVs proches, un maximum d'absorption de la lumière polarisée est observé à 284 nm pour PcrV dans des conditions natives, indiquant que la protéine est repliée. Les résultats seront présentés dans le paragraphe suivant sous forme du suivi de la valeur corrigée de l'intensité à 284 nm (signal mesuré à 284 nm – signal mesuré à

320 nm) en fonction du traitement. Plus ce rapport est important, moins la lumière est absorbée à 284 nm ce qui reflète un état relâché de la protéine.

Au niveau de sa structure secondaire, cette protéine contient majoritairement des hélices α (Derewenda *et al.*, 2004 ; Espina *et al.*, 2007). Le signal caractéristique des hélices α en CD dans les UVs lointains présente des minima à 208 et 222 nm. Pour simplifier la lecture, dans le paragraphe suivant, les résultats de CD en UVs lointains seront présentés comme le suivi de la valeur corrigée de l'intensité à 222 nm (signal mesuré à 222 nm – signal mesuré à 250 nm) en fonction des conditions testées. Plus le signal est faible, plus la lumière polarisée est absorbée à 222 nm, ce qui reflète une forte teneur en hélices α .

Déplie ment/replie ment par le chlorure de guanidium

Dans un premier temps, le déplie ment de PcrV a été induit par le chlorure de guanidium qui a été testé à des concentrations comprises entre 0 et 6M.

La longueur d'onde maximale d'émission de fluorescence des tryptophanes à des concentrations en guanidine faibles (0, 0,06 et 0,6 M) est stable et d'une valeur de 335 nm (Figure 9.1 a). Cette valeur correspond à une situation où l'exposition de la protéine au solvant est moyenne.

L'augmentation de la concentration en guanidine dans le milieu conduit à un décalage de la longueur d'onde maximale d'émission de 335 nm sans guanidine à 354 nm, pour une concentration en guanidine de 6M. Ce phénomène reflète le déplie ment de la protéine en présence de cet agent qui conduit à l'exposition des tryptophanes au solvant. A partir de 2M de guanidine, la protéine commence à se déplier et atteint un maximum à une concentration de 6M de guanidine.

Les mêmes observations peuvent être réalisées en suivant la valeur corrigée de l'intensité à 320 nm : plus la concentration en guanidine est importante, plus le signal est décalé vers des longueurs d'onde tendant vers 365 nm (Figure 9.1 a encart).

Les mesures de CD en UVs proches confirment la perte de structure tertiaire en parallèle de l'augmentation de la concentration en guanidine (Figure 9.1 b). La valeur corrigée de l'intensité à 284 nm augmente en parallèle à cette concentration : la protéine est de moins en moins structurée à partir de 2M de guanidine et atteint un maximum de déplie ment à 6M (Figure 9.1 b).

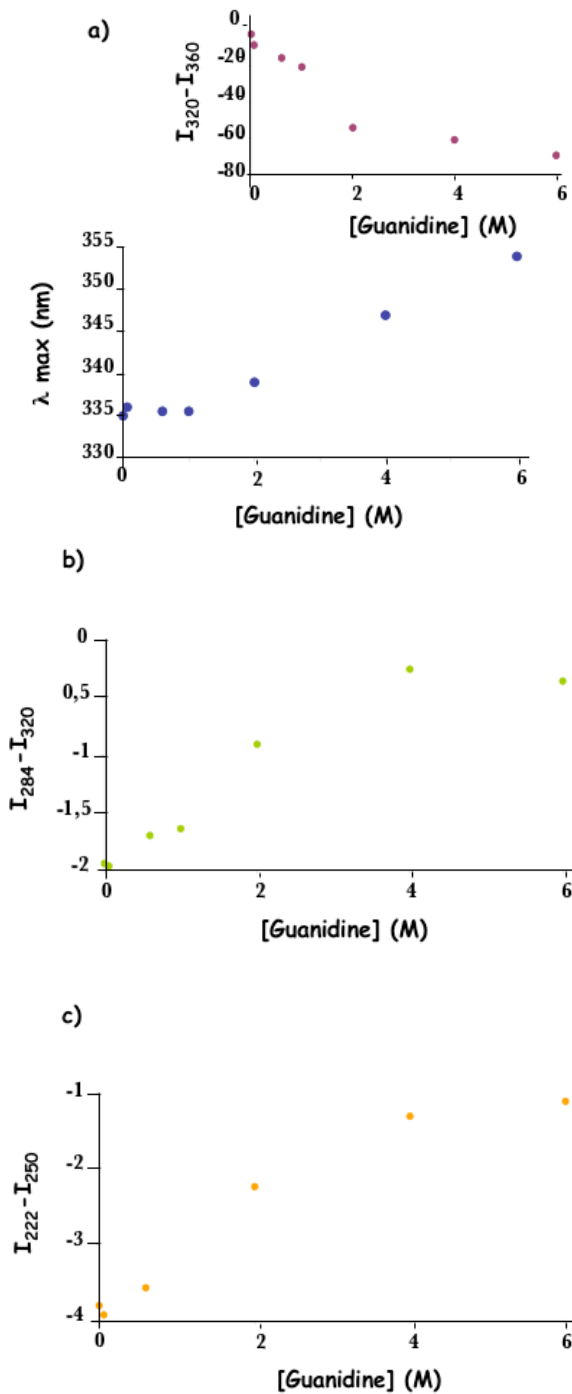


Figure 9.1 : La guanidine induit un dépliement de PcrV.

a) Spectre d'émission de fluorescence des tryptophanes après excitation à 280 nm, à une concentration en protéine de 1 μ M. La longueur d'onde maximale d'émission et, dans l'encart, la valeur corrigée du signal d'émission à 320 nm (I) ($I_{320} - I_{365}$) sont représentés en fonction de la concentration en guanidine dans le milieu.

Mesures de CD en **b)** UVs proches et **c)** UVs lointains à des concentrations en protéine de 10 μ M et 1 μ M, respectivement. Les mesures sont représentées comme la valeur corrigée des intensités (I) à **b)** 284 nm ($I_{284} - I_{320}$) **c)** et 222 nm ($I_{222} - I_{250}$), en fonction de la concentration en guanidine dans le milieu.

La perte de la structure secondaire se fait parallèlement à celle de la structure tertiaire. En effet, la valeur corrigée de l'intensité à 222 nm ($I_{222}-I_{250}$) augmente avec la concentration en guanidine (Figure 9.1 c). A partir de 2M de cet agent, plus de la moitié des hélices α de la protéine sont dépliées.

Nous avons pu observer que le dépliement de PcrV par la guanidine est réversible. En effet, après diverses dilutions de solutions concentrées en PcrV et en guanidine, les mesures de fluorescence et de CD, nous ont permis de constater que les structures tertiaires et secondaires natives sont immédiatement récupérées si la concentration en guanidine finale est inférieure à 1M (non montré).

En conclusion, la guanidine est un agent qui permet de déplier PcrV, phénomène qui est induit à partir d'une concentration de 2M et qui atteint un maximum à 6M. Ce dépliement est réversible et la protéine récupère une structure native après dilution de la guanidine à des concentrations inférieures à 1M. Il est important de noter que la perte des structures secondaire et tertiaire se fait simultanément à partir de 2M de guanidine.

Dépliement/repliement par le pH

Le suivi du dépliement de PcrV par la variation du pH du milieu a été réalisé par les mêmes techniques que dans le paragraphe précédent. Les résultats sont présentés dans la Figure 1 du manuscrit Gebus *et al.*, 2008. En variant le pH du milieu contenant PcrV entre un pH acide de 1 et un pH basique de 8, nous avons observé que la structure tertiaire de la protéine est perdue à partir de pH inférieurs à 5. Cette déstructuration est d'autant plus importante que l'acidité du milieu augmente (Figure 1a et 1b, Gebus *et al.*, 2008). Le dépliement de la protéine atteint un maximum pour un pH de 2,6. Ce phénomène est réversible : la structure tertiaire native peut être récupérée après neutralisation du milieu (Figure 1a et 1b, Gebus *et al.*, 2008). Par contre, la structure secondaire observée à des pH acides est comparable à celle de la protéine native (Figure 1c, Gebus *et al.*, 2008). Une perte de cette structure n'est notée qu'à partir de pH inférieurs à 1 et est réversible (non montré). Ainsi, pour des pH acides, la protéine PcrV se trouve dans une conformation particulière appelée "Molten globule" où la protéine ne présente plus de structure tertiaire mais a toujours une structure secondaire native.

Le pH est un agent qui permet de déplier PcrV. L'acidification du pH entraîne une perte de la structure tertiaire dès pH 5 et atteint un maximum à partir d'un pH de 2,6. La structure secondaire de PcrV, quant à elle, est maintenue à des pHs acides et n'est perdue qu'à des pHs inférieurs à 1. Ainsi, au pH 2,6, la protéine atteint un état intermédiaire de repliement qui est appelé "Molten Globule".

Une fonction de l'ATPase InvC de *S. enterica* est de déplier les substrats du SST3 (Akedo and Galan, 2005). Des expériences de susceptibilité à la digestion par des protéases de l'effecteur SptP ont montré qu'elle devient de plus en plus susceptible quand elle est en présence d'InvC, d'ATP et de sa chaperone SicP. InvC est donc capable de modifier la conformation du substrat SptP. L'activité tyrosine phosphatase de SptP est perdue quand elle est incubée avec InvC en présence d'ATP et de sa chaperone SicP, confirmant le dépliement de la protéine (Akedo and Galan, 2005). Les auteurs de ces travaux ont montré que le dépliement était nécessaire au passage de l'aiguille de sécrétion. En effet, si une protéine très compacte remplace SptP (fusion du domaine N terminal de SptP avec la GFP), InvC est incapable de déplier un tel substrat. Sa sécrétion est abolie, prouvant que le passage de l'aiguille nécessite que la protéine soit partiellement dépliée (Akedo and Galan, 2005).

La modélisation de l'aiguille de sécrétion de *S. flexneri* a permis de renforcer cette observation. En effet, le diamètre interne du canal de sécrétion, ne permettrait le passage que de structures secondaires telles que les hélices α et les régions de structure désordonnée (Deane *et al.*, 2006). Ainsi, les protéines sécrétées traverseraient l'aiguille sous forme partiellement dépliées.

Un tel état conformationnel a été décrit dans les études de repliement des protéines. Dans ce processus, il existe plusieurs états intermédiaires dont l'état "molten globule" qui est en général caractéristique de nombreuses protéines globulaires (Arai and Kuwajima, 2000). C'est une situation d'équilibre productif sur la voie de repliement des protéines. Ses caractéristiques sont, la présence d'une structure secondaire importante qui correspond presque à celle de la protéine native repliée, et l'absence de presque la totalité de la structure tertiaire. L'association et la dissociation de structures telles que ligand-récepteurs ou oligomères de protéines sont des processus qui passent souvent par le dépliement préalable des protagonistes au stade "molten globule" (Arai and Kuwajima, 2000). Cet état flexible correspond à un intermédiaire où le remaniement structural est facilité, entraînant une favorisation de l'interaction entre partenaires protéiques (Arai and Kuwajima, 2000).

Le dépliement de PcrV par le pH nous a permis d'isoler un état de repliement partiel de la protéine, de ce type. De plus, cet état est réversible par neutralisation du pH. La guanidine, quant à elle nous a permis de déplier de façon réversible la protéine sans atteindre d'état partiel de repliement. Afin d'éviter de travailler sur un intermédiaire de repliement qui n'est pas défini et qui pourrait ne pas être stable, nous avons choisi la variation de pH pour engendrer de façon contrôlée le dépliement et le repliement de PcrV. Ceci pourrait favoriser des interactions qui n'ont plus lieu lorsque le repliement complet de la protéine est atteint.

1.2 Formation de multimères de PcrV/LcrV

D'après les observations réalisées précédemment, l'acidification du pH à 2,6 conduit au dépliement partiel de PcrV et la neutralisation du pH à son repliement. La protéine PcrV purifiée, qui est sous forme monomérique a ainsi été traitée par un saut de pH à 2,6 et neutralisation immédiate. Pour déterminer l'état de la protéine issue de ce traitement, nous avons injecté l'échantillon traité sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille et nous avons comparé le chromatogramme obtenu avec celui de la protéine avant traitement (monomérique) (Figure 2a, Gebus *et al.*, 2008). Le monomère de PcrV est élué à un volume d'exclusion de 72 mL. La protéine traitée est éluee en partie sous forme monomérique à 72 mL, mais aussi au sein d'un large pic compris entre 54 et 67 mL. Un troisième pic est aussi observé dans le volume mort de la colonne qui correspond à une agrégation de PcrV suite au traitement. La mesure des aires sous la courbe du chromatogramme nous a permis d'estimer que le large pic d'élution représente 30% du pic correspondant au monomère. Les formes multimériques et monomériques de PcrV sont stables. En effet, quand chacun des pics est réinjecté en chromatographie d'exclusion de taille, leur volume d'exclusion est maintenu (Figure 2b, (Gebus *et al.*, 2008).

Le pic de multimères de PcrV comprend un mélange de diverses formes oligomériques. La migration de cet échantillon en gel natif (Figure 2c, Gebus *et al.*, 2008), montre l'apparition de bandes ayant une migration électrophorétique plus lente que le monomère de PcrV. Afin de déterminer l'état d'oligomérisation, des analyses par spectrométrie de masse native ont été réalisées (Figure 9.2).

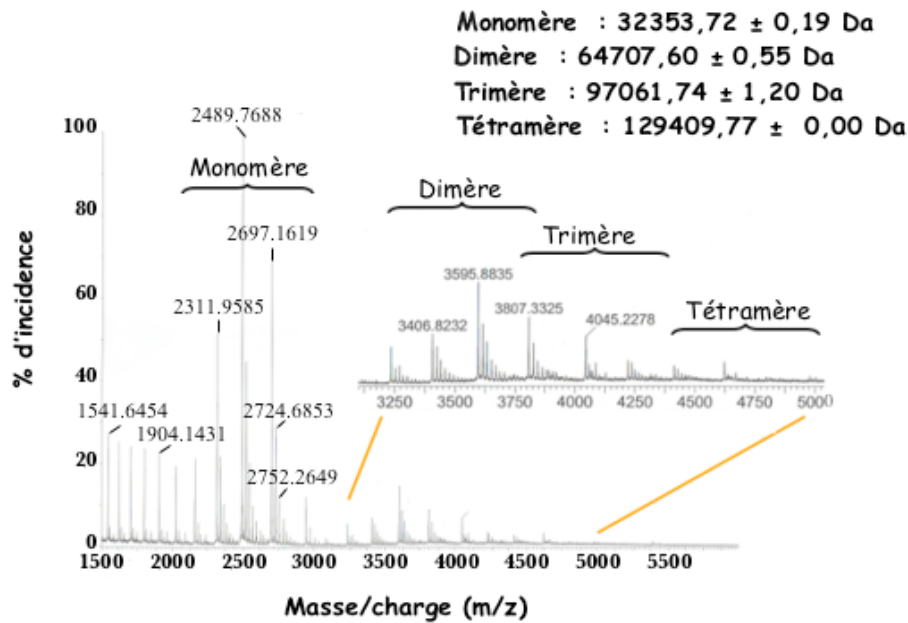


Figure 9.2 : PcrV forme des oligomères d'au moins quatre unités après dépliement/repliement.

L'espèce multimérique de PcrV créée a été analysée en spectrométrie de masse native.

Les rapports m/z obtenus pour le mélange d'espèces multimériques de PcrV ont mis en évidence quatre formes de poids moléculaires respectifs de 32353,72 Da, 64707,60 Da, 97061,74 Da et 129409,77 Da. Le poids moléculaire théorique d'un monomère de PcrV étant de 32461,00 Da, ces formes représentent respectivement, des monomères, dimères, trimères et tétramères. Il est difficile de quantifier les complexes en spectrométrie de masse native. En effet, ceux ci sont facilement détruits lors des étapes de vaporisation et de collision surtout lorsqu'ils mettent en jeu des interactions hydrophobes. Il n'est donc pas exclu que des complexes plus grands que des tétramères soient formés mais qu'ils ne soient pas visibles par cette technique.

Des études préliminaires pour déterminer le poids moléculaire du complexe formé ont été effectuées par une technique de chromatographie d'exclusion de taille couplée à la diffusion angulaire de la lumière (SEC-MALLS). Grâce à cette technique, nous avons pu vérifier encore une fois que PcrV est sous forme monomérique après surproduction et purification (32030 Da contre 32461 Da prédits) (non montré). Après traitement au pH, cette technique a permis de séparer distinctement les monomères de PcrV des dimères dont le poids moléculaire a été estimé à 67150 Da. Le volume d'élution de cette forme de PcrV est de 65 mL. Malheureusement, la concentration en oligomères était trop faible pour permettre de plus amples analyses des poids moléculaires des formes supérieures.

Le dépliement/repliement de PcrV par un saut de pH entraîne un repliement d'une partie de la protéine en complexe multimérique. Un mélange de formes oligomériques de différentes tailles a pu être isolé par chromatographie d'exclusion de taille. Il contient au moins des dimères, trimères et tétramères de PcrV.

1.3 Structure des oligomères de PcrV/LcrV

Afin de mieux caractériser les espèces oligomériques, nous avons observé en MET après coloration négative à l'acétate d'uranyle, les fractions correspondant au pic d'élué compris entre 54 mL et 67 mL (Figure 3b, Gebus *et al.*, 2008). Des structures en forme d'anneaux creux ont été observées, d'une taille estimée à $9,7 \pm 1,4$ nm et $3,9 \pm 1,4$ nm de diamètre externe et interne, respectivement. Pour vérifier que ces structures sont bien spécifiques des espèces oligomériques, le pic d'agrégation de PcrV ainsi que le pic contenant la forme monomérique ont aussi été observés (Figure 3a et 3c, Gebus *et al.*, 2008). Aucune structure particulière n'a pu être mise en évidence dans ces échantillons.

Les images que nous avons pu obtenir en MET ont permis de distinguer un anneau creux de taille définie mais les détails de la structure tels que le nombre d'unités de PcrV la composant ou l'épaisseur de l'anneau n'ont pu être déterminés.

Les connaissances que nous avons à ce jour sur l'homologue de PcrV chez *Y. pestis*, impliquent que la formation par cette protéine de structures en anneaux est compatible avec sa position au sommet de l'aiguille et sa fonction dans l'assemblage du pore de translocation. Nous avons donc purifié à petite échelle en une étape la protéine LcrV étiquetée à la GST (Glutathione S Transferase) ("Experimental Procedures", Gebus *et al.*, 2008). Après clivage de la GST, elle a ensuite été traitée de la même manière que PcrV pour la déplier et la replier : un saut de pH à 2,6 suivi d'une neutralisation immédiate a été appliqué. Les espèces formées après ce traitement ont été séparées par chromatographie d'exclusion de taille. Comme pour PcrV, trois pics principaux sont observés : un pic éluant dans le volume mort de la colonne, correspondant à de la protéine agrégée, un pic éluant à 76 mL correspondant à la protéine monomérique et un large pic éluant entre 60 et 70 mL contenant des espèces oligomériques de LcrV (Figure 9.3). Les deux pics élués à 110 et 125 mL ne contiennent pas la protéine LcrV. Ils doivent contenir des contaminants en petite quantité qui ne sont pas visibles sur gel.

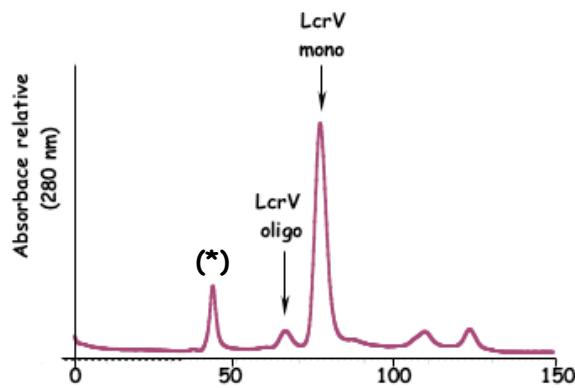


Figure 9.3 : LcrV forme des oligomères après dépliement/repliement.

Chromatogramme de l'élution de LcrV traitée par un saut de pH après colonne d'exclusion de taille. Une espèce multimérique est éluée en un large pic entre 60 et 70 mL. La protéine monomérique est éluée à 75 mL et un agrégat de LcrV est élué dans le volume mort de la colonne (*).

L'analyse par MET des échantillons contenus dans ces trois pics, révèle que les agrégats et les monomères ne contiennent pas de structure particulière (Figure 3a et c, Gebus *et al.*, 2008). La fraction multimérique par contre contient des structures similaires à celles observées pour PcrV (Figure 3b, Gebus *et al.*, 2008). Les dimensions des anneaux sont estimées à $8,3 \pm 1,8$ nm et $3 \pm 0,6$ nm de diamètre externe et interne, respectivement.

Pour déterminer si la multimérisation de la protéine PcrV entraîne des modifications de sa conformation, les structures secondaire et tertiaire ont été observées par mesures biophysiques (Figure 4, Gebus *et al.*, 2008). Par analyse des spectres de CD dans les UVs proches et lointains, nous avons pu comparer la structure tertiaire et secondaire, respectivement, de la protéine avant le traitement au pH, ainsi que des espèces monomériques et oligomériques engendrées par ce traitement (Figure 4a et 4b, Gebus *et al.*, 2008). Les spectres des espèces monomériques et oligomériques sont similaires à ceux de PcrV avant traitement ce qui suggère que les structures secondaire et tertiaire ne varient pas pendant le phénomène d'oligomérisation.

Les protéines PcrV et LcrV oligomérisent en formant des structures annulaires visibles en MET et dont la taille est du même ordre que celle du pore formé par les translocateurs hydrophobes dans les membranes des cellules hôtes. La structure secondaire et tertiaire des oligomères de PcrV sont semblables à

celles des monomères. Le phénomène de multimérisation n'implique donc pas une modification forte de la conformation de chacune des unités .

Il a été observé que LcrV oligomérisait spontanément après purification de la protéine recombinante (Lawton *et al.*, 2002). En effet, la protéine présente un profil de migration en gel natif comprenant de nombreuses bandes migrant comme des protéines de haut poids moléculaire qui correspondent à diverses formes oligomériques. Nous n'avons pas observé de multimérisation spontanée de LcrV, après purification par un protocole similaire à celui décrit par Lawton *et al.*, 2002. En effet, sans traitement de LcrV par un saut de pH, un seul pic d'éluion est observé en chromatographie d'exclusion de taille, qui correspond à l'éluion d'une protéine monomérique (75 mL).

La protéine IpaD est elle aussi capable de multimériser spontanément à condition de d'éliminer son domaine globulaire N terminal. Celui-ci a été proposé comme ayant un rôle de chaperonne intramoléculaire. Il est très sensible à la protéolyse et ce traitement libère une espèce qui a été analysée par chromatographie d'exclusion de taille. Elle est éluée à un volume qui correspondrait à celui de l'éluion d'une protéine globulaire de 115kDa. La forme générée correspondrait donc à un pentamère de la protéine IpaD dépourvue de son domaine globulaire N terminal (Johnson *et al.*, 2007). Néanmoins, des études complémentaires seraient nécessaires pour mieux caractériser l'état d'oligomérisation d'IpaD.

D'après les résultats que nous avons obtenu, PcrV n'oligomérisait pas de façon spontanée. Mais après le passage par une configuration de molten globule, il est capable de former un mélange d'espèces multimériques. Comme pour LcrV (Lawton *et al.*, 2002 ; Gebus *et al.*, 2008), plusieurs formes sont ainsi créées. Il a été difficile de séparer les différentes espèces pour les caractériser. Mais nous avons pu observer qu'au moins des tétramères de la protéine sont formés.

Il est proposé que le complexe formé par le translocateur hydrophile au sommet des aiguilles de type III de *S. flexneri* est un pentamère d'IpaD ou un tétramère d'IpaD en association avec une molécule d'IpaB (Johnson *et al.*, 2007 ; Veenendaal *et al.*, 2007), Chapitre 4, paragraphe, paragraphe 3.2). La modélisation d'un complexe de LcrV au sommet de l'aiguille de *S. flexneri* prévoit aussi la formation d'un pentamère (Deane *et al.*, 2006) et il en est de même pour la modélisation de LcrV au sommet des aiguilles de *Y. enterocolitica* (Broz *et al.*, 2007). Ainsi la capacité de ces protéines à oligomériser est prévisible. Même si nous n'avons pas pu isoler de pentamères, nos résultats n'excluent pas qu'une telle forme soit présente au sommet des aiguilles.

Les formes oligomériques s'assemblent en structures annulaires de taille similaire à celle du pore de translocation. Nous avons pu remarquer qu'entre les anneaux de PcrV et de LcrV, il y avait une différence de taille qui ne peut être expliquée par la différence de taille des protéines. En effet, LcrV est plus volumineuse que PcrV, mais elle forme des anneaux plus petits que cette dernière. Ces résultats sont certainement dû au fait que les anneaux que nous observons sont une des formes oligomériques, certainement la plus stable *in vitro* qui est générée pour chacune des protéines. La détermination de la structure tridimensionnelle des anneaux est indispensable pour comprendre le mécanisme exact de multimérisation de la protéine.

La structure d'un dimère d'IpaD a pu être résolue (Johnson *et al.*, 2007, Chapitre 4, Paragraphe 3.2). Deux unités adjacentes interagissent avec un décalage vers le haut et une rotation pour la seconde sous unité par rapport à la première. L'interaction se fait par le biais de l'hélice C terminale d'IpaD qui est aussi impliquée dans la formation du coiled-coil intramoléculaire.

Les résultats que nous avons obtenus pour PcrV nous indiquent que lors du phénomène d'oligomérisation de la protéine, la structure globale du monomère est conservée tant au niveau secondaire que tertiaire. De plus, pour la multimérisation il est nécessaire de déplier les protéines car, sans cela, les monomères ne s'assemblent pas. Ceci conduit à penser à un mécanisme d'échange de domaines intermoléculaires pour l'oligomérisation (Bennett *et al.*, 1995 ; Rousseau *et al.*, 2003). En effet, la multimérisation de protéines par ce phénomène conduit à l'échange réciproque d'un élément de structure secondaire ou d'un domaine protéique. L'échange peut être réciproque entre deux molécules, conduisant à la formation d'un dimère, ou il peut se propager sur un nombre de sous unités indéterminé pour former des complexes plus importants. La structure finale obtenue est alors un assemblage multimérique qui, pour chaque unité le composant, présente les mêmes caractéristiques structurales que le monomère : les structures secondaire et tertiaire sont invariables. Il est important de noter que les protéines qui sont capables de ce phénomène peuvent se trouver dans deux conformations : une fermée où elle est sous forme monomérique, et une ouverte où le domaine échangé lors de la multimérisation est dirigé vers l'extérieur de la structure monomérique. Dans cette conformation, la molécule est prête à interagir avec une autre sous unité ouverte. Ceci implique que la région précédant le domaine échangé est très flexible pour adopter deux conformations éloignées. De plus des traitements comme l'acidification du pH favorisent la formation de la structure ouverte et de ce fait la multimérisation de la protéine. Ce phénomène est observé pour

l'oligomérisation de la RNase A, protéine qui multimérise sous diverses formes suite à un traitement au pH (Libonati and Gotte, 2004). Cette oligomérisation conduit à un complexe actif.

Nos résultats ne permettent pas de discriminer que la multimérisation se fait par de simples interactions en conservant une structure identique au monomère. Seule la détermination de la structure tridimensionnelle du complexe permettrait de trancher cette question.

Ce phénomène d'échange de domaines intermoléculaire n'est apparemment pas observé lors de la dimérisation d'IpaD (Johnson *et al.*, 2007). Mais la résolution de la structure de LcrV a amené les auteurs à proposer que cette protéine peut se trouver sous deux formes : une fermée, correspondant à celle qui a été cristallisée, où la protéine est monomérique et ces hélices $\alpha 7$ et $\alpha 12$ forment un coiled-coil intramoléculaire (Derewenda *et al.*, 2004). Une structure ouverte de la protéine a été proposée où les deux hélices ne sont plus en interaction mais sont ouvertes et ce grâce au déplacement du domaine situé en amont de l'hélice 12 qui est une structure très flexible (Derewenda *et al.*, 2004). Le fait que LcrV interagisse avec LcrG en formant un coiled-coil intermoléculaire entre son l'hélice $\alpha 7$ et le domaine N terminal de LcrG, conforte l'hypothèse de l'existence d'une structure ouverte (Nilles, 2004) (Voir chapitre 11, paragraphe 2).

De plus, nous avons pu remarquer que la protéine monomérique PcrV est assez sensible à la protéolyse qui libère une partie tronquée de la protéine d'environ 28 kDa. Ce phénomène avait déjà été observé par l'équipe du docteur Andréa Dessen à l'IBS qui, par séquençage N terminal, a défini le fragment tronqué de PcrV. Celui-ci est dépourvu de son hélice $\alpha 12$ C terminale. Cette observation soutient l'hypothèse que cette hélice peut se retrouver dans une conformation où elle n'est plus en interaction avec l'hélice $\alpha 7$ et de ce fait devient sensible à la protéolyse.

L'importance de l'hélice $\alpha 7$ de LcrV dans l'oligomérisation de la protéine et dans son interaction avec LcrG a déjà été déterminée (Lawton *et al.*, 2002). Une série de protéines LcrV mutantes pour les acides aminés hydrophobes conservés de l'hélice $\alpha 7$ a été testée pour leur capacité à oligomériser. Certaines ont une efficacité de multimérisation plus faible mettant en évidence le rôle de l'hélice 7 et de son motif "leucine zipper" dans les interactions entre molécules de LcrV (Lawton *et al.*, 2002).

Nous nous sommes donc demandé si l'hélice $\alpha 12$ pouvait aussi jouer un rôle dans ce phénomène.

1.4 Rôle de l'hélice $\alpha 12$ C terminale dans la multimérisation

LcrV et PcrV présentent 41% d'homologie de séquence globale. C'est au sein de l'hélice $\alpha 12$ C terminale qu'elle est la plus conservée avec 89% d'homologie (Figure 5a, Gebus *et al.*, 2008). Ceci suggère que l'hélice $\alpha 12$ pourrait être un domaine capital dans la fonction des protéines LcrV/PcrV.

Etude du rôle de l'hélice $\alpha 12$ par une protéine tronquée PcrV $_{\Delta Cter}$

Une séquence nucléique permettant l'expression d'un PcrV tronqué, PcrV $_{\Delta Cter}$, sans les 41 acides aminés C terminaux correspondant à l'hélice $\alpha 12$ a été créée et clonée dans un vecteur de *P. aeruginosa* et dans un vecteur d'*E. coli*. Grâce à ces deux constructions, nous avons pu observer l'effet de l'absence de ce domaine *in vivo* et *in vitro*.

Le test *in vivo* consiste à déterminer si la fonction du SST3 est maintenue. L'infection de macrophages, SST3 dépendante, est suivie par relargage d'une enzyme cytoplasmique, la lactate déshydrogénase (LDH) qui survient après la formation de pores de translocation dans les cellules infectées. Le pouvoir cytotoxique de diverses souches envers les macrophages est déterminé par mesure de l'activité LDH dans le milieu extracellulaire. Dans ce travail, nous avons comparé, par rapport à la souche de *P. aeruginosa* CHA sauvage, les % de cytotoxicité d'une souche CHA n'exprimant pas *pcrV* (ΔV), de souches ΔV complémentées pour l'expression de *pcrV* sauvage, *pcrV* $_{\Delta Cter}$ ou encore pour l'expression de protéines PcrV mutantes (paragraphe suivant).

Toutes les souches ont d'abord été testées pour leur capacité à produire et à sécréter PopB, PopD, ExoS et la protéine PcrV sauvage ou mutante. Cette vérification permet d'écartier la possibilité que la perte de la cytotoxicité de certaines souches provienne d'un défaut global du SST3.

CHA $\Delta V/V_{\Delta Cter}$ a un phénotype similaire à la souche n'exprimant pas *pcrV*: elle n'est pas cytotoxique envers les macrophages (Figure 6a, Gebus *et al.*, 2008) et ce malgré le fait que les translocateurs Pops, PcrV $_{\Delta Cter}$ et la toxine ExoS soient sécrétés après induction du SST3 (Figure 6b, Gebus *et al.*, 2008). Ainsi, l'hélice C terminale joue un rôle capital dans la fonctionnalité de la protéine.

PcrV semble jouer un rôle de "plateforme d'assemblage" du translocon PopB/PopD dans les membranes des cellules hôtes (Goure *et al.*, 2004 ; Goure *et al.*, 2005). Nous avons donc procédé à une infection d'érythrocytes de moutons, pour lesquels la

cytotoxicité de la souche a été déterminée par mesure de la fuite d'hémoglobine après infection. Nous avons ensuite purifié les membranes de ces érythrocytes afin de vérifier si les protéines PopB et PopD y étaient insérées. En effet, la souche CHA sauvage insère ces deux protéines dans les membranes et forme ainsi un pore fonctionnel qui permet l'hémolyse des cellules, tandis qu'une souche mutante CHA Δ V n'est pas capable d'insérer les translocateurs PopD et/ou PopB dans les membranes, conduisant à une incapacité à lyser les globules rouges. La souche CHA Δ V/V $_{\Delta$ Cter présente une capacité d'hémolyse très faible. Tandis que la protéine PopB est retrouvée dans les membranes des érythrocytes infectés par cette souche, seule une très faible quantité de PopD y est présente (Figure 6c, Gebus *et al.*, 2008).

L'absence de formation d'un pore de translocation fonctionnel en présence de la protéine PcrV $_{\Delta$ Cter a aussi été montrée par observation d'un défaut de translocation des toxines. Des fibroblastes exprimant de l'actine marquée à la GFP (Green Fluorescent Protein), ont été infectés par des souches exprimant ou non PcrV ou PcrV $_{\Delta$ Cter et la modification du cytosquelette d'actine a été observée par microscopie à fluorescence après 4 heures d'infection. Les cellules ne sont pas modifiées quand elles sont infectées par CHA Δ V ou CHA Δ V/V $_{\Delta$ Cter, contrairement à des cellules infectées par une souche sauvage dont le cytosquelette d'actine se rétracte sous l'effet des toxines ExoS et ExoT (non montré). La translocation des toxines n'a donc pas lieu si PcrV n'est pas exprimé ou si son hélice α 12 est tronquée, ce qui confirme l'incapacité de la formation de pore fonctionnel. L'hélice C terminale est donc importante pour la fonction d'assemblage du pore de translocation par PcrV.

Pour mieux comprendre le rôle de l'hélice C terminale, nous avons surexprimé et purifié une protéine PcrV tronquée recombinante. Comme PcrV native, celle ci a été surexprimée sans étiquette et purifiée en deux étapes : une colonne échangeuse d'anions suivie d'une colonne de chromatographie d'exclusion de taille ("Experimental Procedures", (Gebus *et al.*, 2008). La protéine est sous forme monomérique en sortie de colonne de chromatographie d'exclusion de taille, ce qui a été déterminé par mesure en spectrométrie de masse native (27683,44 Da contre 27723,00 Da prédits). Lorsque la protéine est traitée par un saut de pH afin de la déplier et replier, aucun phénomène d'oligomérisation n'est observé. En effet, le passage de l'échantillon traité en chromatographie d'exclusion de taille ne permet pas d'observer l'apparition d'une nouvelle espèce (Figure 5c, Gebus *et al.*, 2008).

Pour vérifier que ces résultats ne proviennent pas d'un mauvais repliement de la protéine tronquée, une analyse des structures tertiaire et secondaire de la protéine a été effectuée par mesure des spectres de CD en UVs proches et lointains, respectivement (Figure 9.4). Comme pour PcrV sauvage, le spectre de CD en UVs proches de PcrV $_{\Delta Cter}$ présente un minimum d'absorption à 284 nm, caractéristique de son repliement (Figure 9.4 a). La structure tertiaire de la protéine tronquée n'est donc pas altérée. En UVs lointains, le spectre enregistré pour PcrV $_{\Delta Cter}$ est aussi similaire à celui de PcrV (Figure 9.4 b). Le minimum de signal à 222 nm caractéristique des hélices α est tout de même plus faible pour la protéine tronquée. En effet, sa teneur en hélices α est un peu diminuée du fait de la perte de l'hélice 12, expliquant la faible augmentation de signal à 222 nm.

La présence de l'hélice $\alpha 12$ est nécessaire au maintien de la fonction de PcrV dans l'assemblage du pore de translocation des toxines. Elle est aussi indispensable à l'oligomérisation de la protéine.

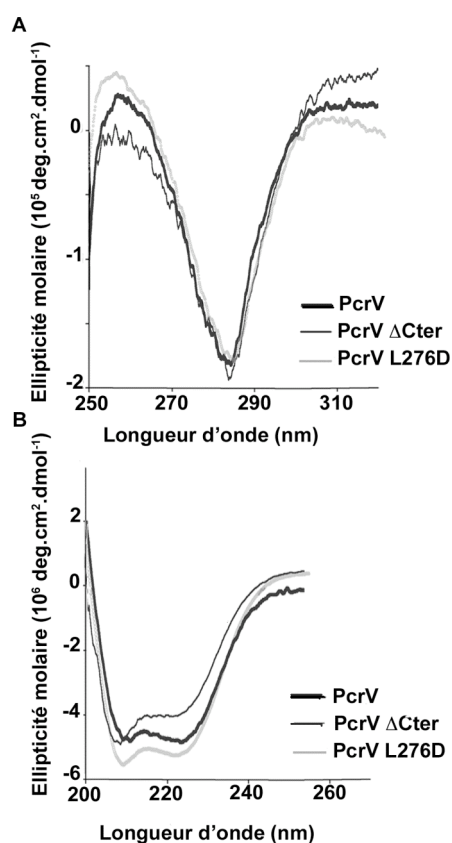


Figure 9.4 : Les protéines recombinantes PcrV_{ΔCter} et PcrV_{L276D} sont correctement repliées.

Mesures de CD en a) UVs proches et b) UVs lointains à des concentrations en protéine de 10 μM et 1 μM, respectivement. Les spectres enregistrés pour les protéines recombinantes mutantes PcrV_{ΔCter} et PcrV_{L276D} sont similaires à ceux observés pour PcrV sauvage. Les protéines mutantes sont donc correctement repliées.

Acides aminés de l'hélice α12 critiques pour sa fonction

Afin de caractériser quelles sont les zones les plus importantes de cette hélice dans le phénomène d'oligomérisation et pour mieux comprendre le mécanisme de multimérisation, nous avons créé une série de mutants. Des simples mutants ont été produits par mutagenèse dirigée sur le plasmide codant pour *pcrV* et permettant l'expression dans *P. aeruginosa*. Comme l'hélice α12 est une hélice amphiphile, une première série de mutants d'acides aminés hydrophobes conservés Leu₂₇₆, Phe₂₇₉, Tyr₂₈₃, Val₂₈₆ et Ile₂₉₀, et des acides aminés hydrophiles conservés Arg₂₇₈, Lys₂₈₂, Arg₂₈₈, tous mutés en alanine, acide aminé à chaîne latérale neutre, a été testée (Figure 5a, Gebus *et al.*, 2008). Ces mutants ont été criblés pour leur effet *in vivo* sur la cytotoxicité. Pour cela, une souche CHAΔV a été complétée pour l'expression de

chacune des protéines PcrV mutantes. Par rapport à une souche sauvage, seule la mutation L276A entraîne une perte de l'efficacité d'infection des macrophages de plus de 50% (Figure 6a, Gebus *et al.*, 2008), qui n'est pas due à un défaut de sécrétion des translocateurs et effecteurs (Figure 6b, Gebus *et al.*, 2008). Ces résultats indiquent que les acides aminés hydrophiles ne jouent pas un rôle essentiel dans la fonction de la protéine PcrV. Par contre, parmi les résidus hydrophobes testés, le résidu leucine 276 semble avoir une importance capitale. Il est bien conservé chez LcrV et il représente le dernier résidu du motif "leucine zipper" engagé dans le coiled-coil formé entre les hélices $\alpha 7$ et $\alpha 12$. Nous avons donc postulé que la région hydrophobe notamment les résidus formant le motif "leucine zipper" de l'hélice $\alpha 12$ de PcrV pourraient avoir un rôle essentiel. Une nouvelle série de mutants ponctuels a donc été produite dans cette région : les Val₂₅₅, Leu₂₆₂, Val₂₇₃ et Leu₂₇₆ ont été mutées en acide aspartique, acide aminé à chaîne latérale hydrophile, afin de créer une mutation plus drastique que l'alanine.

L'effet des simples mutations a été testé par infection de macrophages. Comme précédemment, la mutation du résidu Leu₂₇₆ entraîne une perte de la cytotoxicité envers les macrophages et ce de manière plus drastique que la mutation en alanine : en effet, le phénotype observé est similaire à celui d'une souche CHA Δ V (Figure 6a, Gebus *et al.*, 2008). Les mutations Val₂₅₅, Leu₂₆₂ et Val₂₇₃, quant à elles entraînent une perte de cytotoxicité d'environ 50%. Les doubles mutants V255D/L262D et L262D/V273D ont donc aussi été créés pour voir si l'effet sur la cytotoxicité est augmenté. Nous reviendrons sur le cas particulier du double mutant L262D/V273D dans le paragraphe suivant. Le double mutation V255D/L262D entraîne une perte totale de la cytotoxicité envers les macrophages, phénotype similaire à une souche n'exprimant pas PcrV ou à celle exprimant le mutant PcrV_{L276D} (Figure 6a, Gebus *et al.*, 2008). Nous avons vérifié que cet effet n'était pas dû à un défaut de sécrétion des translocateurs et effecteurs (Figure 6b, Gebus *et al.*, 2008).

Afin de déterminer si ces mutations, comme la délétion de l'hélice entière, touchent aussi la fonction d'assemblage du pore de translocation, la souche CHA Δ V/V_{L276D} a été utilisée pour infecter des érythrocytes de mouton. La capacité à lyser ces cellules est comparable à celle d'une souche n'exprimant pas *pcrV* et l'analyse des protéines insérées dans les membranes des cellules infectées montre que seulement de faibles quantités de PopB sont présentes (Figure 6c, Gebus *et al.*, 2008). L'effet de la mutation L276D est donc le même que l'absence de la protéine PcrV ou que celui de la présence

de la protéine tronquée PcrV $_{\Delta Cter}$. Ces résultats montrent que ce sont les résidus hydrophobes de l'hélice qui sont importants pour la fonctionnalité de la protéine.

L'absence de formation d'un pore de translocation fonctionnel en présence des protéines PcrV $_{L276D}$ ou PcrV $_{V255D/L262D}$ a aussi été montrée par mise en évidence d'un défaut de translocation des toxines dans des fibroblastes comme décrit précédemment (paragraphe 1.4). Lorsque les protéines PcrV $_{L276D}$ ou de PcrV $_{V255D/L262D}$ sont exprimées à la place de PcrV sauvage, il n'y a pas de translocation des toxines ExoS et ExoT dans le cytoplasme cellulaire (non montré).

Pour déterminer si ces mutants sont toujours capable d'oligomériser, les protéines PcrV $_{L276D}$ et PcrV $_{V255D/L262D}$ ont été produites dans *E. coli* et purifiées en deux étapes de manière identique à PcrV ("Experimental Procedures", Gebus *et al.*, 2008).

Ces deux protéines sont sous forme monomérique en sortie de colonne de chromatographie d'exclusion de taille car elles sont éluées, comme la protéine sauvage, à un volume de 72 mL. Lorsqu'elles sont traitées par un saut de pH afin de les déplier et replier, une quantité très faible est capable de former des espèces oligomériques. En effet, le passage des échantillons traités en chromatographie d'exclusion de taille ne permet pas d'observer l'apparition nette de nouvelles espèces (Figure 6d, Gebus *et al.*, 2008). Un faible pic est toutefois observé entre 60 et 67 mL mais qui ne représente qu'environ 4% du pic de protéine monomérique ce qui reste négligeable comparé aux 30% d'oligomérisation observés avec la protéine sauvage après traitement.

Afin de vérifier que ces résultats ne proviennent pas d'un mauvais repliement de la protéine mutante, une analyse des structures tertiaire et secondaire de la protéine PcrV $_{L276D}$ a été effectuée par mesure des spectres de CD en UVs proches et lointains, respectivement (Figure 9.4). Comme pour PcrV sauvage, le spectre de CD en UVs proches de PcrV $_{L276D}$ présente un minimum d'absorption à 284 nm, caractéristique de son repliement (Figure 9.4 a). La structure tertiaire de la protéine tronquée n'est donc pas altérée. En UVs lointains, le spectre enregistré pour PcrV $_{L276D}$ est aussi similaire à celui de PcrV, prouvant que l'hélice $\alpha 12$ n'est pas altérée par la mutation (Figure 9.4 b).

L'hélice $\alpha 12$ C terminale, en particulier ses résidus hydrophobes, sont nécessaires à la formation d'espèces oligomériques de PcrV. La perte de cette capacité à former une structure multimérique entraîne, in vivo, un défaut

d'insertion du pore de translocation dans les membranes des cellules hôtes et donc une diminution de la virulence. Le domaine C terminal est donc critique pour la fonction d'assemblage du pore de PcrV.

L'hélice $\alpha 12$ C terminale joue un rôle important dans le phénomène de multimérisation de PcrV et de LcrV. Ces résultats permettent de conclure que cette hélice est soit échangé par un processus d'échange de domaine intermoléculaire, soit elle est impliquée dans l'interaction entre deux unités adjacentes dans le complexe. Des résultats antérieurs avaient montré que l'hélice $\alpha 7$ de LcrV est aussi impliquée dans le phénomène de multimérisation (Lawton *et al.*, 2002). Si les deux hélices sont importantes, il est possible d'imaginer qu'il y ait soit échange de l'hélice $\alpha 12$ entre deux molécules adjacentes pour former un coiled-coil intermoléculaire avec l'hélice $\alpha 7$ (Voir modèle proposé dans le chapitre 11, paragraphe 2). Ou alors, le maintien du coiled-coil intramoléculaire est capital pour la multimérisation.

Sur les deux hélices, ce sont les résidus hydrophobes qui jouent un rôle majeur, impliquant que les mutations de ces acides aminés engendrent un défaut de formation et/ou de maintien du coiled-coil inter ou intra moléculaire (Lawton *et al.*, 2002), (Gebus *et al.*, 2008). Ce sont principalement les résidus hydrophobes engagés dans le motif "leucine zipper" qui sont capitaux (Figure 6 b, Gebus *et al.*, 2008). Les mutations de ces acides aminés en résidus de charge opposée conduisent donc a une déstabilisation du coiled-coil intramoléculaire ou intermoléculaire entraînant un défaut de la capacité d'oligomérisation des protéines mutantes.

La structure tridimensionnelle de l'oligomère permettrait de mieux comprendre l'effet de chacune des mutations sur le phénomène d'oligomérisation.

1.5 Cas particulier de PrV_{L262D/V273D}

L'étude de la double mutation L262D/V273D de l'hélice $\alpha 12$ de PcrV, a montré que l'expression de cette protéine entraîne un défaut de cytotoxicité. En effet, le phénotype observé est similaire à celui d'une souche CHAΔV (Figure 9.5 a). Chacune des simples mutations (L262D et V273D) avait déjà provoqué une diminution de la cytotoxicité de 50%. Les phénotypes observés ne sont pas dus à un défaut de sécrétion car PcrV mutante, PopB ainsi qu'ExoS (non montré) sont sécrétés après induction du SST3 (Figure 9.5 b).

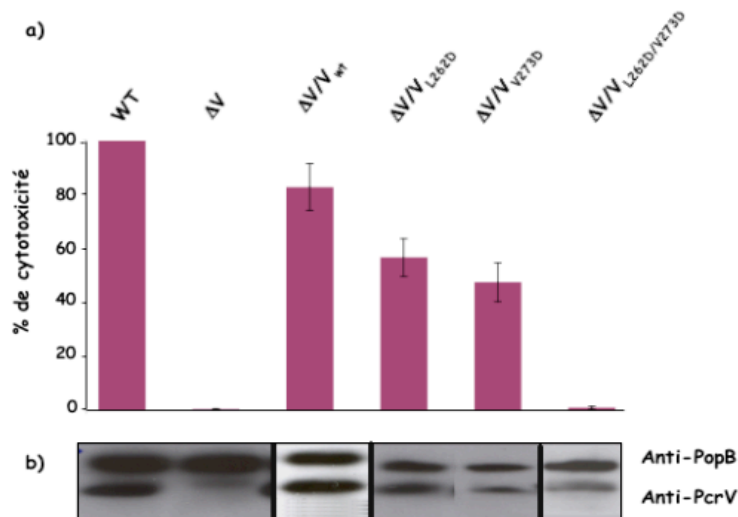


Figure 9.5 : Le mutant PcrV_{L262D/V273D} n'est pas virulent *in vivo*, ce qui n'est pas dû à un défaut de la fonctionnalité globale du SST3.

- a) La perte de l'activité dépendante du SST3 a été observée après infection de macrophages et mesure de la cytotoxicité en comparaison à une souche CHA sauvage.
b) Analyse par western-blot des protéines sécrétées après induction du système. Les protéines V mutantes et PopB sont sécrétés dans tous les cas étudiés.

Pour comprendre l'effet de cette double mutation, nous avons surexprimé et purifié la protéine recombinante à partir d'*E. coli*. Le protocole de purification est identique à celui de la protéine PcrV sauvage ("Experimental Procedures", Gebus *et al.*, 2008).

Contrairement à PcrV ou aux mutants PcrV_{ΔC_{ter}} et PcrV_{V255D/L262D}, la protéine PcrV_{L262/V273D} est éluée après chromatographie d'exclusion de taille comme un monomère (volume d'élué de 75 mL) mais aussi au sein d'un second pic très large compris entre 44 et 70 mL (Figure 9.6 a) et ceci sans traitement au préalable. L'analyse des fractions 4 à 14 par gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie confirme que les deux pics contiennent bien la protéine PcrV_{L262D/V273D} (Figure 9.6 b). Les échantillons ont été vérifiés par western-blot en utilisant des anticorps anti-PcrV (non montré) ce qui a confirmé l'identité de la bande observée.

Pour vérifier si les espèces monomériques et multimériques formées sont stables, une fraction représentative de chacun des deux pics, les fractions 9 et 13, respectivement ont été injectées sur une nouvelle colonne de chromatographie d'exclusion de taille (Figure 9.6 b). Nous avons pu observer que le volume d'élué ne varie pas : la fraction 9 est éluée à 67 mL et la fraction 13 à 75 mL, comme lors de la première colonne (Figure 9.6 a).

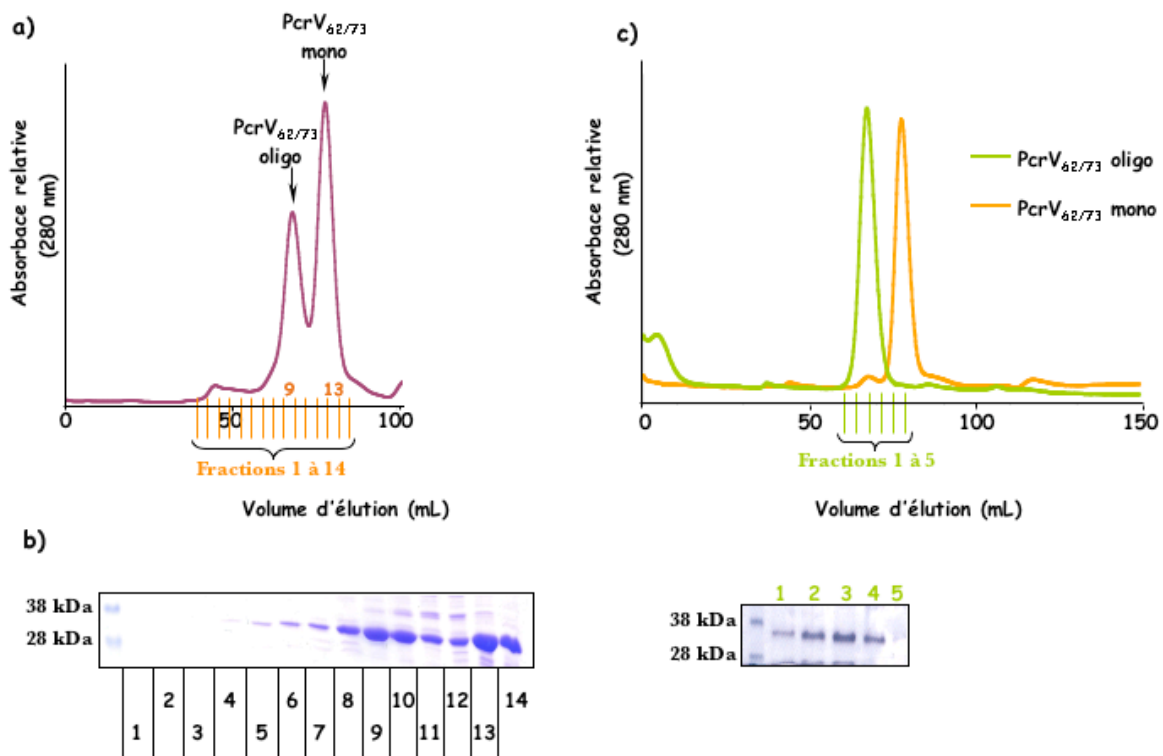


Figure 9.6 : Le mutant PcrV_{L262D/V273D} oligomérisse spontanément en un mélange d'espèces.

a) Chromatogramme obtenu après passage de PcrV_{L262D/V273D} sur une colonne d'exclusion de taille sans traitement préalable. Les fractions 1 à 14 prélevées pour analyse sont indiquées par des traits orange. **b)** Analyse par gel de polyacrylamide de la composition des fractions d'élutions 1 à 14 coloré au bleu de coomassie confirmant la présence de la protéine mutante. **c)** Superposition des chromatogrammes en sortie de colonne de chromatographie d'exclusion de taille de la fraction 9 (trait vert) et de la fraction 13 (trait orange) obtenues en a). Le pic monomérique (orange) et multimérique (vert) sont stables : leur volume d'élution ne varie pas lors de la seconde colonne. En dessous, gel de polyacrylamide coloré en bleu des fractions 1 à 5 d'élution du pic oligomérique (vert), confirmant sa teneur en protéine PcrV mutante.

Ainsi, les formes oligomériques générées spontanément par PcrV_{L262D/V273D} semblent stables. Afin de mieux les caractériser, nous avons fait migrer en gel de polyacrylamide en conditions natives un échantillon provenant du pic monomérique (fraction 13) et un échantillon provenant du pic oligomérique (fraction 9), (Figure 9.7 c). Cette fraction contient des formes de haut poids moléculaire qui ne sont pas présentes dans la fraction monomérique.

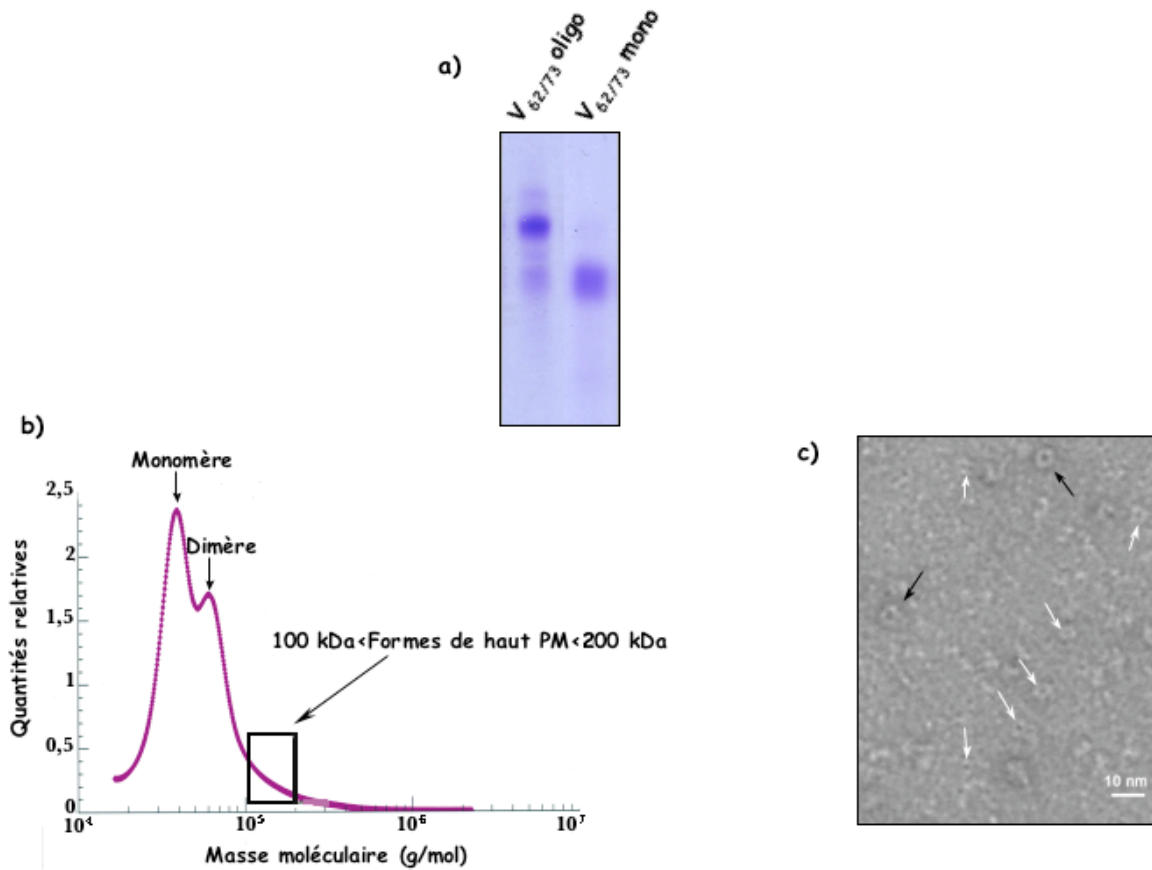


Figure 9.7 : Le mutant PcrV_{L262D/V273D} oligomérisse et forme des anneaux creux visibles en MET.

a) Gel natif d'une fraction contenant des formes oligomériques de PcrV_{L262D/V273D} (fraction 9) et d'un échantillon de la protéine mutante monomérique (fraction 13). **b)** Résultats d'une expérience de SEC-MALLS. La masse moléculaire des espèces détectées après passage dans une colonne d'exclusion de taille est exprimée en g/mol sur une échelle logarithmique et représentée en fonction de la quantité relative en protéine mesurée à chaque volume d'élution. PM : Poids Moléculaire. **c)** Photo de MET de la fraction de chromatographie d'exclusion de taille élue à un volume d'environ 50 mL. Les chaperones d'*E. coli*, GroEL sont pointées par les flèches noires. Les flèches blanches pointent les structures pouvant correspondre à des oligomères de PcrV_{L262D/V273D}.

Afin de mieux définir les espèces créées, nous avons réalisé des expériences de chromatographie d'exclusion de taille couplée à la diffusion angulaire de la lumière (SEC-MALLS) dont le principe est exposé brièvement dans le chapitre 8, paragraphe 2.3. Les résultats de cette expérience ont été résumés (Figure 9.7 b) par la représentation des différents poids moléculaires observés en fonction de leur incidence, mesurée par la concentration relative en protéine relevée en chacun des points. Par cette représentation, il est aisé de bien reconnaître l'élution des monomères qui est la forme ayant le plus d'incidence et dont le poids moléculaire moyen mesuré est de 38

kDa. Les espèces dimériques sont aussi abondantes, puis, des formes de plus haut poids moléculaire, comprises entre 100 kDa et 200 kDa, soit des formes comprises entre des trimères et des hexamères, ont aussi été observées mais à une incidence plus faible. Les concentrations en oligomères de haut poids moléculaire sont trop faibles pour pouvoir déterminer quelles espèces sont vraiment présentes dans le mélange. Cette expérience nous a permis d'estimer que les volumes d'élution sur notre colonne de chromatographie d'exclusion de taille (HiLoad 16/60 Superdex™200, GE Healthcare) de PcrV trimérique, tétramérique, pentamérique ou hexamérique seraient de 59 mL, 55 mL, 52 mL et 49 mL, respectivement. Ces volumes d'élution sont en général observés pour la protéine PcrV sauvage traitée au pH.

Les fractions en sortie de chromatographie d'exclusion de taille (fractions 1 à 10) (Figure 9.6 a) ont été colorées à l'acétate d'uranyle et observées en MET (Figure 9.7 c). Les fractions 3 à 6 contiennent des structures visibles au microscope. Elles sont les plus abondantes dans la fraction 3 qui est éluée entre 48 et 50 mL. La grille de MET contient de nombreuses structures annulaires creuses mais qui ne sont pas homogènes en taille, ainsi que des structures ovales qui ne semblent pas présenter de creux. Il semble donc que l'échantillon que nous avons observé est hétérogène ce qui a été vérifié en spectrométrie de masse de type MS/MS après digestion à la trypsine (Voir Matériel et Méthodes, chapitre 10, paragraphe 2.2). La fraction, en plus de PcrV, contient un mélange de plusieurs protéines d'*E. coli*. Les protéines les plus abondantes susceptibles de former des structures visibles en MET sont présentées dans le tableau 4. Parmi les structures observées, sont indiquées par des flèches noires, des structures correspondant à GroEL et par des flèches blanches sur la figure 9.7 c, des anneaux assez homogènes qui pourraient correspondre à la protéine PcrV mutante. La taille moyenne de ces anneaux a été estimée à $5,8 \pm 0,95$ nm de diamètre externe et $1,82 \pm 0,15$ nm de diamètre interne. Ces dimensions sont toutefois plus petites que les anneaux formés par PcrV natif après traitement ($9,7 \pm 1,4$ nm de diamètre externe et $3,9 \pm 1,4$ nm de diamètre interne).

Nom	Origine	Structure formée	Référence
60 kDa Chaperonine (GroEL), CH60_ECOLI	<i>E. coli</i>	2 anneaux de 7 unités superposés (15 nm ext/6nm int)	(Ludtke <i>et al.</i> , 2004), (De Carlo <i>et al.</i> , 2007)
DNA-directed RNA pol sous-unité α , RPOA_ECOLI	<i>E. coli</i>	Ovoïde (pince de crabe) avec les sous-unités β et β' : $\alpha_2\beta\beta'$. Gouttière latérale, diamètre 2,7 nm	(Zhang <i>et al.</i> , 1999)
Type III secretion protein PcrV, Q02KJ7_PSEAB	<i>P. aeruginosa</i>	Annulaire creuse (10 nm ext/4 nm int)	(Gebus <i>et al.</i> , 2008)
DNA-directed RNA pol sous-unité β , RPOB_ECOLI	<i>E. coli</i>	Ovoïde (pince de crabe) avec les sous-unités α : $\alpha_2\beta\beta'$ Gouttière latérale, diamètre 2,7 nm	(Zhang <i>et al.</i> , 1999)
DNA-directed RNA pol sous-unité β' , RPOC_ECOLI	<i>E. coli</i>	Ovoïde (pince de crabe) avec les sous-unités α : $\alpha_2\beta\beta'$ Gouttière latérale, diamètre 2,7 nm	(Zhang <i>et al.</i> , 1999)

Tableau 4 : Analyse par spectrométrie de masse des protéines de la fraction 3 de chromatographie d'exclusion de taille de PcrV_{L262D/V273D}.

Sont résumées dans ce tableau les protéines les plus abondantes formant, ou susceptibles de former, des structures annulaires visibles en MET.

L'hétérogénéité de l'échantillon ne permet pas d'affirmer avec certitude que ces structures sont composées de la protéine PcrV_{L262D/V273D}. Pour vérifier cela, il sera possible de réaliser des immunomarquages à observer en MET ou bien il sera nécessaire d'augmenter la pureté de la protéine. Une solution serait de réussir à séparer de façon plus efficace PcrV_{L262D/V273D} des impuretés lors de la première étape de purification, sur la colonne échangeuse d'anions. Le protocole utilisé était l'éluion de la protéine par un gradient de sel entre 0 et 350 mM. La majorité de la protéine est éluée entre 0 et 280 mM de sel. Il serait donc intéressant de tester des gradients en sel plus resserrés entre 0 et 280 mM de sel pour voir s'il est possible d'éluier de façon préférentielle la protéine PcrV_{L262D/V273D} et de maintenir les impuretés sur la colonne. Une autre solution serait des essais d'immunomarquage à l'or des structures formées par la protéine PcrV_{L262D/V273D} directement sur les grilles de MET.

Le mutant PcrV_{L262D/V273D}, touchant la partie hydrophobe de l'hélice α_{12} C terminale a un phénotype non cytotoxique. Cette protéine oligomérisse spontanément sous forme d'espèces de haut poids moléculaire. Ces complexes

semblent former des anneaux creux similaires à ceux formés après traitement de PcrV natif. Néanmoins, pour mieux caractériser ce mutant il sera nécessaire d'optimiser les conditions de purification de la protéine recombinante.

Le mutant PcrV_{L262D/V273D} forme spontanément des structures oligomériques. Ces structures sont un mélange d'espèces mais les anneaux que nous observons sont certainement la forme la plus stable *in vitro*. Cette structure peut être différente de celle réellement formée *in vivo*, ce qui expliquerait la perte de la cytotoxicité pour un mutant qui est pourtant capable de former des multimères.

Comment ces deux mutations conduisent à une protéine capable de multimériser spontanément n'est pas clair à ce jour. Mais, il est à noter que le traitement de la forme monomérique de PcrV_{L262D/V273D} par un saut de pH n'entraîne pas la formation d'espèces oligomériques. Les multimères que nous détectons semblent donc créés au cours de la surproduction et sont ensuite séparés par la purification. Ils peuvent donc résulter d'une interaction entre les sous unités de la protéine mutante lors de son repliement dans *E. coli*. Puis, une fois la protéine repliée, sous forme monomérique ou multimérique il ne semble plus possible de déplier la structure et de favoriser de nouvelles interactions.

2. Assemblage de PcrV sur les aiguilles de *P. aeruginosa*

2.1 Localisation de PcrV avant infection

Une souche de *Y. enterocolitica* mutante n'exprimant pas *lcrV* mais complémentée pour l'expression de *pcrV*, forme des aiguilles avec à leur sommet un complexe de PcrV (Mueller *et al.*, 2005). Il est donc clair que cette protéine doit être localisée, comme ces homologues LcrV et IpaD, au sommet des aiguilles de sécrétion. Pour vérifier cela, nous avons observé une souche *P. aeruginosa* mutante qui n'exprime pas *fliC* en MET après induction du SST3. Les flagelles forment des structures longues et fragiles à la surface bactérienne. Il est difficile dans une préparation d'une souche sauvage de distinguer des appendices à la surface de la bactérie car les débris des flagelles encombrant l'échantillon. Chez *P. aeruginosa*, l'exclusion mutuelle de l'expression de ces deux systèmes est observée (Soscia *et al.*, 2007). En effet des conditions favorisant l'assemblage du flagelle conduisent à l'inactivation du SST3. Par contre, en conditions de non mobilité, le SST3 est surexprimé. Il est possible d'observer des aiguilles du

SST3 pour des souches qui ne sont pas mobiles, notamment, une souche mutante n'exprimant pas *fliC* (Soscia *et al.*, 2007).

Nous avons pu observer en MET des appendices à la surface de CHAΔFliC après induction du SST3. Parmi les systèmes présents dans ces conditions, des aiguilles de sécrétion du SST3 ont pu être observée. Certaines d'entre elles portent à leur sommet une densité qui pourrait correspondre au complexe formé par PcrV (Figure 9.8 a). En collaboration avec l'équipe du docteur Cornelis G.R, les aiguilles ont été purifiées de la surface des bactéries afin de mieux distinguer le complexe. Après purification, il est possible d'observer une structure dense à une seule de leur extrémité (Figure 9.8 b). Nous n'avons malheureusement pas pu faire d'expériences d'immunomarquage à l'or, ce qui aurait permis d'affirmer avec certitude la nature de la densité observée.

Par contre, en utilisant les anticorps anti-PscF et anti-PcrV, la présence de PcrV dans des échantillons de purification d'aiguilles a été confirmée (Figure 9.8 c). Les aiguilles de la souche sauvage contiennent PscF qui migre sous forme de monomère et de dimère résistant au SDS, et PcrV (Figure 9.8 c).

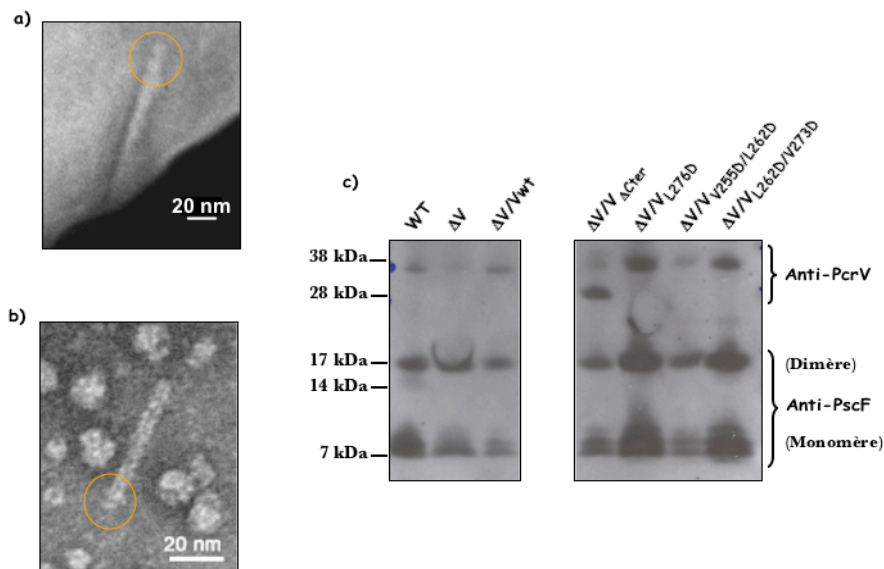


Figure 9.8 : PcrV forme un complexe au sommet des aiguilles de *P.*

***aeruginosa* et est co-purifiée avec PscF lors de purification d'aiguilles.**

a) Image en MET de la surface bactérienne d'une souche CHAΔFliC induite pour l'expression du SST3. L'aiguille de sécrétion observée présente une densité entourée en orange qui pourrait correspondre à un complexe de PcrV. **b)** Photo de MET d'une aiguille de *P. aeruginosa* CHAΔFliC purifiée après rasage d'une culture induite et précipitation des aiguilles. La structure distale formée par PcrV est entourée en orange. **c)** Analyse du contenu protéique de purification d'aiguilles par western blot en utilisant les anticorps anti-PcrV et anti-PscF.

PcrV forme un complexe au sommet de l'extrémité distale des aiguilles de sécrétion de P. aeruginosa visible en MET. La protéine PcrV co-purifie avec la protéine PscF lors de la purification des aiguilles de sécrétion avant infection.

Les mutants de PcrV pour lesquels la cytotoxicité de la souche était abolie sélectionnés précédemment ont été analysés par cette technique. Certains de ces mutants n'étaient plus capables de former des structures multimériques (PcrV $_{\Delta Cter}$, PcrV $_{L276D}$, PcrV $_{V255D/L262D}$), ce qui pourrait expliquer leur défaut de virulence, tandis qu'un autre en formait spontanément (PcrV $_{L262D/V273D}$). Nous nous sommes demandé si ces protéines sont toujours capables d'interagir avec l'aiguille de sécrétion et si, à priori elles se trouvent localisées de façon correcte avant infection. Les western blots réalisés sur des échantillons d'aiguilles purifiées à partir de souches exprimant chacune des protéines mutantes ont montré que PcrV muté est retrouvé dans les fractions d'aiguilles, suggérant qu'il est localisé à leurs sommets. Par contre, nous ne pouvons pas savoir si l'assemblage du complexe est correct. Mais les résultats obtenus précédemment sur l'oligomérisation des mutants impliquent que la protéine mutée au sommet de l'aiguille, soit ne forme pas un complexe (PcrV $_{\Delta Cter}$, PcrV $_{L276D}$ et PcrV $_{V255D/L262D}$), ou forme une structure peut être mal assemblée qui n'est donc pas fonctionnelle (PcrV $_{L262D/V273D}$).

2.2 Domaines importants pour la fonction de PcrV

L'orientation du complexe de LcrV au sommet des aiguilles de sécrétion a été suggérée par superposition de la structure monomérique de LcrV (Derewenda *et al.*, 2004), sur la modélisation de l'aiguille de *S. flexneri* (Deane *et al.*, 2006). Les auteurs ont utilisé l'homologie de structure entre l'hélice C terminale de LcrV et l'hélice C terminale de MxiH pour proposer un modèle de l'assemblage de LcrV sur MxiH (Deane *et al.*, 2006, Chapitre 4, Paragraphe 3.2). Une autre équipe, a vérifié cette orientation en étudiant au MET à balayage les structures formées au sommet des aiguilles de *Y. enterocolitica* de LcrV en comparaison avec celles formées par PcrV et AcrV (leur homologue chez *Aeromonas salmonicida*) (Broz *et al.*, 2007). La différence entre les tailles des domaines globulaires N terminal et central entre les trois homologues, qui conduit à la formation de complexes de volume et de forme un peu variables, a été mise à profit pour déterminer l'orientation de ces protéines. Des hybrides entre les homologues ont été générés, où le domaine globulaire N terminal d'une protéine a été greffé avec le coiled-

coil et le domaine globulaire central d'une autre protéine (Figure 9.9). L'observation en MET à balayage des différents complexes obtenus au sommet d'aiguilles purifiées a permis de confirmer l'orientation prédite par la modélisation : le domaine globulaire N terminal de la protéine est orienté du côté de l'aiguille, avec l'hélice C terminale pointant vers les unités YscF et le domaine globulaire central est orienté du côté distal du complexe (Broz *et al.*, 2007, Chapitre 4, Paragraphe 3.2).

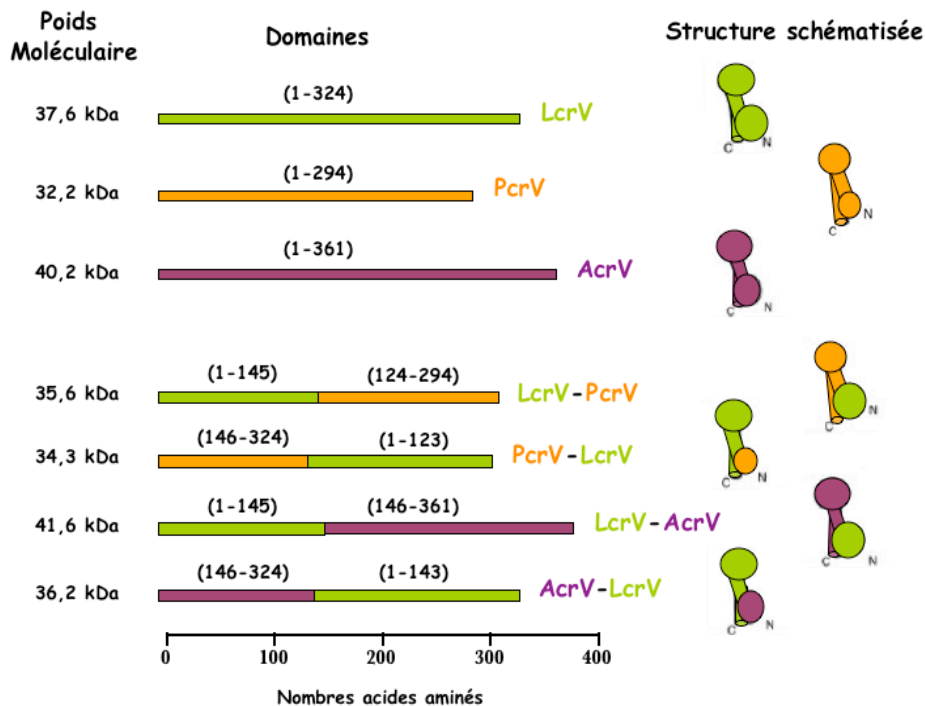


Figure 9.9 : Schéma des homologues LcrV de *Y. enterocolitica*, PcrV de *P. aeruginosa* et AcrV d'*A. salmonicida* et des hybrides de ces protéines.

Les protéines sont représentées selon un code de couleur : LcrV en vert, PcrV en orange et AcrV en violet. La structure est schématisée pour rendre compte des différences de volume entre les domaines N terminal et central. Il est à noter que l'hélice C terminale redescend le long de la structure et se termine du côté du domaine N terminal. N et C représentent les extrémités N terminale et C terminale, respectivement. Les hybrides générés entre ces homologues sont aussi schématisés. Les domaines (nombre d'acides aminés) échangés sont précisés et une schématisation de la structure de la protéine finale, rendant compte des différences de volume des domaines, est proposée. Le poids moléculaire de toutes les protéines est indiqué à gauche.

Pour comparer leurs résultats chez *Y. enterocolitica* avec l'expression des mêmes hybrides chez *P. aeruginosa*, l'équipe du docteur Cornelis G. R a engagé une collaboration avec notre équipe. Dans un premier temps, nous voulions observer ensemble les complexes distaux formés par LcrV, PcrV, AcrV et leurs hybrides au sommet des aiguilles de *P.*

aeruginosa. Les séquences codant pour les trois homologues ainsi que leurs hybrides ont donc été insérées dans un vecteur permettant leur expression dans cette bactérie. Malheureusement, la purification des aiguilles d'une souche de *P. aeruginosa* CHAΔFliC, réalisée pour optimiser les conditions de purification, n'a pas permis d'obtenir les aiguilles et leurs complexes distaux à une concentration et une pureté satisfaisante pour une telle étude (Voir pureté figure 9.8 b).

En se basant sur les observations que *pcrV* n'est capable de compléter efficacement une souche de *Y. enterocolitica* déficiente pour *lcrV* (Δ LcrV) qu'en présence de tout l'opéron natif *pcrGVHpopBD* (Broms *et al.*, 2003), les auteurs ont utilisé le fait que PcrV et LcrV seuls ne sont pas interchangeables. Ils ont étudié l'effet de l'expression de LcrV, PcrV, AcrV et chacun des hybrides dans une souche Δ LcrV. L'effet de la complémentation par chacun des translocateurs a été évalué par mesure de la lyse d'érythrocytes, reflète la quantité de pores de translocation formés dans les membranes de ces cellules. Les résultats sont résumés dans le tableau 5.

Souche	WT	Δ LcrV (Δ V)	Δ V/ LcrV	Δ V/ PcrV	Δ V/ AcrV	Δ V/ LcrV- PcrV	Δ V/ PcrV- LcrV	Δ V/ LcrV- AcrV	Δ V/ AcrV- LcrV
% Hémolyse	45	0,3	61	1,5	50	52	0,4	54	50

Tableau 5 : Résumé des résultats d'hémolyse de *Y. enterocolitica* exprimant LcrV, ces homologues ou les hybrides des homologues (Broz *et al.*, 2007).

La virulence de souches de *Y. enterocolitica* n'exprimant pas *lcrV* mais complémentees pour l'expression de LcrV, PcrV, AcrV, ou des hybrides a été mesurée par leur capacité à lyser des érythrocytes. Synthèse des résultats présentés par Broz *et al.*, 2007.

Comme attendu, la protéine LcrV mais pas PcrV est capable de compléter une souche Δ LcrV. Par contre, AcrV peut substituer LcrV. Ainsi, les hybrides LcrV-AcrV et AcrV-LcrV sont aussi fonctionnels, au même titre que les protéines natives. Les hybrides LcrV-PcrV et PcrV-LcrV, quant à eux se comportent différemment. LcrV-PcrV complémente la souche mutante et PcrV-LcrV, quant à lui, ne la complémente pas. Les auteurs ont conclu à partir de ces résultats et à partir d'expériences d'interaction des hybrides avec les translocateurs hydrophobes (overlay), que le domaine globulaire N terminal de LcrV est nécessaire à la fonction de la protéine et à sa spécificité vis-à-vis de ses translocateurs. En effet, seul l'hybride contenant ce

domaine natif est fonctionnel et permet la formation du pore de translocation dans les membranes.

Les protéines PcrV et PcrV-LcrV, quant à elles, ne permettent pas l'insertion de YopB, ce qui explique le défaut d'hémolyse observé pour ces souches. Les auteurs proposent donc que le domaine globulaire N terminal interagisse avec YopB et est responsable de l'assemblage correct du pore de translocation dans les cellules hôtes.

Nous avons étudié l'effet de l'expression de ces hybrides dans la souche CHA Δ V par mesure de la cytotoxicité des souches complémentées et de leur capacité de sécrétion (Figure 9.10 a et b).

Chez *P. aeruginosa*, les constructions permettant l'expression de PcrV (de la souche CHA) du laboratoire (V_{wt} sur la figure 9.10 a) (Goure *et al.*, 2004) ainsi que celle clonée à partir des constructions de G. R Cornelis (de la souche PAO1) (PcrV sur la figure 9.10 a) complètent de façon similaire la souche CHA Δ V. Par contre, en accord avec les résultats publiés (Broms *et al.*, 2003), CHA Δ V/LcrV n'est pas cytotoxique (Figure 9.10 a). De même, la protéine AcrV n'est pas capable de remplacer PcrV. Ainsi, tous les hybrides générés par échange de domaines entre LcrV et AcrV sont de ce fait incapables de compléter un défaut d'expression de PcrV (Figure 9.10 a).

L'hybride LcrV-PcrV, quant à lui, est fonctionnel. Son expression dans CHA Δ V permet l'insertion d'un pore de translocation et conduit à la lyse des macrophages infectés à une efficacité comparable à celle d'une souche sauvage. Par contre, l'hybride PcrV-LcrV n'est pas fonctionnel (Figure 9.10 a).

Tous les hybrides sont produits et sécrétés comme nous avons pu le vérifier par western blot sur les culots et surnageants de culture, respectivement (Figure 9.10 b). Ainsi, les résultats de cytotoxicité que nous avons obtenus reflètent bien la fonctionnalité des protéines dans l'assemblage du pore de translocation. Ils ne concordent pas avec les conclusions tirées précédemment de l'expression de ces protéines chez *Y. enterocolitica*. En effet, si le domaine globulaire N terminal est à lui seul nécessaire à la fonction de la protéine, nous nous attendions à ce que l'hybride LcrV-PcrV ne soit pas fonctionnel alors que l'hybride PcrV-LcrV soit fonctionnel chez *P. aeruginosa*.

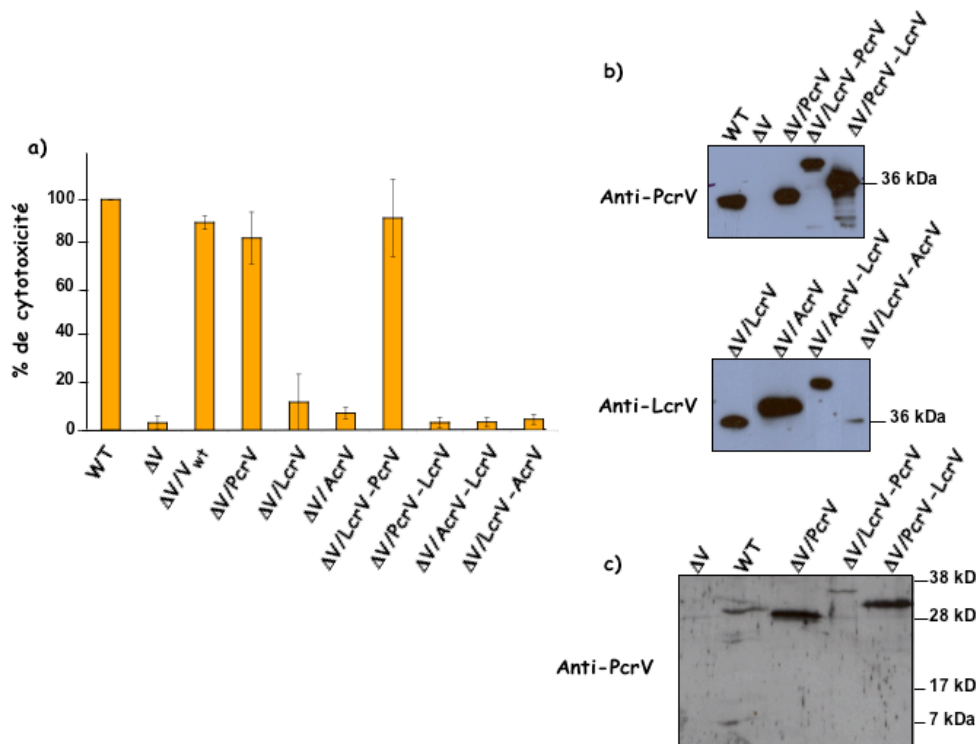


Figure 9.10 : Evaluation de l'expression de PcrV, LcrV, AcrV ou d'hybrides de chaque protéine par une souche de *P. aeruginosa* CHAΔV.

La souche CHAΔV a été complétée pour l'expression de PcrV, LcrV, AcrV et des hybrides LcrV-PcrV, PcrV-LcrV, LcrV-AcrV et AcrV-LcrV (Figure 9.10).

a) Cytotoxicité des souches complétées. **b)** La sécrétion de chacune des protéines exprimées a été vérifiée par western blot sur les surnageants de culture. Sont présentés ici les résultats pour la sécrétion, au-dessus de PcrV et des hybrides LcrV-PcrV et PcrV-LcrV, révélés par un anticorps anti-PcrV. La sécrétion de LcrV, AcrV et des hybrides LcrV-AcrV et AcrV-LcrV a été révélée par un anticorps dirigé contre LcrV. **c)** Purification des aiguilles des souches CHAΔV exprimant PcrV et les hybrides LcrV-PcrV et PcrV-LcrV. Détection de la co-purification de PcrV et des hybrides par un anticorps anti-PcrV.

Nous avons également purifié les aiguilles synthétisées par les souches CHAΔV complétées par PcrV, LcrV-PcrV et PcrV-LcrV pour examiner si les hybrides sont bien localisées avec les aiguilles. Comme nous l'avons abordé précédemment, il ne nous a pas été possible d'observer les complexes par MET à balayage. Par contre, dans les échantillons d'aiguilles purifiées nous avons détecté par western blot la présence de PcrV, LcrV-PcrV, et de PcrV-LcrV (Figure 9.10 c). Ces résultats impliquent que les protéines sont capables de se fixer sur l'aiguille mais aucune donnée ne nous permet d'assurer que le complexe est correctement formé.

Les résultats que nous avons obtenus pour l'expression des protéines PcrV, LcrV, AcrV ainsi que leurs hybrides dans P. aeruginosa, ne permettent pas de généraliser les conclusions tirées précédemment chez Y. enterocolitica (Broz et al., 2007). Nous pensons donc qu'il est réducteur d'imputer au seul domaine N terminal de la protéine V sa spécificité vis-à-vis de ses translocateurs et sa nécessité pour une insertion correcte de ces derniers dans les membranes des cellules hôtes.

Des délétions dans le domaine N terminal d'IpaD entraînent une diminution de l'hémolyse de RBC par *S. flexneri* (Picking *et al.*, 2005). Ces résultats sont dus à une diminution de l'insertion des translocateurs IpaB et IpaC dans les membranes cellulaires, ainsi qu'à un délai plus long pour ce phénomène. Les pores insérés présentent cependant les mêmes dimensions qu'un pore de translocation inséré par une protéine IpaD sauvage. Les auteurs proposent donc que la protéine IpaD contrôle l'efficacité avec laquelle les translocateurs IpaB et IpaC interagissent avec les membranes des cellules hôtes (Picking *et al.*, 2005).

De plus, une délétion du domaine C terminal d'IpaD empêche le recrutement du translocateur IpaB au sommet de l'aiguille de sécrétion (Johnson *et al.*, 2007). Ainsi, le rôle d'IpaD dans l'insertion d'un pore de translocation fonctionnel ne peut être imputé à un seul domaine particulier de la protéine.

Les auteurs ayant étudié l'expression des hybrides de LcrV, PcrV et AcrV, proposent que le domaine globulaire N terminal est essentiel à la fonction d'insertion du pore dans les cellules (Broz *et al.*, 2007). Après expression des mêmes hybrides chez *P. aeruginosa*, il semble que le modèle d'assemblage de V au sommet de l'aiguille est plus complexe que celui suggéré. Il est par ailleurs possible que ce domaine détermine l'efficacité de l'interaction des translocateurs hydrophobes avec les membranes des cellules hôtes comme proposé pour IpaD (Picking *et al.*, 2005). Les défauts de cytotoxicité de certains hybrides, en particulier l'hybride PcrV-LcrV pourrait s'expliquer par une efficacité d'insertion du pore diminuée.

Il est aussi possible que les deux domaines globulaires des protéines V sont importants pour l'insertion des translocateurs dans les membranes des cellules hôtes. Dans le paragraphe 1, nous avons aussi vu que la capacité du translocateur hydrophile à oligomériser était importante pour l'infection dépendante du SST3. Nous avons montré dans ce paragraphe que l'hélice C terminale joue aussi un rôle important dans l'insertion des pores de translocation, phénomène qui serait dû à la possibilité pour la

protéine de former une structure multimérique. Il est intéressant de noter que l'hybride fonctionnel chez *P. aeruginosa* est l'hybride LcrV-PcrV qui contient l'hélice C terminale de PcrV.

Manuscrit

Oligomerization of PcrV and LcrV,
protective antigens of *Pseudomonas*
aeruginosa and *Yersinia pestis*.

Oligomerization of PcrV and LcrV, Protective Antigens of *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia pestis**^[5]

Received for publication, April 24, 2008, and in revised form, June 4, 2008. Published, JBC Papers in Press, June 26, 2008, DOI 10.1074/jbc.M803146200

Gébus Caroline¹, Faudry Eric, Yu-Sing Tammy Bohn², Elsen Sylvie, and Ina Attree³

From the Laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés (Unité mixte de recherche 5092), CNRS, Université Joseph Fourier, Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), DSV, iRTSV, Grenoble, France

Protective antigens of *Pseudomonas aeruginosa* (PcrV) and *Yersinia pestis* (LcrV) are key elements of specialized machinery, the type III secretion system (T3SS), which enables the injection of effector molecules into eukaryotic cells. Being positioned at the injectisome extremity, V proteins participate in the translocation process across the host cell plasma membrane. In this study, we demonstrate the assembly of V proteins into oligomeric doughnut-like complexes upon controlled refolding of the proteins *in vitro*. The oligomeric nature of refolded PcrV was revealed by size exclusion chromatography, native gel electrophoresis, and native mass spectrometry, which ascertain the capacity of the protein to multimerize into higher-order species. Furthermore, transmission electron microscopy performed on oligomers of both PcrV and LcrV revealed the presence of distinct structures with approximate internal and external diameters of 3–4 and 8–10 nm, respectively. The C-terminal helix, $\alpha 12$, of PcrV and notably the hydrophobic residues Val²⁵⁵, Leu²⁶², and Leu²⁷⁶ located within this helix, were shown to be crucial for oligomerization. Moreover, the corresponding mutant proteins produced in *P. aeruginosa* were found to be non-functional in *in vivo* type III-dependent cytotoxicity assays by directly affecting the correct assembly of PopB/D translocon within the host cell membranes. The detailed understanding of structure-function relationships of T3SS needle tip proteins will be of value in further developments of new vaccines and antimicrobials.

The majority of human and animal Gram-negative bacterial pathogens use specialized nanomachinery, called type III secretion systems (T3SS),⁴ to deliver a subset of bacterial proteins

* This work was supported in part by Research Contract 06.70.151.00.470.75.96 from Délégation Générale pour l'Armement (DGA) and the French Cystic Fibrosis Association Vaincre la Mucoviscidose. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

^[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Tables S1 and S2.

¹ Supported by a Ph.D. fellowship from the Délégation Générale pour l'Armement.

² Supported by a postdoctoral fellowship from the Direction des sciences du vivant, Commissariat à l'Energie Atomique.

³ To whom correspondence should be addressed: iRTSV/BBIS, Commissariat à l'Energie Atomique Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 09, France. Tel.: 33-438783483; Fax: 33-438784499; E-mail: iattreedelic@cea.fr.

⁴ The abbreviations used are: T3SS, type III secretion system; GST, glutathione S-transferase; RBC, red blood cell; SEC, size exclusion chromatography; TEM, transmission electron microscopy.

into the host cell cytoplasm. The collection of T3SS-delivered "effectors" interferes with cell signaling, inflammation processes, and actin dynamics leading notably to breakdown of the immune system permitting the infection to be installed (1, 2).

The T3S apparatus is built up on the bacterial surface upon close contact with the target eukaryotic host cell. It is composed of more than 20 proteins that assemble into a syringe-like structure composed of a set of multimeric protein rings embedded within two bacterial membranes and of a "needle" section of approximately 80 nm protruding out from the surface (3–6). The whole structure is hollow and is presumed to serve as a conduit by which the substrate molecules travel in a partially unfolded state to reach their target localization (7). The first substrates supposed to pass through the needle channel are the so-called translocators, proteins that assemble at the needle extremity and/or insert within the host cell plasma membrane (8–10). The translocon is composed of three proteins, two of which possess hydrophobic domains and are found within host cell membranes after infection (11, 12). In addition, the translocators oligomerize in the presence of lipids to form rings with an internal diameter of 4 nm that permit the release of small molecules from lipid vesicles (13, 14), suggesting that these proteins participate in the breaching of the eukaryotic plasma membrane.

A key component of the effector delivery machinery and a part of the translocon is the well known protective antigen (15–18): LcrV in pathogenic *Yersinia* spp. and PcrV in *Pseudomonas aeruginosa*. The localization of V proteins on the tip of the secretion needle has been elegantly visualized for the first time using scanning transmission electron microscopy on isolated native *Yersinia* needles (19). The position of the homologous protein IpaD of *Shigella* was also recently demonstrated (20, 21).

Functional studies by our group and others demonstrated that the V proteins are soluble and hydrophilic and they neither insert in nor interact with membranes (11, 14, 22). Moreover, V proteins of *Yersinia* and *Pseudomonas* fulfill their function by chaperoning the translocators (YopB/D in *Yersinia* and PopB/D in *P. aeruginosa*) to be correctly inserted into membranes (22–24), being thus required for the translocation process. In accordance with their position on the top of the secretion needle and with their function in translocation of effectors, antibodies raised against V proteins are protective both in cellular and animal models of infection (16, 22, 25–27), making these proteins attractive targets toward the development of vaccines.

In this work, we show that the V proteins, following controlled refolding *in vitro*, are able to multimerize into dough-

Oligomerization of PcrV and LcrV

nut-like complexes consisting of at least four subunits. Oligomerization requires the C terminus of PcrV, notably the hydrophobic amino acids within the α 12 helix. Mutations in the α 12 helix have no effect on PcrV, PopB, and ExoS secretion in *P. aeruginosa*, but are drastic regarding bacterial cytotoxicity toward macrophages by influencing the incorporation of hydrophobic translocators within host membranes. These results reveal that V proteins, once located on the T3S needle tip, are oligomeric, and that the multimerization process probably requires unfolding of the protein during secretion.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bacterial Strains and Growth Conditions

P. aeruginosa strains used in this study are listed in Table S1. All mutant strains derive from the cystic fibrosis isolate CHA (28, 29), which is referred to as the wild-type strain. *P. aeruginosa* was grown on *Pseudomonas* Isolation Agar plates (Difco) or in liquid Luria-Bertani (LB) medium at 37 °C with agitation. Carbenicillin was used for selection at 500 μ g/ml for *Pseudomonas* Isolation Agar plates and 300 μ g/ml in LB. An *Escherichia coli* Top10 strain was employed for standard cloning experiments using the pTOPO blunt-ended cloning kit (Invitrogen). *E. coli* BL21Star (DE3) (Invitrogen) was used for overproduction of proteins.

Cloning Procedures and Mutagenesis

Construction of Expression Vectors—A DNA fragment encoding full-length PcrV was PCR amplified with the Advantage 2 Polymerase mixture (Clontech), using oligonucleotides CG_VNdeI and CG_VAatII and pIApG-*pcrV* as template (supplemental Tables S1 and S2). The PcrV Δ Cter mutant (residue 1 to 254) was constructed by PCR with pIA60 as a template and oligonucleotides CG_VNdeI and CG_ δ VAat (supplemental Tables S1 and S2). The resulting PCR products were cloned into pTOPO vector (Invitrogen) and verified by double strand sequencing. The NdeI-AatII fragments were cloned into the second multicloning site of pET-Duet1 (Novagen) generating pET-Duet1-*pcrV* and pET-Duet1-*pcrVdeltaCter*.

Construction of Pseudomonas Complementation Vectors—The plasmid pIApG-*pcrV* was used to express wild-type PcrV in CHA Δ V, a strain carrying a chromosomal deletion of *pcrV* (12). The truncated PcrV (PcrV Δ Cter, residues 1 to 254) was cloned from pIA60 (12) into the pTOPO vector as described above. The NdeI-HindIII-digested fragment was then cloned into the pIApG vector in replacement of the *gfp* cassette placing it under control of the *pcrV* promoter pG (as described in Ref. 12) generating pIApG-*pcrVdeltaCter*. Plasmids were introduced into *P. aeruginosa* CHA Δ V strain by transformation as described elsewhere (30).

Site-directed Mutagenesis—PcrV mutants V255D, T259D, L262A, L262D, Y269D, V273D, L276A, L276D, R278A, F279A, Y283A, D284A, V286A, R288A, I290A, and V255D/L262D were generated by employing the QuikChange mutagenesis kit (Stratagene) using plasmids pIApG-*pcrV* or pET-Duet1-*pcrV* as templates. The oligonucleotides used are listed in supplemental Table S2. Mutated pIApG-*pcrV* plasmids were transformed into the CHA Δ V strain for phenotypic studies. Mutated

pET-Duet1-*pcrV* plasmids were transformed into *E. coli* BL21Star (DE3) for overproduction of proteins.

Expression and Purification of Wild-type and Mutant PcrV

Expression of PcrV and its mutants was performed in *E. coli* BL21Star (DE3) strain grown in 900 ml of Terrific broth (12 g/liter Bacto-tryptone, 24 g/liter Bacto-yeast extract, 4% w/v glycerol) buffered with 100 ml of potassium phosphate solution (0.17 M KH₂PO₄, 0.72 M K₂HPO₄, pH 7.4). Expression was induced with 0.5 mM isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside at an A₆₀₀ of 0.7 and cells were additionally grown for 3 h at 37 °C at 210 rpm. Cells were harvested by centrifugation and lysed by three passages through a French press in lysis buffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.8) supplemented with Protease Inhibitor Cocktail (Roche). The supernatant was cleared by ultracentrifugation at 50,000 \times g at 4 °C for 45 min and applied to a 5-ml anion exchange column (HiTrapTM Q HP, GE Healthcare). The column was washed by 25 ml of wash buffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.8) and the protein eluted with a 50-ml gradient ranging from 50 mM Tris/HCl, pH 8.8, to 50 mM Tris/HCl, pH 8.8, 350 mM NaCl. Fractions containing the protein were pooled and applied to a gel filtration column (HiLoad 16/60 SuperdexTM 200, GE Healthcare) previously equilibrated in 25 mM Tris/HCl, pH 8, 100 mM NaCl.

Expression and Purification of LcrV

Expression of the GST-LcrV fusion protein (22) was performed in *E. coli* BL21Star (DE3) in the same manner as for PcrV. Cells were harvested by centrifugation and lysed by three passages through a French press in phosphate-buffered saline (10 mM phosphate buffer, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7.4) supplemented with Protease Inhibitor Cocktail (Roche). The supernatant was cleared by ultracentrifugation at 50,000 \times g at 4 °C for 45 min and applied to a 1-ml glutathione affinity column (GST-TrapTM HP, GE Healthcare) equilibrated in phosphate-buffered saline. The column was washed with 5 ml of phosphate-buffered saline and then prepared for enzymatic digestion by equilibration with 10 ml of cleavage buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol). Digestion was performed on the column with 160 units of PreScission ProteaseTM (GE Healthcare) incubated for 4 h at 4 °C. LcrV was eluted with elution buffer (50 mM Tris/HCl, pH 8, 10 mM reduced glutathione).

Intrinsic Fluorescence and Circular Dichroism Measurement

Tryptophan fluorescence emission spectra were measured on a Jasco FP-6500 fluorimeter with an excitation wavelength of 280 nm (10 nm slit). Emission was monitored from 300 to 400 nm (10 nm slit) at a 100 nm min⁻¹ rate and is the average of three accumulations. Proteins were analyzed in a 1-cm optical path cell at a concentration of 1 μ M in 25 mM Tris/HCl, pH 8, 100 mM NaCl buffer. Spectra were corrected by subtraction of the buffer spectra using Jasco Spectra Analysis software. Far-UV and near-UV circular dichroism spectra were acquired on a Jasco J-810 spectrophotometer with a scan speed of 50 nm \times min⁻¹ at 20 °C. Spectra are the average of 15 scans corrected by subtraction of the spectra acquired on buffer (25 mM Tris/HCl, pH 8, 100 mM NaCl) alone. Measurements in the

Oligomerization of PcrV and LcrV

far-UV region were performed in 0.1-cm path length cells on a 1 μM protein sample in 25 mM Tris/HCl, pH 8, 100 mM NaCl buffer. The signal was recorded from 250 to 195 nm. Near-UV CD spectra were obtained from 320 to 250 nm using a 1-cm path length cell and a protein concentration of 10 μM in 25 mM Tris/HCl, pH 8, 100 mM NaCl buffer. CD measurements were normalized to protein concentration and presented as molecular ellipticity. To monitor the effect of the pH on PcrV, intrinsic fluorescence and CD spectra were obtained under the same conditions with 25 mM acetate buffers with pH values ranging from 6.0 to 3.0 and HCl solutions with pH values from 2.5 to 1.0. All buffers contained 100 mM NaCl.

Unfolding-Refolding of Proteins by pH Treatment

Pure PcrV or LcrV in 25 mM Tris/HCl, pH 8, 100 mM NaCl buffer was treated with HCl (12 M). The quantity of HCl necessary to reach pH 2.6 was previously determined on blank samples and was subsequently added to the protein samples while mixing. The pH was immediately neutralized to about 7.5 by adding a sufficient volume of 1 M Tris/HCl, pH 8. Samples were injected on HiLoad 16/60 SuperdexTM 200 (GE Healthcare) to assess the efficiency of the oligomeric species formation. The ratio between the peak areas of the monomers and the multimers was calculated from size exclusion chromatography (SEC) chromatograms.

Native Gel Electrophoresis

Native gel electrophoresis was performed in an 8% acrylamide gel prepared in 0.4 M Tris/HCl, pH 8.9. Ten micrograms of the proteins were mixed with nondenaturing loading buffer (0.3 M Tris/HCl, pH 6.8, 50% glycerol, 0.5% bromophenol blue) and the samples were loaded and run at room temperature at 25 mA in 25 mM Tris base, 20 mM glycine. The gel was stained with Coomassie Blue.

Native Mass Spectrometry

Native mass spectrometry measurements were performed using a Q-TOF Micromass spectrometer (Micromass, Manchester, UK) equipped with an electrospray ion source. It operated with a needle voltage of 3,000 kV, and sample cone and extraction cone voltages of 30 and 0.5 V, respectively. The Backing Pirani pressure was set at 5 mbar. Mass spectra were recorded in the 1,500–6,000 mass to charge (m/z) range. Sample concentration was 10 μM in 25 mM ammonium acetate and was continuously infused at a flow rate of 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Mass spectra were acquired and data were processed with MassLynx 4.0 (Waters).

Transmission Electronic Microscopy

Samples for Transmission Electron Microscopy (TEM) analysis were loaded on carbon films at a concentration of 0.1 mg/ml and stained by 2% uranyl acetate. A grid was added on top of the carbon film and air dried. Micrographs were taken under low-dose conditions with a Philips CM12 microscope operating at 100 kV and a nominal magnification of 30,000-fold. Diameters of the ring-like structures were calculated using the conversion 1 pixel stands for 3.5 Å (conversion correspond-

ing to the magnification used). The values are the mean of 10 structures evaluated on the photographs.

Macrophage Infection and Cytotoxicity Assays

Cytotoxicity assays were performed as previously described (31). Briefly, the macrophage cell line J774 (ATCC) was grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal calf serum (Invitrogen). Cells were seeded at 2×10^5 per well in 48-well plates the day before infection. Overnight bacterial cultures were diluted in LB at an A_{600} of 0.1 and allowed to grow to A_{600} of 1 at 300 rpm and at 37 °C. Macrophages were infected at a multiplicity of infection of 5 and infection was performed for 3 h in 300 μl of Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum in a CO₂ (5%) incubator at 37 °C. Cytotoxicity was assessed by determination of lactate dehydrogenase release into supernatants of the infected cells using a cytotoxicity detection kit (Roche) as described previously (32).

Analysis of Secreted T3SS Proteins

P. aeruginosa strains expressing wild-type or mutant PcrV were grown overnight at 37 °C with agitation in liquid LB with carbenicillin, when necessary. Overnight cultures were diluted to an A_{600} of 0.2 in LB containing 5 mM EGTA and 20 mM MgCl₂ for T3SS induction. Incubation was prolonged for about 3 h until the culture reached an A_{600} of 1.0. Ten microliters of culture supernatants were directly analyzed by SDS-PAGE. Immunoblotting was performed using polyclonal antibodies raised against PcrV and PopB (12, 22) followed by a secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Sigma). Membranes were developed by using an enhanced chemiluminescence kit (ECL, GE Healthcare).

Hemolysis Assay and Purification of Red Blood Cell Membranes

Hemolysis assays were performed on sheep red blood cells (RBCs) (ELITech, France) as described (11, 12, 22). The membranes of RBCs were purified after the infection with *P. aeruginosa* according to the protocol described before (12, 22) with some modifications. Briefly, sheep RBCs (50% suspension) were washed three times in RPMI 1640 medium (Sigma) and resuspended at a concentration of 3 to 6 $\times 10^9$ RBCs/ml at 4 °C. *P. aeruginosa* were grown to an A_{600} of 1, and 3 $\times 10^9$ colony forming units/assay were centrifuged and resuspended in 500 μl of RPMI 1640 medium. In a final volume of 1.5 ml, 3 $\times 10^9$ RBCs were mixed with *P. aeruginosa* at a multiplicity of infection of 1 and centrifuged at 2,000 $\times g$ for 10 min at 4 °C to maximize the bacterial-RBC contact. After a 1-h incubation at 37 °C in the presence of a Protease Inhibitor Cocktail (Complete; Roche), the RBCs were lysed by adding 2 ml of MilliQ water and vortexing. Bacteria and cell debris were removed by centrifugation, and the supernatant was brought to a final concentration of 62% sucrose. The sample was overlaid with a discontinuous sucrose gradient consisting of 4 ml of 44% and 3 ml of 25% sucrose in Tris/saline solution (30 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5). All solutions were supplemented with protease inhibitor mixture and centrifuged in a SW41 rotor at 28,000 $\times g$ for 16 h at 4 °C. The membranes were recovered from the interface

Oligomerization of PcrV and LcrV

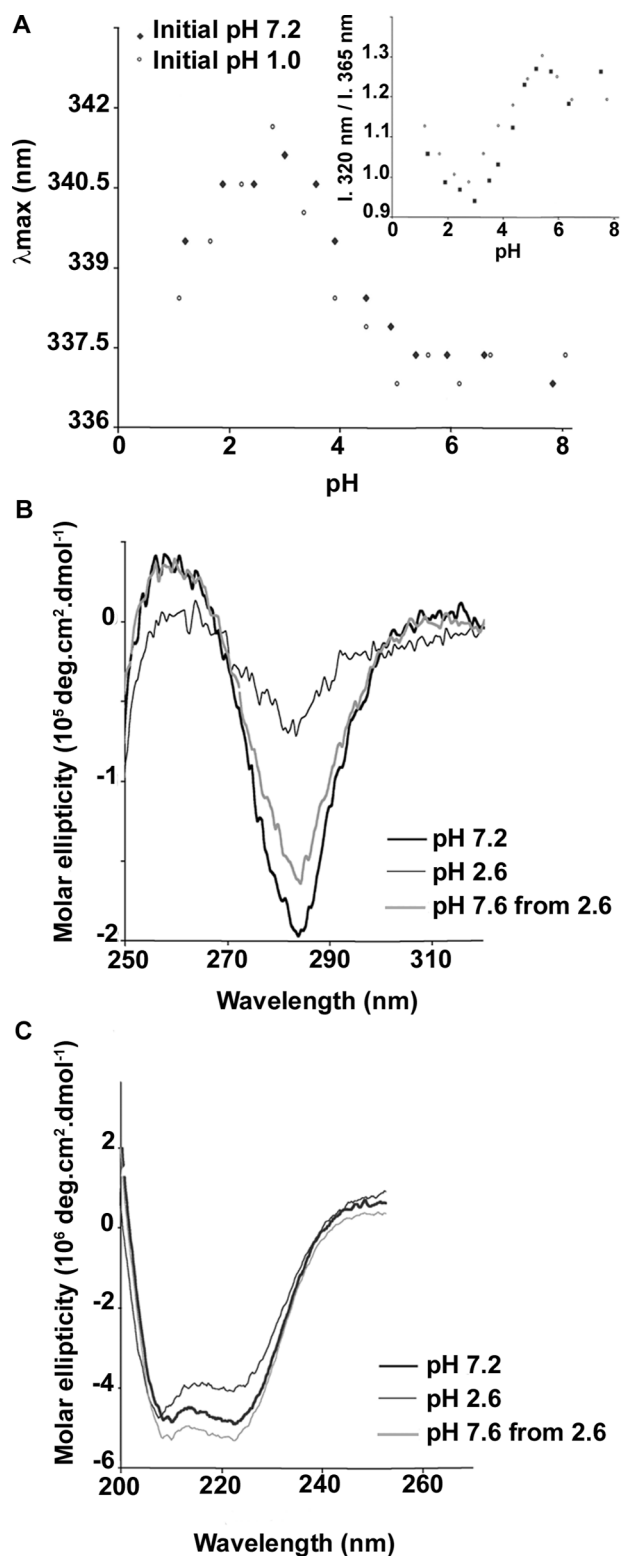


FIGURE 1. Reversible PcrV unfolding induced by pH decrease. Conformational changes were assessed by monitoring tryptophan fluorescence emission and circular dichroism (CD). *A*, fluorescence emission spectra were recorded upon excitation at 280 nm at pH ranging from 1.0 to 7.0 and a protein concentration of 1 μM . The initial pH of the PcrV solution, either 7.2 (closed diamonds) or 1.0 (open circles), was promptly changed by a 10-fold rapid dilution into buffer solutions with lower or higher pH values, respectively. For each spectrum, the maximum wavelength of emission as well as the ratio of the emission intensity (I) at 320 and 365 nm (inset) was determined. CD spectra of PcrV at pH 7.2 (bold line), 2.6 (thin line), and 7.6 after incubation at pH 2.6 (gray line), were recorded in near-UV (*B*) and far-UV (*C*) to

of the 25 and 44% sucrose layers, diluted in Tris/saline, and concentrated by ultracentrifugation at $372,000 \times g$ for 20 min at 4 °C. The pellets were resuspended in Laemmli buffer, and the proteins were separated by SDS-PAGE. The presence of PopB, PopD, and PcrV in the membranes was analyzed by immunoblot detection using the antibodies as described above.

Structure Analysis

The atomic structure of LcrV (Protein Data Bank number 1RGF) was analyzed with PyMol (33). The C-terminal α -helices of LcrV (*Y. pestis*) and PcrV was aligned using ClustalW.

RESULTS

Refolding of PcrV Promotes the Formation of Multimers—Recombinant PcrV and its homologues were previously shown to behave as monomers in solution (14, 23, 34–36), although some reports showed that LcrV may exist as a dimer (37, 38). The crystal structure of the LcrV monomer revealed that it folds into 6 β -sheets and 12 α -helices with a unique intramolecular coiled-coil, thus resembling an elongated dumbbell-shaped molecule (36). However, the monomeric state of V antigens is incompatible with the position and shape of LcrV and PcrV at the extremity of the native needles of *Yersinia* recently visualized by scanning transmission electron microscopy (19). To biochemically demonstrate the ability of PcrV to oligomerize, we postulated that the protein should be unfolded and refolded to reach its final structure. Indeed, it is thought that the secreted proteins should be partially unfolded to travel through the 3-nm narrow T3SS needle and then refold when they reach the needle extremity or their final destination (39).

Native, non-tagged *P. aeruginosa* PcrV was obtained by a two-step purification including anion exchange chromatography followed by a SEC as described under “Experimental Procedures.” To mimic *in vitro* the secretion of PcrV that occurs in a partially unfolded conformation, different conditions were tested and the variation of pH was chosen, because lowering the pH to 2.6 drives the protein into a molten globule conformation (see below). This flexible conformation corresponds to an intermediate state in protein folding that facilitates structural rearrangement (40).

The unfolding and refolding of PcrV *in vitro* was followed by intrinsic fluorescence and circular dichroism (CD) experiments (Fig. 1). The intrinsic fluorescence of PcrV was monitored by determining the emission maxima wavelengths (λ_{\max}) and the ratio of the intensities at 320 and 365 nm (Fig. 1*A*). These measurements give an indication of the compactness of the protein and solvent exposure of tryptophan residues because the fluorescence of these residues depends on the hydrophobicity of their environment. PcrV harbors three tryptophan residues (Trp⁶¹, Trp⁹², and Trp¹⁸⁶), and the intrinsic fluorescence of the protein reflects the average contribution of each tryptophan. Based on the LcrV crystal structure, Trp⁶¹ and Trp¹⁸⁶ are rela-

assess tertiary and secondary structure, respectively. The pH was lowered to 2.6 by rapid dilution, as described above, and subsequently neutralized by the addition of 1 M Tris/HCl, pH 8.0. Spectra are the average of 15 scans. Protein concentrations were 10 and 1 μM in 25 mM Tris/HCl, pH 7.2, containing 100 mM NaCl for near- and far-UV, respectively.

Oligomerization of PcrV and LcrV

tively exposed to the solvent, whereas Trp⁹² is involved in the interaction between α -helices 7 and 12. This is in agreement with the λ_{\max} of 337 nm observed at neutral pH, corresponding to an overall moderate solvent exposure. Lowering the pH in a range from 7.2 to 1.0 induces a reversible exposure of PcrV tryptophan residues, noticed by a red-shift of the λ_{\max} that reached a maximum at pH 2.6. CD spectra were collected in far- and near-UV to assess secondary and tertiary structures, respectively. At pH 7.2, the PcrV CD spectrum in the near-UV region exhibited a minimum at 284 nm reflecting the existence of a stable tertiary structure. Bringing down the pH to 2.6 resulted in a significant decrease of the signal, indicating a loss of rigid tertiary structure. The unfolding can be reversed by the rapid adjustment to neutral pH (Fig. 1B). The CD spectra of PcrV in the far-UV region are identical at pH 7.2 and 2.6 (Fig. 1C) and display minima at 208 and 222 nm, characteristics of a large predominance of α -helices, indicating that the secondary structure of the protein is not modified even at pH 2.6. Thus, the protein adopts at this pH a molten globule conformation characterized by a native-like secondary structure and a loss of rigid tertiary structure. Taken together, these data show that pH may be used to reversibly manipulate the PcrV folding.

SEC analysis of the untreated PcrV ($V_{\text{untreated}}$) revealed a single peak eluting at 72 ml, which corresponds to a globular protein with a molecular mass of ~ 34 kDa (Fig. 2A). Native mass spectrometry (32,354.60 Da; predicted 32,461 Da) and native PAGE confirmed the monomeric state of PcrV (Fig. 2C), in agreement with previous reports (14, 35). The unfolded-re-folded PcrV mixture contained three major protein species clearly separated by SEC: the monomeric protein V_{mono} eluting from the column at the same volume as $V_{\text{untreated}}$, species eluting in the void volume corresponding to aggregates, and novel form(s), V_{oligo} , eluting as a broad peak between 54 and 67 ml (Fig. 2A). This large peak contains a mixture of oligomers ranging from dimers to hexamers, as suggested by preliminary SEC-Multi-angle Laser Light Scattering studies (not shown). The quantification of peak areas from SEC chromatograms showed that oligomeric species represent 30% of the amount of monomer after pH treatment.

When V_{mono} or V_{oligo} species were re-submitted to SEC analysis, peaks with an elution volume corresponding mainly to V_{mono} or V_{oligo} species, respectively, could be detected (Fig. 2B). Indeed, less than 20% of monomers could be observed in the reinjected oligomeric fraction, most probably originating from the partially overlapping fractions. This observation suggests that the newly formed oligomers are stable complexes.

To further determine the nature of this novel form of PcrV, the protein peak was analyzed by native gel electrophoresis, which revealed one major band migrating slower than $V_{\text{untreated}}$, suggesting the presence of multimeric PcrV (Fig. 2C). Moreover, the native mass spectrometry performed on V_{oligo} identified at least three multimeric species of molecular masses of 64,707.60, 97,061.74, and 129,409.77 Da, corresponding to dimers, trimers, and tetramers of PcrV, respectively.

Oligomerization Leads to Doughnut-like Species without Any Changes in Global Tertiary Structure— $V_{\text{untreated}}$, V_{mono} , and V_{oligo} fractions were further analyzed by TEM (Fig. 3A). Although preparations of $V_{\text{untreated}}$ and V_{mono} were uniform

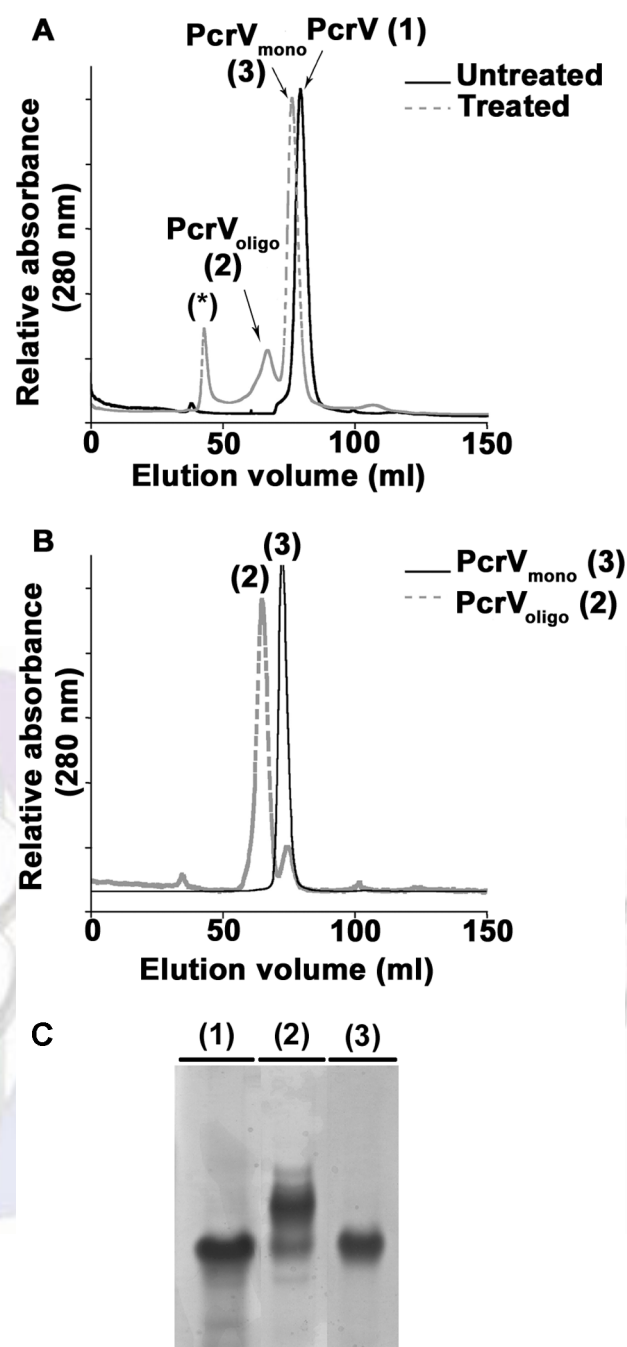


FIGURE 2. Formation of novel, oligomeric species of PcrV. A, SEC analysis of pH-treated and untreated PcrV protein shows the formation of two novel protein peaks after refolding. Untreated PcrV was recovered as a single peak corresponding to a monomer ($\text{PcrV}_{\text{untreated}}$ (1)). After pH treatment, two novel peaks arise in addition to the one corresponding to the monomer ($\text{PcrV}_{\text{mono}}$ (3)). One peak corresponds to multimeric species ($\text{PcrV}_{\text{oligo}}$ (2)) and the other probably to aggregated species eluting in void volume (*asterisk*). B, proteins present either in peak 2 ($\text{PcrV}_{\text{oligo}}$) or peak 3 ($\text{PcrV}_{\text{mono}}$) were analyzed again by SEC showing that the oligomers and monomers are stable species. C, the different protein peaks were submitted to native gel electrophoresis followed by Coomassie Blue staining. Lanes 1–3 correspond to 10 μg of protein contained in the peaks eluted from SEC: $\text{PcrV}_{\text{untreated}}$, $\text{PcrV}_{\text{oligo}}$, and $\text{PcrV}_{\text{mono}}$, respectively. $\text{PcrV}_{\text{untreated}}$ (1) runs as a unique band as does the $\text{PcrV}_{\text{mono}}$ (3), whereas $\text{PcrV}_{\text{oligo}}$ (2) separates into additional bands with lower electrophoretic mobilities.

with no distinct elements, the V_{oligo} fraction contained numerous doughnut-like species with a visible hole in the middle. The size of V_{oligo} (averaged over 10 elements obtained in three inde-

Oligomerization of PcrV and LcrV

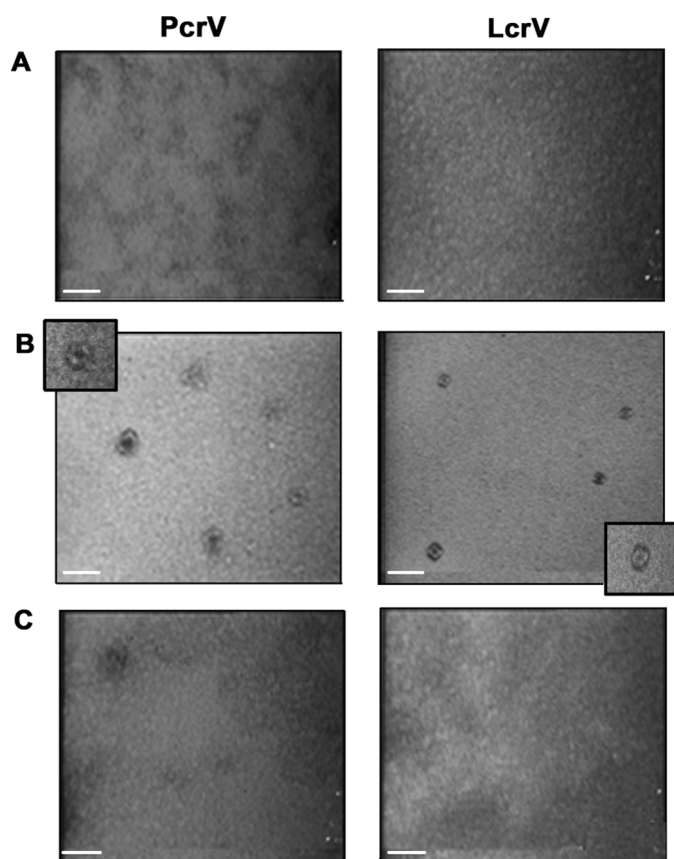


FIGURE 3. **Oligomeric V species exhibit doughnut-like shapes.** Transmission electronic microscopy photographs of fractions obtained after size exclusion chromatography of untreated (A), oligomeric (B), and monomeric (C) PcrV or LcrV. All samples were coated on carbon/forvar grids at a protein concentration of 0.1 mg/ml and stained with 2% uranyl acetate. No distinct structures could be observed in peaks corresponding to monomeric forms (A and C), whereas doughnut-like structures are readily observed in samples corresponding to oligomeric PcrV or LcrV (B). Scale bar corresponds to 20 nm.

pendent experiments) could be estimated at 9.7 ± 1.4 and 3.9 ± 1.4 nm for external and internal diameters, respectively. Some structures were irregular or even disrupted, suggesting that the *in vitro* oligomerization process was not complete for all the molecules.

Y. pestis LcrV shares a high degree of identity (41%) with *P. aeruginosa* PcrV and their roles in translocon assembly and translocation have been proposed to be similar (22, 41). A small-scale expression and purification was performed on LcrV to test the behavior of the protein in the folding assay. Notably, when LcrV was partially unfolded and refolded by rapid pH changes, two novel protein peaks appeared on SEC (data not shown). The first, corresponding to the aggregated protein, eluted in the void volume of SEC, and the second one matched to a presumable LcrV_{oligo} species. Native staining TEM confirmed the presence of oligomeric elements in the LcrV_{oligo} preparation (Fig. 3B), whereas any visible, clearly defined structures could be revealed neither in the V_{untreated} fraction (monomers) nor in the fraction eluting in the void volume. Importantly, LcrV_{oligo} structures were homogenous in size with external diameters of 8.3 ± 1.8 nm and internal diameters 3 ± 0.6 nm, somehow smaller than those observed with PcrV.

Intrinsic fluorescence and CD experiments were performed on the fractions of PcrV obtained after partial unfolding and

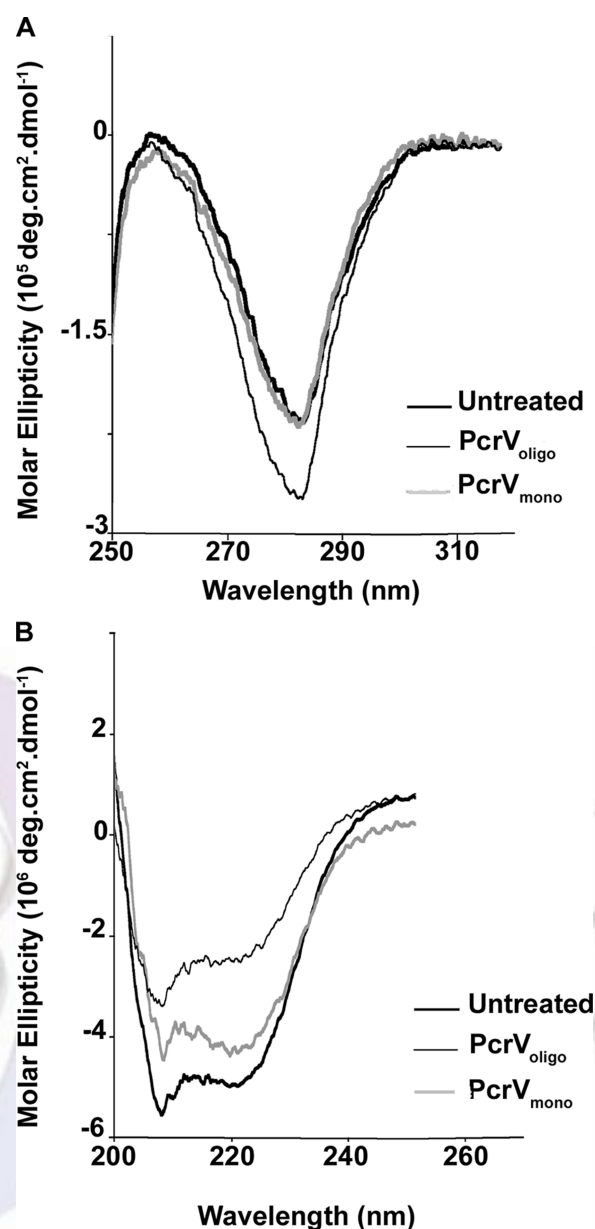


FIGURE 4. **Oligomeric and monomeric forms of PcrV have similar global structural features.** Structural features of PcrV_{untreated} (bold line), PcrV_{oligo} (gray line), and PcrV_{mono} (thin line) were examined by CD experiments. CD spectra of the different forms of PcrV were recorded in near-UV (A) and far-UV (B) to assess tertiary and secondary structures, respectively. Protein concentrations were 10 and 1 μ M for near- and far-UV, respectively.

refolding. The V_{oligo} and V_{mono} fractions exhibited an intrinsic fluorescence maximum of emission at 337 nm, identical to the untreated sample. In the near (Fig. 4A) and far (Fig. 4B) UV regions, the CD spectra of the V_{oligo} and V_{mono} fractions obtained after treatment were similar to the spectrum of the untreated monomeric sample, V_{untreated}. The lower intensity of the signal observed with V_{oligo} is most probably due to a higher level of light scattering caused by the oligomeric species. Nevertheless, these data strongly suggest that the global secondary and tertiary structures remain unchanged after oligomerization. Taken together, these results show that V antigens of *Y. pestis* and *P. aeruginosa* have the capacity to oligomerize into high-ordered ring-like structures whose estimated molecular

Oligomerization of PcrV and LcrV

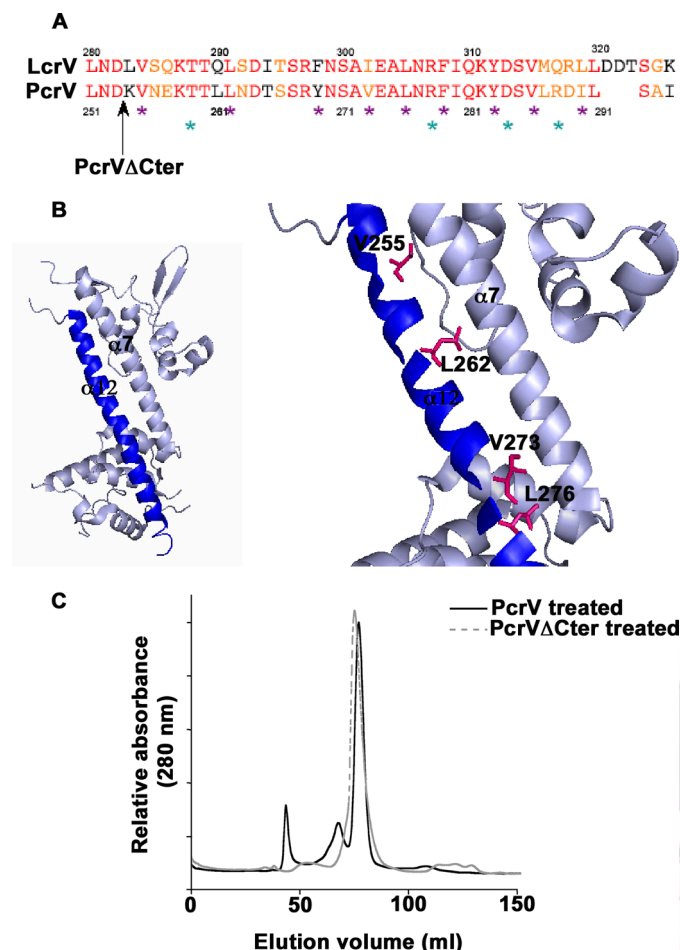


FIGURE 5. The conserved C-terminal α 12 helix plays a key role in the protein functionality. *A*, alignment of LcrV and PcrV C-terminal α 12 helix sequences. Identical residues and similar residues are shown in red and orange, respectively. The black arrow shows the end of the protein sequence of the PcrV Δ Cter mutant. Mutated residues are outlined by violet stars for hydrophobic residues (Val²⁵⁵, Leu²⁶², Tyr²⁶⁹, Val²⁷³, Leu²⁷⁶, Phe²⁷⁹, Tyr²⁸³, Val²⁸⁶, and Ile²⁹⁰) and cyan stars for hydrophilic residues (Thr²⁵⁹, Arg²⁷⁸, Asp²⁸⁴, and Arg²⁸⁸). *B*, schematic of the LcrV structure (PDB 1R6F (36)). The C-terminal α 12 helix is represented in blue. Zoom on the area of interest: mutated residues affecting *Pseudomonas* cytotoxicity (Val²⁵⁵, Leu²⁶², Leu²⁷⁶, and Val²⁷³) are shown by stick representation. *C*, capacity of oligomerization of PcrV Δ Cter was assessed by pH treatment followed by size exclusion chromatography. Chromatogram of PcrV Δ Cter is overlaid with the chromatogram of pH-treated wild-type PcrV. PcrV Δ Cter is inefficient in forming the high molecular weight oligomeric state of PcrV.

mass is >130 kDa without gross modifications of tertiary structure.

Role of the C-terminal α 12 Helix in Oligomerization—The crystal structure of LcrV shows that the C-terminal part folds into a 37-residue long α -helix (α 12), which is arranged into an intramolecular coiled-coil together with α 7, forming a unique hydrophobic “zipper” motif (Fig. 5 and Ref. 36). Description of LcrV interaction with LcrG (42) in bacterial cytoplasm leads to the hypothesis that the protein may also adopt an “open” conformation leaving helices 7 and 12 available for intermolecular interactions (36, 43).

To investigate the role of the PcrV α 12 C-terminal region in the oligomerization process, we produced truncated PcrV (V Δ Cter), lacking the last 41 amino acids (Fig. 5A), and assayed its ability to multimerize. The V Δ Cter is a stable, correctly folded

protein, as determined by CD analysis (data not shown) and behaves as a monomer in solution as verified by SEC and native mass spectrometry (molecular mass 27,683.44 Da; predicted 27,723 Da). However, when submitted to the pH treatment described above, PcrV Δ Cter did not give rise to any additional peak in the SEC experiment, strongly suggesting that it is unable to oligomerize (Fig. 5C). This result implies that the last 41 amino acids, being part of the α 12 C-terminal helix, are required for multimer formation.

Oligomerization Incompetent Mutants Are Unable to Insert Functional Translocon into Host Cell Membranes—To test the impact of the α 12 C-terminal deletion *in vivo*, we engineered *P. aeruginosa* Δ PcrV mutant strains expressing either wild-type PcrV or PcrV Δ Cter, and tested them in cytotoxicity assays on macrophages. As expected, a *P. aeruginosa* strain carrying V Δ Cter was unable to provoke macrophage cell death, although the protein was synthesized and secreted at the wild-type level (Fig. 6, A and B). The crystal structure of LcrV shows that one part of the α 12 helix (residues 305 to 326) is perfectly amphipathic, with the hydrophobic side of the helix being composed of residues Ala³⁰¹, Ile³⁰², Ala³⁰⁴, Leu³⁰⁵, Phe³⁰⁸, Ile³⁰⁹, Val³¹⁵, Met³¹⁶, Leu³¹⁹, and Leu³²⁰, which are conserved in PcrV (Fig. 5A).

To pin down the role of the α 12 helix, several individual amino acid substitutions were introduced in PcrV and modified proteins were tested for their capacity to complement the Δ PcrV mutant. We first targeted the amphipathic part of the helix and substituted hydrophilic (Arg²⁷⁸, Lys²⁸², and Arg²⁸⁸) and hydrophobic (Leu²⁷⁶, Phe²⁷⁹, Tyr²⁸³, Val²⁸⁶, and Ile²⁹⁰) residues into alanine (Fig. 5A). With the exception of Leu²⁷⁶, all mutants exhibited a wild-type phenotype with respect to secretion and cytotoxicity. Remarkably, the changes of Leu²⁷⁶ to either Ala or Asp resulted in a strong decrease in cytotoxicity, although the secretion *in vitro* was not affected (Fig. 6, A and B). Interestingly, Leu²⁷⁶ (which corresponds to Leu³⁰⁵ in LcrV) is the last residue of the α 12 helix engaged in intramolecular coiled-coil formation, being positioned just before the “kink” in the helix (Fig. 5 and Ref. 36). Therefore, additional mutations were engineered on residues positioned lengthwise to α 12 and being fully engaged within the “zipper” motif (Fig. 5A). Single mutations V255D, T259D, L262D, and V273D have a pronounced effect on bacterial cytotoxicity, whereas the double mutation V255D/L262D completely abolished cytotoxicity toward macrophages (Fig. 6A). All mutants secreted wild-type levels of PcrV and PopB (Fig. 6B) indicating that the secretion apparatus was intact. In summary, the post-secretory, biological function of PcrV is tightly associated with the C-terminal helix of the protein, involving notably hydrophobic residues positioned within the α 12 helix and engaged in intramolecular coiled-coil formation.

To test whether those amino acids are also important for the oligomerization process *in vitro*, the L276D and V255D/L262D mutations were engineered in the PcrV-overexpression plasmid, and the mutated proteins were purified and submitted to pH-induced unfolding and refolding. Refolded PcrV Δ L276D and PcrV Δ V255D/L262D were analyzed by SEC and the elution profiles were compared with wild-type protein. After pH treatment, mutated PcrV proteins mostly behave as monomers, dis-

Oligomerization of PcrV and LcrV

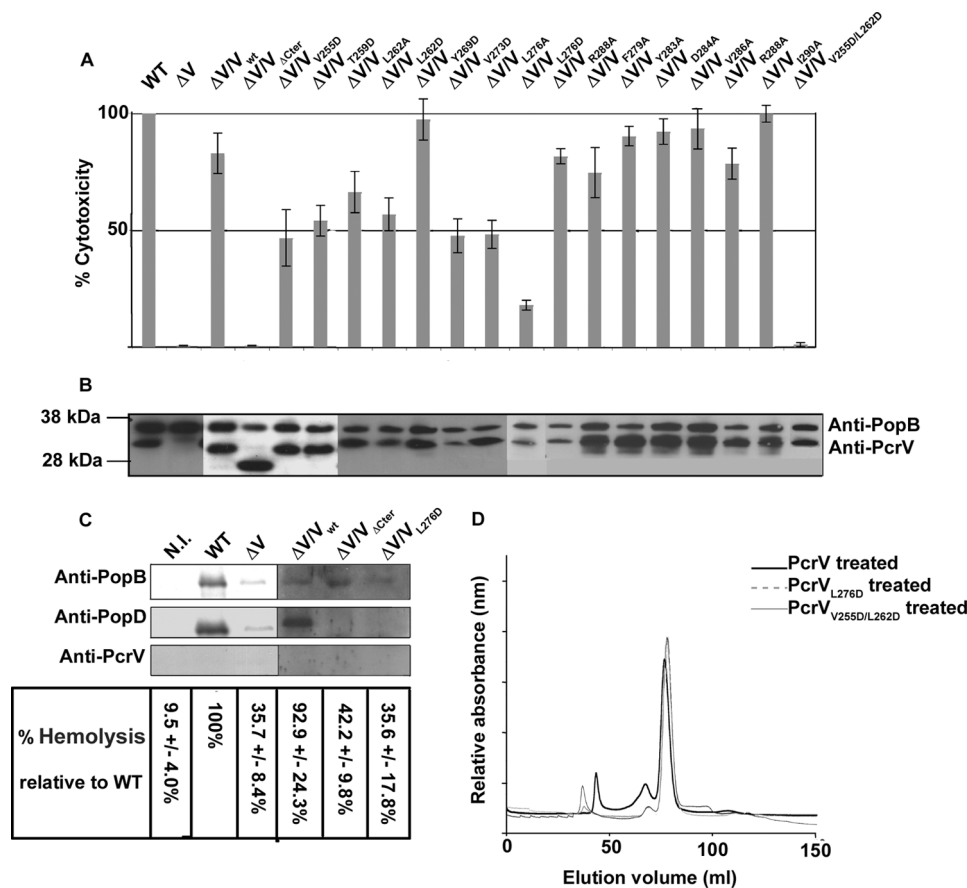


FIGURE 6. PcrVL276D and V255D/L262D mutants are impaired in their post-secretory role *in vivo*, which correlates with inefficient oligomerization. *A*, loss of T3SS activity was assessed by infection of macrophages. Lactate dehydrogenase release of infected cells was measured at 3 h post-infection. *P. aeruginosa* strains PcrV Δ Cter, PcrVL276D, and PcrVV255D/L262D are noncytotoxic. *B*, global functionality of the type III machinery was checked by Western blotting on secreted proteins PopB and PcrV following *in vitro* induction of the system. *C*, translocon insertion capacity of two noncytotoxic PcrV mutants. Hemoglobin release was measured at 1 h post-infection. The presence of PcrV, PopB, and PopD in membrane fractions of RBC was revealed by immunodetection. Mutants are nonhemolytic and less efficient in inserting translocon proteins in cell membranes. Negative control was obtained from noninfected cells (N.I.). *D*, capacity of oligomerization of PcrVL276D and PcrVV255D/L262D was assessed by pH treatment followed by SEC. Chromatograms of PcrV mutants are overlaid with the chromatogram of pH-treated wild-type PcrV. Mutants are less efficient in forming the high molecular weight oligomeric forms of PcrV.

playing only a small shoulder corresponding to multimeric forms in SEC analysis. The amount of the oligomeric species compared with monomers was found to be 4.1 and 4.9% for PcrVL276D and PcrVV255D/L262D, respectively (compared with the 30% oligomers obtained with the wild-type protein and 9.7% obtained with PcrV Δ Cter), showing that the mutants have a reduced capacity to form oligomers (Fig. 6D).

As the function of PcrV on the tip of the type III secretory needle is thought to guide the insertion of Pop translocators within host cell membranes, we checked whether *P. aeruginosa* strains carrying PcrV Δ Cter and PcrVL276D are able to insert PopB and PopD. RBCs have been shown to be an adequate model to appreciate the incorporation of the Pop/Yop translocon within host membranes, as hemolysis occurs upon the formation of the pore within membranes, an event dependent on functional PcrV (12, 24, 31). After RBCs were infected with the indicated strains, hemolysis was checked and membranes were purified on sucrose gradients as described previously (22). The wild-type strain and $\Delta V/V_{wt}$ lysed RBCs

after a 1-h infection, whereas all PcrV mutants displayed a CHA Δ PcrV phenotype. Immunodetection of pore proteins showed that PopB is inserted within membranes of RBCs infected by all strains, whereas PopD was not present in mutant strains CHA Δ V/V Δ Cter and CHA Δ V/VL276D (Fig. 6C).

Taken together, mutations in or deletions of the C-terminal α 12 helix of PcrV do not affect secretion of the Pop proteins, but prevent the formation of the functional Pop pore within the host membranes. Therefore, the absence of the correct PcrV structure abolishes the translocon function and, in consequence, bacterial cytotoxicity.

DISCUSSION

PcrV and LcrV are an integrative part of the T3S machinery that allows the passage of bacterial toxic proteins into the host eukaryotic cell in two continuous steps: secretion and translocation. Scanning transmission electron microscopy images of native *Yersinia* and *Shigella* needles showed that those proteins are organized into distinct structures on the distal part of the T3S needle (19, 21, 34, 41).

In this work, we demonstrated the ability of PcrV and LcrV to multimerize into doughnut-like structures composed of at least four subunits, as revealed by native mass

spectrometry. The oligomerization step required the partial unfolding of the monomer, which was achieved *in vitro* by controlled denaturation/renaturation using variations of pH. This treatment was chosen to artificially mimic what happens *in vivo*. Indeed, it may reflect the conformational changes imposed to all T3S substrates, including V proteins, which are thought to travel through the 3-nm wide secretion channel in a partially unfolded state (44). Unfolding of the molecules prior to secretion is thought to be accomplished *in vivo* by a T3S-specific ATPase, located at the base of the secretion apparatus (45, 46). In the *Salmonella* T3SS, the InvC ATPase directly binds to the chaperone-substrate complex and induces chaperone release and unfolding of the substrate in an ATP-dependent manner (39). This partially unfolded state concerns only the tertiary structure with conservation of the secondary structures (47). The pH treatment performed on PcrV efficiently allowed us to create such a conformation, *e.g.* molten globule state.

The oligomeric state of the tip complexes was proposed to be either tetrameric or pentameric, based either on modeling data

Oligomerization of PcrV and LcrV

(7) or by analyzing mass-per-length measurements performed on native needles (41). More recently, genetic and biochemical studies on *Shigella* needles proposed that the tip complex is a heteropentamer harboring one additional IpaB molecule that is the homologue of the PopB/YopB translocator (48). In our study, the broad peak obtained on SEC and the observations by TEM indicated that a population of different oligomers was obtained upon pH treatment. Native mass spectrometry revealed masses corresponding to tetramers, trimers, and dimers. Because oligomers are submitted to harsh conditions during the native mass spectrometry experiment, especially toward hydrophobic interactions, it is possible that even if higher oligomeric species are formed, they may have been destroyed during the analysis.

Being positioned at the junction between the secretory needle and the translocon, the LcrV/PcrV protein family plays a decisive role in proper insertion of translocators (PopB and PopD in *Pseudomonas*) into the host plasma membrane during infection (11, 12, 22). The estimated sizes of the doughnut-like structures observed by negative-staining TEM (internal diameter of 3–4 nm and external diameter of 8–10 nm) are similar to the size of the homo- or hetero-oligomers of PopB and PopD obtained previously in the presence of liposomes (14), suggesting that the oligomeric structure of V may serve as an assembly platform for the translocators just before the membrane insertion. Furthermore, the evidence of loss of cytotoxicity toward macrophages and the inefficient hemolysis capability exhibited by the PcrV mutants defective in oligomerization strongly support the idea that the insertion of a functional translocon into host cell membranes requires the formation of a stable complex of oligomeric PcrV/LcrV on the needle extremity. The direct interactions between the V proteins and translocators are currently being investigated, and may require proper multimeric organization of all components.

We demonstrated that the last 41 amino acids at the C terminus of PcrV are essential for oligomerization of the protein *in vitro* and its function in bacterial cytotoxicity. The produced truncated protein is stable and properly folded. In *P. aeruginosa*, the truncation does not perturb the secretion of either PcrV Δ Cter itself, or of other T3SS-dependent proteins (PopB, PopD, or ExoS), indicating that only the post-secretory role of PcrV is affected. The C terminus potentially folds into a long α helix, α 12, which together with α 7, could form a unique intramolecular coiled-coil (36). Remarkably, the mutants engineered so that they perturb the formation of the coiled-coil structure were found to be noncytotoxic in cellular models of infection while not influencing the secretion of ExoS, PopB, PopD, and PcrV itself. In addition, *in vitro* oligomerization of the mutant proteins could not be induced, as evaluated by SEC. Of note, the heptad repeat LX3-LX2-LX3L of LcrV within the α 7 helix was found to be involved in specific interactions with the N terminus of its intracellular partner LcrG, strongly suggesting that the V molecule may alter between a “closed,” monomeric shape and an open form, prone to interact with its partners. In addition, as already noted by Derewenda *et al.* (36) the C-terminal helix is preceded by a flexible loop that may be

pulled apart leaving α 12 and α 7 helices free for other types of interactions.

Interestingly, PcrV and LcrV are fully functionally exchangeable only if the cognate translocators are co-expressed (22, 49, 50). Based on this observation, functional and scanning transmission electron microscopy analyses of LcrV/PcrV hybrids in which N- and C-terminal domains were exchanged and then expressed in *Yersinia*, suggested that the globular N-terminal domain of the protein is required for proper insertion of cognate translocators into host membranes (41). Surprisingly, using the same hybrids in *P. aeruginosa*,⁵ we were not able to make the same conclusion; whereas the LcrVNter-PcrV hybrid was able to complement a Δ pcrV mutant in *Pseudomonas*, the PcrVNter-LcrV hybrid was not, which would be expected if the participation of only N-terminal domains in insertion of translocators is indispensable. Based on these observations, we suggest that the orientation and function of globular domains may be more complicated than proposed in the original model, with both globular domains (Fig. 5B) being critical for correct multimerization of the protein into the functional tip. Using CD analysis and tryptophan fluorescence, we showed that the global helical structure does not change when passing from monomers to oligomers. This observation, and the probability of PcrV to exhibit closed and open conformations via the flexible loop, allows us to speculate that the oligomerization may occur via a so called “domain swapping” mechanism (51, 52). Association between adjacent V subunits may occur by intermolecular exchange of α 7 and α 12 helices, which must be available when the protein comes out from the secretion channel.

Shigella IpaD and BipB from *Burkholderia pseudomallei* (the two V homologues) possess, as do PcrV and LcrV, an internal coiled-coil, and in addition a four-helix bundle at the N terminus that, when removed from the protein, induces the formation of multimers as revealed by SEC (53). It was suggested that this part of the protein is a kind of chaperone, which flips away and promotes the exposure of the intramolecular coiled-coil only at the top of the needle. We found that native secreted V molecules, recovered from bacterial culture supernatants folds directly into monomers (not shown), when not interacting with the needle. It seems thus that *in vivo*, only needle-attached V proteins assemble into oligomer-forming structures that are visible by microscopy, suggesting a crucial role of local monomer concentration and needle interaction. However, how this interaction occurs and promotes oligomerization still needs to be investigated.

Active and passive immunization by LcrV and PcrV provides animals with a high level of protection against infections by *Y. pestis* and *P. aeruginosa*, respectively (15–18). Protective anti-PcrV Mab166 recognizes the region from amino acids 144 to 257 (16), partially overlapping the α 7 helix involved in coiled-coil formation. The same antibody is capable of affecting the insertion of translocators in red blood cells membranes (22). Creation of oligomeric V species *in vitro* will allow the produc-

⁵ C. Gébus, unpublished data.

Fn5

Oligomerization of PcrV and LcrV

tion of other specific antibodies with the expected higher level of protection than the existing one. Determination of the exact structure of V oligomers formed on the needle extremity may lead to new development of therapies against *Pseudomonas*- and *Yersinia*-caused infections.

Acknowledgments—We thank Karin Pernet-Gallay (Grenoble Institut des Neurosciences) for forming G.C. with transmission electron microscopy and sample staining and David Lascoux (Institut de Biologie Structurale, Grenoble) for taking over the native mass spectrometry experiments. We thank Vincent Forge (LCBM, CEA, Grenoble) for precious advice on fluorescence and circular dichroism experiments and Andréa Dessen (Institut de Biologie Structurale, Grenoble) for helpful discussions and critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Cornelis, G. R. (2006) *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 811–825
- Galan, J. E., and Wolf-Watz, H. (2006) *Nature* **444**, 567–573
- Blocker, A., Komoriya, K., and Aizawa, S. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3027–3030
- Hoicyzk, E., and Blobel, G. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 4669–4674
- Journet, L., Agrain, C., Broz, P., and Cornelis, G. R. (2003) *Science* **302**, 1757–1760
- Marlovits, T. C., Kubori, T., Sukhan, A., Thomas, D. R., Galan, J. E., and Unger, V. M. (2004) *Science* **306**, 1040–1042
- Deane, J. E., Roversi, P., Cordes, F. S., Johnson, S., Kenjale, R., Daniell, S., Booy, F., Picking, W. D., Picking, W. L., Blocker, A. J., and Lea, S. M. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 12529–12533
- Hakansson, S., Bergman, T., Vanooteghem, J. C., Cornelis, G., and Wolf-Watz, H. (1993) *Infect. Immun.* **61**, 71–80
- Neyt, C., and Cornelis, G. R. (1999) *Mol. Microbiol.* **33**, 971–981
- Sarker, M. R., Neyt, C., Stainier, I., and Cornelis, G. R. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 1207–1214
- Blocker, A., Gounon, P., Larquet, E., Niebuhr, K., Cabiaux, V., Parsot, C., and Sansonetti, P. (1999) *J. Cell Biol.* **147**, 683–693
- Goure, J., Pastor, A., Faudry, E., Chabert, J., Dessen, A., and Attree, I. (2004) *Infect. Immun.* **72**, 4741–4750
- Faudry, E., Vernier, G., Neumann, E., Forge, V., and Attree, I. (2006) *Biochemistry* **45**, 8117–8123
- Schoehn, G., Di Guilmi, A. M., Lemaire, D., Attree, I., Weissenhorn, W., and Dessen, A. (2003) *EMBO J.* **22**, 4957–4967
- Bacon, G. A., and Burrows, T. W. (1956) *Br. J. Exp. Pathol.* **37**, 481–493
- Frank, D. W., Vallis, A., Wiener-Kronish, J. P., Roy-Burman, A., Spack, E. G., Mullaney, B. P., Megdoud, M., Marks, J. D., Fritz, R., and Sawa, T. (2002) *J. Infect. Dis.* **186**, 64–73
- Hill, J., Leary, S. E., Griffin, K. F., Williamson, E. D., and Titball, R. W. (1997) *Infect. Immun.* **65**, 4476–4482
- Anderson, G. W., Jr., Leary, S. E., Williamson, E. D., Titball, R. W., Welkos, S. L., Worsham, P. L., and Friedlander, A. M. (1996) *Infect. Immun.* **64**, 4580–4585
- Mueller, C. A., Broz, P., Muller, S. A., Ringler, P., Erne-Brand, F., Sorg, I., Kuhn, M., Engel, A., and Cornelis, G. R. (2005) *Science* **310**, 674–676
- Espina, M., Olive, A. J., Kenjale, R., Moore, D. S., Ausar, S. F., Kaminski, R. W., Oaks, E. V., Middaugh, C. R., Picking, W. D., and Picking, W. L. (2006) *Infect. Immun.* **74**, 4391–4400
- Sani, M., Botteaux, A., Parsot, C., Sansonetti, P., Boekema, E. J., and Allaoui, A. (2007) *Biochim. Biophys. Acta* **1770**, 307–311
- Goure, J., Broz, P., Attree, O., Cornelis, G. R., and Attree, I. (2005) *J. Infect. Dis.* **192**, 218–225
- Lee, V. T., Tam, C., and Schneewind, O. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 36869–36875
- Marenne, M. N., Journet, L., Mota, L. J., and Cornelis, G. R. (2003) *Microb. Pathog.* **35**, 243–258
- Holder, I. A., Neely, A. N., and Frank, D. W. (2001) *Infect. Immun.* **69**, 5908–5910
- Leary, S. E., Williamson, E. D., Griffin, K. F., Russell, P., Eley, S. M., and Titball, R. W. (1995) *Infect. Immun.* **63**, 2854–2858
- Weeks, S., Hill, J., Friedlander, A., and Welkos, S. (2002) *Microb. Pathog.* **32**, 227–237
- Dacheux, D., Attree, I., Schneider, C., and Toussaint, B. (1999) *Infect. Immun.* **67**, 6164–6167
- Toussaint, B., Delic-Attree, I., and Vignais, P. M. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 416–421
- Chuanchuen, R., Narasaki, C. T., and Schweizer, H. P. (2002) *BioTechniques* **33**, 760, 762–763
- Dacheux, D., Goure, J., Chabert, J., Usson, Y., and Attree, I. (2001) *Mol. Microbiol.* **40**, 76–85
- Dacheux, D., Toussaint, B., Richard, M., Brochier, G., Croize, J., and Attree, I. (2000) *Infect. Immun.* **68**, 2916–2924
- DeLano, W. L. (2002) *PyMol*, DeLano Scientific, Palo Alto, CA
- Espina, M., Ausar, S. F., Middaugh, C. R., Baxter, M. A., Picking, W. D., and Picking, W. L. (2007) *Protein Sci.* **16**, 704–714
- Nanao, M., Ricard-Blum, S., Di Guilmi, A. M., Lemaire, D., Lascoux, D., Chabert, J., Attree, I., and Dessen, A. (2003) *BMC Microbiol.* **3**, 21
- Derewenda, U., Mateja, A., Devedjiev, Y., Routzahn, K. M., Evdokimov, A. G., Derewenda, Z. S., and Waugh, D. S. (2004) *Structure* **12**, 301–306
- Hamad, M. A., and Nilles, M. L. (2007) *J. Bacteriol.* **189**, 6734–6739
- Lawton, D. G., Longstaff, C., Wallace, B. A., Hill, J., Leary, S. E., Titball, R. W., and Brown, K. A. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 38714–38722
- Akeda, Y., and Galan, J. E. (2005) *Nature* **437**, 911–915
- Arai, M., and Kuwajima, K. (2000) *Adv. Protein. Chem.* **53**, 209–282
- Broz, P., Mueller, C. A., Muller, S. A., Philippsen, A., Sorg, I., Engel, A., and Cornelis, G. R. (2007) *Mol. Microbiol.* **65**, 1311–1320
- Nilles, M. L., Williams, A. W., Skrzypek, E., and Straley, S. C. (1997) *J. Bacteriol.* **179**, 1307–1316
- Nilles, M. L. (2004) *Structure* **12**, 357–358
- Cordes, F. S., Komoriya, K., Larquet, E., Yang, S., Egelman, E. H., Blocker, A., and Lea, S. M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 17103–17107
- Akeda, Y., and Galan, J. E. (2004) *J. Bacteriol.* **186**, 2402–2412
- Gauthier, A., and Finlay, B. B. (2003) *J. Bacteriol.* **185**, 6747–6755
- Stebbins, C. E., and Galan, J. E. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**, 738–743
- Veenendaal, A. K., Hodgkinson, J. L., Schwarzer, L., Stabat, D., Zenk, S. F., and Blocker, A. J. (2007) *Mol. Microbiol.* **63**, 1719–1730
- Broms, J. E., Sundin, C., Francis, M. S., and Forsberg, A. (2003) *J. Infect. Dis.* **188**, 239–249
- Frithz-Lindsten, E., Holmstrom, A., Jacobsson, L., Soltani, M., Olsson, J., Rosqvist, R., and Forsberg, A. (1998) *Mol. Microbiol.* **29**, 1155–1165
- Bennett, M. J., Choe, S., and Eisenberg, D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 3127–3131
- Rousseau, F., Schymkowitz, J. W., and Itzhaki, L. S. (2003) *Structure* **11**, 243–251
- Johnson, S., Roversi, P., Espina, M., Olive, A., Deane, J. E., Birket, S., Field, T., Picking, W. D., Blocker, A. J., Galysov, E. E., Picking, W. L., and Lea, S. M. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 4035–4044

Chapitre 10

Interaction de PcrV avec l'aiguille de sécrétion

Les études réalisées dans le chapitre précédent (chapitre 9, paragraphe 2.1), ainsi que les images de MET des complexes de LcrV et d'IpaD au sommet des aiguilles de *Y. enterocolitica* et *S. flexneri* (Mueller *et al.*, 2005 ; Espina *et al.*, 2006 ; Sani *et al.*, 2007 ; Veenendaal *et al.*, 2007) montrent que l'antigène V se situe au sommet des aiguilles de sécrétion.

Ce chapitre décrit les expériences que nous avons mises en œuvre pour mettre en évidence l'interaction directe entre l'antigène V et la protéine composant l'aiguille.

1. Interaction de PscF et de PcrV : étude *in vitro*

Pour observer l'interaction directe entre PscF et PcrV, des études antérieures réalisées au laboratoire d'Andréa Dessen (Quinaud, non publié) avaient été réalisées par des expériences où les protéines PcrV et PscF purifiées séparément étaient mises en contact. Aucune interaction n'avait alors été observée.

Nous avons postulé que pour pouvoir interagir les deux protéines devaient se replier de façon concomitante. Si le modèle de la sécrétion par le canal est repris, les protéines acheminées à travers celui-ci, notamment PcrV, le sont sous forme dépliées (Akeda and Galan, 2005 ; Deane *et al.*, 2006). Ainsi, il est possible d'imaginer qu'en sortie du canal de sécrétion, PcrV se replie et interagit avec PscF.

Pour étudier l'effet d'un repliement concomitant des protéines PcrV et PscF, PscF a été purifiée et son dépliement/repliement étudié par biophysique pour le comparer à celui de PcrV. Mais nous n'avons pu trouver de conditions qui permettaient de déplier et replier les protéines PscF et PcrV de manière simultanée (non montré).

Pour pallier à ceci, nous avons choisi de surproduire les deux protéines dans la même cellule et d'essayer de les purifier en complexe.

1.1 Mise en évidence de l'interaction entre PscF et PcrV

1.1.1 Principe de la co-purification

Les gènes codant pour la protéine PscF étiquetée en C terminal par 6 histidines et pour PcrV sans étiquette ont été clonés dans le vecteur bicistronique pETDuet-1 (Figure 10.1). L'induction de l'expression des deux gènes par l'IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) conduit à la surproduction des deux protéines dans *E. coli*. Celles-ci se trouvent dans la fraction soluble lorsque les bactéries sont lysées.

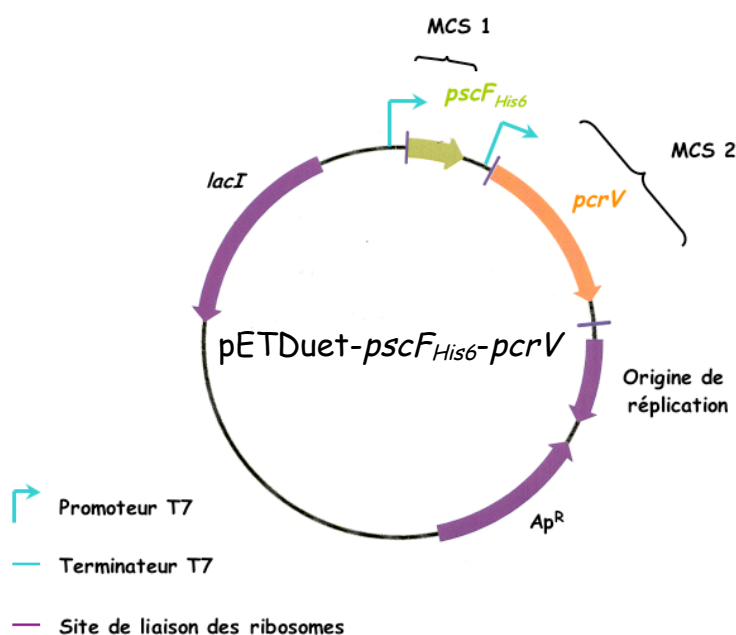


Figure 10.1 : Schéma du vecteur permettant la co-expression de PscF_{His6} et de PcrV.

Ap^R : gène conférant la résistance à l'ampicilline. MCS : "Mutli Cloning Site". Le gène *pscF_{His6}* est cloné dans le MCS 1 et celui de *pcrV* sans étiquette dans le MCS 2.

Nous avons constaté que la protéine PcrV est produite de manière plus importante que la protéine PscF. Pour éviter ce phénomène, nous avons, dans un premier temps testé différentes conditions d'induction afin de trouver un moyen de surproduire les protéines en quantité égale. Plusieurs températures et densités optiques d'induction (DO₆₀₀) ainsi que différentes concentrations en IPTG ont été testées. Mais, aucune de ces conditions ne nous a permis d'obtenir des quantités de PscF et de PcrV similaires.

Afin d'éliminer la protéine PcrV produite en excès, nous avons choisi un protocole de purification où la première étape permet de retenir le surplus par une chromatographie échangeuse d'anions. En effet, une partie de PcrV surproduite se fixe sur la colonne échangeuse d'anions tandis que PscF_{His6} et une autre partie de PcrV ne s'y fixent pas. Nous avons donc choisi de réaliser les tests de co-purification en trois étapes (Figure 10.2) :

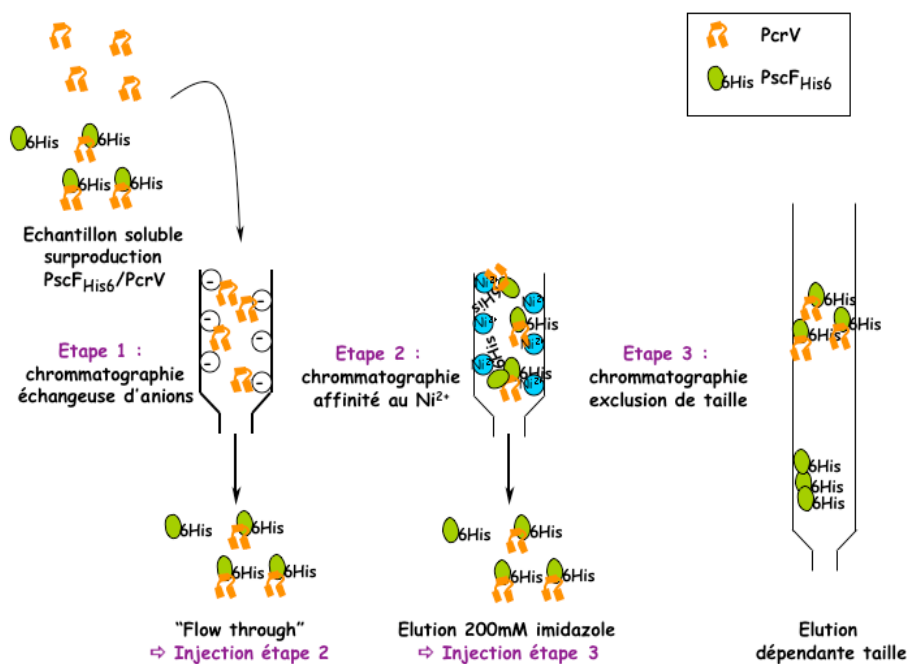


Figure 10.2 : Schéma présentant les étapes de co-purification des protéines PscF_{His6} et PcrV.

Les protéines PcrV (orange) et PscF_{His6} (vert) extraites après surproduction sont injectées sur une colonne échangeuse d'anions (étape 1) puis sur une colonne d'affinité au nickel (étape 2) et sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille (étape 3).

- Étape 1 : Chromatographie échangeuse d'anions. Le surplus de PcrV se fixe sur la colonne. PscF_{His6} et PcrV ne se fixant pas sont récupérés dans le "Flow Through".
- Étape 2 : Chromatographie d'affinité au nickel. Le "Flow Through" de l'étape 1 y est chargé. PscF s'y fixe par son étiquette, et s'il y a interaction entre les deux protéines, PcrV aussi. Les protéines sont éluées à une concentration en imidazole de 200 mM.
- Étape 3 : Chromatographie d'exclusion de taille. L'échantillon élué à 200 mM d'imidazole lors de l'étape 2 est injecté sur une colonne de gel filtration de type Superdex200.

1.1.2 PcrV interagit directement avec PscF

Suite à la surexpression de PscF_{His6} et PcrV, les protéines solubles ont été traitées comme indiqué précédemment. L'échantillon contenant les protéines qui ne se sont pas fixées sur la colonne échangeuse d'anions a été injecté sur une colonne de chromatographie d'affinité au nickel (Figure 10.3 a). L'absorbance à 280 nm a été suivie tout au long de la purification et les fractions où une absorbance importante a été observée ont été analysées en gel coloré au bleu de Coomassie et en western blot. Un pic de protéine est observé lors du lavage à 50 mM d'imidazole et est élué dans les fractions 17 à 19. Un second pic est élué à 200 mM d'imidazole et est constitué des fractions 42 à 44. L'analyse par western blot de ces fractions a révélé qu'une partie de PcrV élué lors des lavages (Figure 10.3 c). La totalité de la protéine PcrV produite en excès n'a pas dû se fixer sur la colonne échangeuse d'anions. Les fractions 42 à 44 contiennent les protéines PcrV et PscF_{His6} (Figure 10.3 c). Elles ont donc été rassemblées et injectées sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille. Le chromatogramme de cette troisième étape de purification présente un pic élué à 45 mL (Figure 10.3 b). Ce volume d'éluion correspond à celui observé pour la protéine PscF_{His6} purifiée seule qui polymérise en longues fibres éluées à 40 mL (Quinaud *et al.*, 2005). PcrV seule, quant à elle, est éluée à un volume moyen d'environ 72 mL (Gebus *et al.*, 2008). L'analyse par western blot de la composition de ces fractions a permis de confirmer la présence des deux protéines.

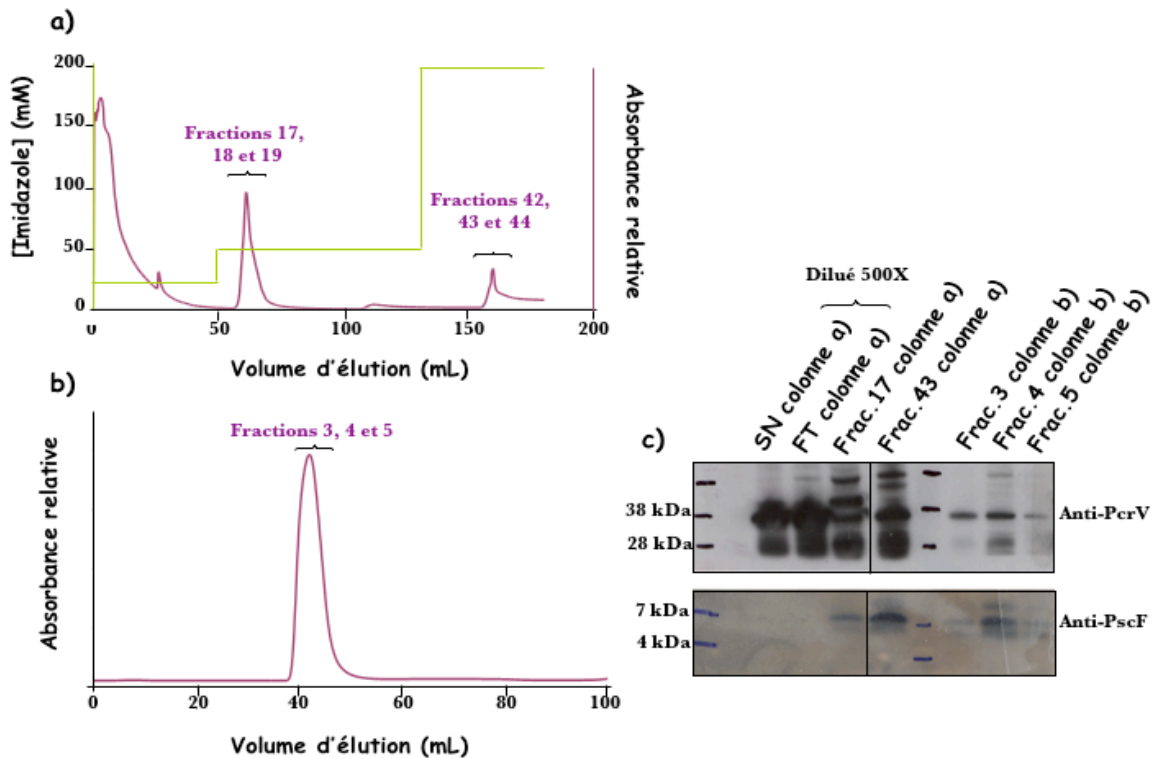


Figure 10.3 : Les protéines PscF_{His6} et PcrV co-purifient sur colonne d'affinité au nickel et par chromatographie d'exclusion de taille.

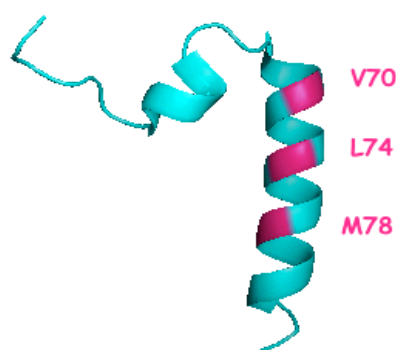
a) Chromatogramme de la purification par affinité au nickel. b) Chromatogramme de l'étape de purification par exclusion de taille. c) Les fractions de purifications présentant un pic d'absorbance à 280 nm ont été analysées par western blot. Les deux protéines peuvent être observées dans les fractions d'élution de la purification. SN : surnageant, FT : "Flow through", Frac. : Fraction.

Comme témoin de la co-purification, nous avons surexprimé PcrV sans étiquette dans pET-Duet1 et nous avons effectué sa purification par les mêmes étapes. Après le passage des extraits contenant PcrV sur une colonne d'affinité au nickel, la protéine est retrouvée dans la fraction qui ne se fixe pas à la colonne ("Flow through"). Aucune protéine n'est éluée à une concentration en imidazole de 200 mM. Ainsi, sans la présence de la protéine PscF étiquetée, PcrV n'est pas retenue sur la colonne de manière non spécifique. Notre procédé de purification permet donc de discriminer s'il y a ou non interaction directe entre PscF_{His6} et PcrV nous permettant de conclure que, lorsqu'elles sont produites ensemble, PcrV et PscF interagissent directement.

La surproduction simultanée de PscF_{His6} et de PcrV a permis de co-purifier spécifiquement les deux protéines au cours de trois étapes de purification. Les deux protéines interagissent donc directement.

1.2 Interaction entre PcrV et PscF* monomérique

La co-purification de PcrV et de PscF nous a permis de mettre en évidence l'interaction entre les deux protéines. Mais la protéine PscF polymérise en fibres de taille variable (Quinaud *et al.*, 2005) et le complexe formé est donc composé d'espèces hétérogènes ce qui entrave la possibilité de réaliser des études structurales. Nous avons cherché un moyen de produire un complexe, qui idéalement serait d'une stoechiométrie 1 : 1. Pour cela, nous avons choisi de réaliser une série de mutations ponctuelles dans PscF afin d'abolir sa capacité à polymériser. Trois résidus hydrophobes, la valine 70, la leucine 74 et la méthionine 78 ont été mutés en un résidu chargé : l'acide glutamique (Figure 10.4). Ces résidus ont été choisis car ils sont alignés selon l'axe de l'hélice du côté hydrophobe, domaine capital pour la polymérisation (Quinaud *et al.*, 2007).



Hélice C terminale PscF :
résidus 54 à 85

Figure 10.4 : Localisation des acides aminés V70, L74 et M78 sur l'hélice C terminale de PscF.

Les trois mutations engendrées pour empêcher la polymérisation de PscF sont indiquées sur la structure de l'hélice C terminale de PscF (Quinaud *et al.*, 2007, code PDB : 2uwj).

Les mutations ont été intégrées directement sur le plasmide permettant la co-purification de PscF_{His6} et de PcrV par mutagenèse dirigée. Pour faciliter la lecture, la protéine PscF_{V70D/L74D/M78D} sera annotée PscF*.

PcrV et PscF*_{His6} sont solubles après surexpression et elles ont été purifiées comme décrit précédemment. Elles ne sont pas retenues sur une colonne échangeuse d'anions, et sur la colonne d'affinité au nickel elles sont éluées simultanément à 200 mM d'imidazole (Figure 10.5 a) comme l'analyse des fractions 27 à 29 sur gel et en western blot le confirme (Figure 10.5 c). Ces fractions ont été rassemblées et injectées sur

colonne de chromatographie d'exclusion de taille. Le mélange injecté est élué selon deux pics distincts : un premier éluant entre 40 et 56 mL et un second entre 80 et 100 mL (Figure 10.5 b). Les deux pics sont composés des protéines PcrV et PscF* (figure 10.5 c). Néanmoins, nous observons l'apparition d'une espèce qui pourrait correspondre à du PcrV dégradé et qui co-purifie majoritairement avec le second pic. Malgré la présence de PcrV et de fragments de protéolyse de cette protéine, cette espèce est élue à un volume équivalent à celui d'un monomère de PscF (90 à 95 mL) (Quinaud *et al.*, 2007).

Il est à noter qu'aucun pic d'élution n'est observé à un volume correspondant à celui de l'élution de PcrV sous forme monomérique (75 mL).

Ces résultats sont intéressants bien que surprenants. En effet, une telle différence dans le volume d'élution des deux formes de complexes signifierait qu'une partie de PcrV interagit avec PscF*_{His6} qui polymérise toujours et qu'une autre partie formerait des complexes stables au sein desquels PscF*_{His6} ne formerait pas de longues fibres mais serait monomérique ou très faiblement polymérisé. Des échantillons de fractions représentatives de chaque état, les fractions 9 et 26, ont été observées par MET. La fraction 9, comme attendu, contient un nombre important de longues fibres (>1µm) confirmant la polymérisation de PscF*_{His6} (Figure 10.5 d). La fraction 26, quant à elle, ne contient pas de structure qui soit visible, attestant qu'ici PscF*_{His6} n'est pas polymérisée.

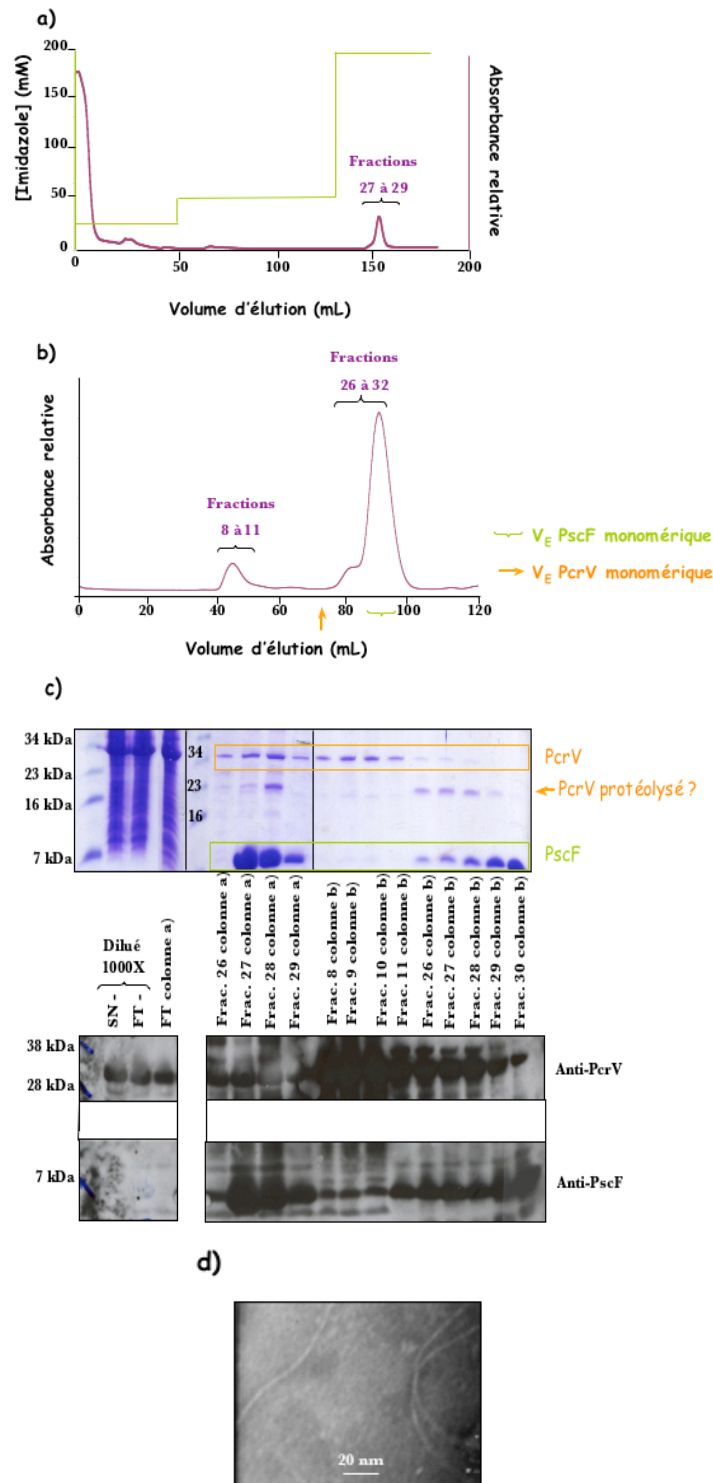


Figure 10.5 : Les protéines PscF*_{His6} et PcrV co-purifient sur colonne d'affinité au nickel et d'exclusion de taille.

a) Chromatogramme de la purification par affinité au nickel. b) Chromatogramme de l'étape de purification par exclusion de taille. c) Les fractions des purifications présentant un pic d'absorbance à 280 nm ont été analysées par gel coloré au bleu de Coomassie (en haut) et par western blot (en bas) en utilisant des anticorps anti-PcrV et anti-PscF. SN : surnageant, FT : "Flow through", Frac. : Fraction. d) Image de MET d'un échantillon de la fraction 9 d'élution de la chromatographie d'exclusion de taille.

PcrV co-purifie avec un triple mutant de PscF : PscF_{V70D/L74D/M78D}. L'interaction est stable et est maintenue que PscF soit sous forme fortement polymérisée ou sous forme monomérique.*

Les résultats de co-purification que nous avons obtenus entre PscF* et PcrV sont encourageants du fait que des complexes de faible stœchiométrie semblent être formés entre les deux protéines. Malheureusement, la triple mutation de PscF n'aboli pas complètement sa capacité à polymériser. L'étude structurale d'un monomère de MxiH a pu être réalisée sur une protéine tronquée de 5 acides aminés en C terminal (Darboe *et al.*, 2006 ; Deane *et al.*, 2006). Chez PscF, cette même mutation a été étudiée par l'équipe du docteur Andréa Dessen mais la protéine tronquée reste capable de polymériser. Par contre, il a été déterminé que la délétion minimale empêchant la polymérisation de PscF est une délétion de 9 acides aminés et que par conséquent une protéine PscF_{Δ9} est monomérique.

Nous sommes actuellement en train de cloner la séquence codant pour la protéine PscF tronquée pour la co-purifier avec PcrV. Le but ultime serait d'isoler un complexe de stœchiométrie 1 :1 entre les deux protéines. Ce complexe sera ensuite analysé pour estimer sa stabilité par des études de dénaturation thermique. De plus, les domaines nécessaires à l'interaction entre PcrV et PscF seront déterminés par protéolyse limitée. Les fragments digérés qui sont stables et de plus petits poids moléculaires seront séquencés pour déterminer leur nature. Enfin, si la stabilité est confirmée, des essais de cristallisation du complexe sont également envisagés dans le but de déterminer sa structure tridimensionnelle.

Les informations que vont apporter de telles études, notamment quant à la manière dont les deux protéines interagissent, s'avèrent capitales. Ceci permettrait d'avoir un modèle de l'interaction qui pourrait être utilisé pour définir des molécules ou anticorps qui bloqueraient la liaison entre PcrV et PscF. Ce défaut engendre, en effet, un défaut global de la fonctionnalité du SST3.

1.3 Rôle de l'hélice α 12 de PcrV dans l'interaction

Pendant que ce travail était effectué, il a été démontré que la localisation d'IpaD au sommet des aiguilles de *S. flexneri* dépend de la présence de son domaine C terminal (Espina *et al.*, 2006). De plus, la modélisation du pentamère de LcrV au sommet de l'aiguille de *S. flexneri* (Chapitre 4, paragraphe 3.2) se base sur l'homologie structurale

forte entre les séquences C terminales de LcrV (hélice $\alpha 12$) et de MxiH. La superposition des deux structures a été réalisée en assemblant les 5 unités LcrV sur l'aiguille MxiH et ce en admettant que le domaine C terminal de LcrV mime celui de MxiH (Deane *et al.*, 2006). Le domaine C terminal du translocateur hydrophile semble donc jouer un rôle important dans la localisation de la protéine au sommet des aiguilles.

1.3.1 Co-purification de PscF et de PcrV $_{\Delta Cter}$

Pour estimer l'importance de hélice $\alpha 12$ dans l'interaction entre PcrV et l'aiguille, la co-purification des protéines PscF $_{His6}$ et PcrV tronquée a été testée. Pour cela, nous avons utilisé la même protéine tronquée PcrV $_{\Delta Cter}$ étudiée dans le chapitre 9 dont la séquence a été clonée dans le vecteur bicistronique pET-Duet1 en aval de celle codant pour PscF $_{His6}$.

Lors de la purification des deux protéines, un seul pic contenant PscF et PcrV est élué de la colonne d'affinité au nickel à une concentration en imidazole de 200 mM (Figure 10.6 a). L'analyse par western blot des fractions le composant confirme qu'il contient de la protéine PscF mais aussi de la protéine PcrV $_{\Delta Cter}$ (Figure 10.6 c). Le passage de cet échantillon en colonne de chromatographie d'exclusion de taille conduit à l'élution de deux espèces majoritaires entre 40 et 48 mL (fractions 8 à 10) et entre 80 et 96 mL (fractions 24 à 28) (Figure 10.6 b). Les deux pics intermédiaires de moindre intensité contiennent des contaminants qui ne sont pas reconnus par les anticorps spécifiques.

L'analyse des deux pics majoritaires en western blot a permis de mettre en évidence que le premier pic d'élution est composé exclusivement de la protéine PscF tandis que le second pic contient la protéine PcrV $_{\Delta Cter}$ seule (Figure 10.6 c).

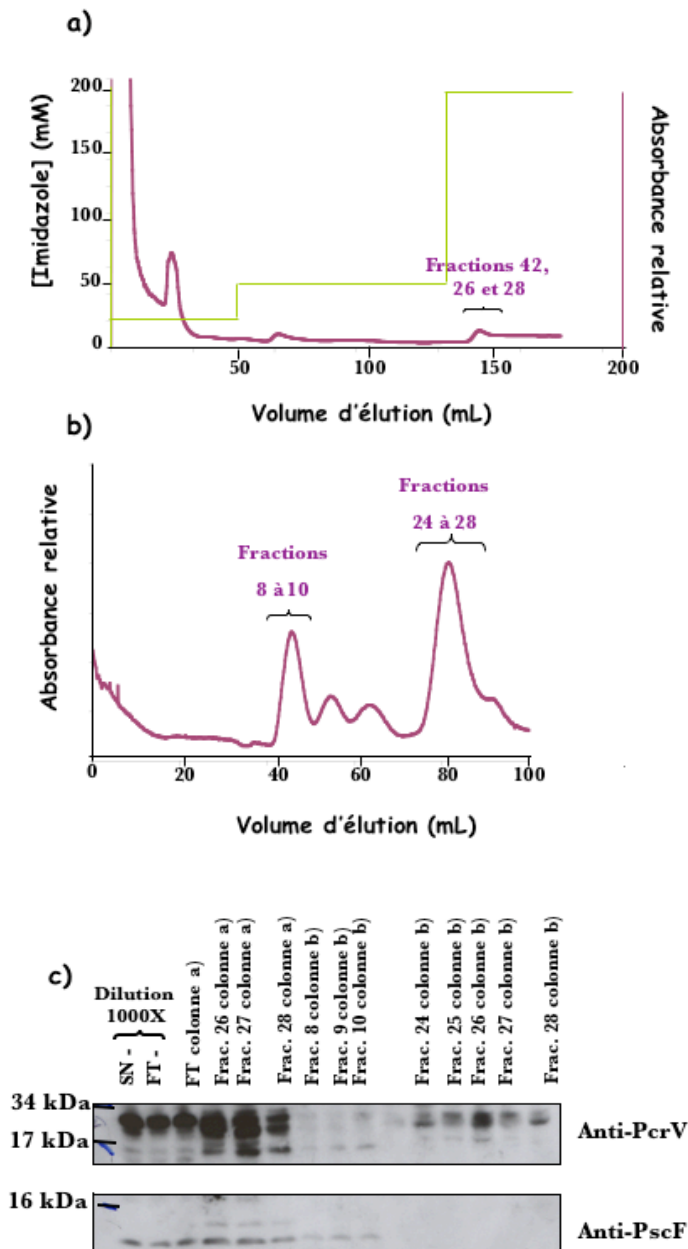


Figure 10.6 : Les protéines PscF_{His6} et PcrV_{ΔCter} co-purifient sur colonne d'affinité au nickel mais pas en chromatographie d'exclusion de taille.

a) Chromatogramme de la purification par affinité au nickel. b) Chromatogramme de l'étape de purification par exclusion de taille. c) Les fractions de purification présentant un pic d'absorbance à 280 nm ont été analysées par western blot en utilisant des anticorps anti-PcrV et anti-PscF. SN : surnageant, FT : "Flow through", Frac. : Fraction.

Il semblerait que les protéines PscF et PcrV_{ΔCter} sont toujours capables d'interagir mais que cette interaction est peut-être moins stable que celle observée pour les protéines sauvages. En effet, le complexe ne semble maintenu que lors de deux étapes de purification et il serait dissocié au cours de la chromatographie d'exclusion de taille. En

effet, PscF est alors éluée comme une espèce polymérisée, proche du volume mort de la colonne, et la protéine PcrV tronquée est éluée plus tardivement.

L'hélice $\alpha 12$ de PcrV semble jouer un rôle dans l'interaction entre PscF et PcrV. Son absence ne semble pas empêcher la formation d'un complexe entre les deux protéines mais celui ci paraît moins stable et ne peut être co-purifié que lors de deux colonnes. La troisième étape de purification semblerait conduire à une séparation du complexe.

1.3.2 Etude de la polymérisation d'un hybride FV_{Cter}

L'hélice $\alpha 12$ de PcrV est homologue au niveau structural à l'hélice C terminale de PscF qui est nécessaire à la polymérisation de la protéine (Deane *et al.*, 2006 ; Quinaud *et al.*, 2007), comme le sont celles de LcrV et de MxiH (Deane *et al.*, 2006).

Pour appréhender le rôle de l'hélice $\alpha 12$ de PcrV dans l'interaction avec PscF, une protéine hybride entre PscF_{His6} dépourvue de son hélice C terminale et remplacée par l'hélice C terminale de PcrV a été générée (Figure 10.7).

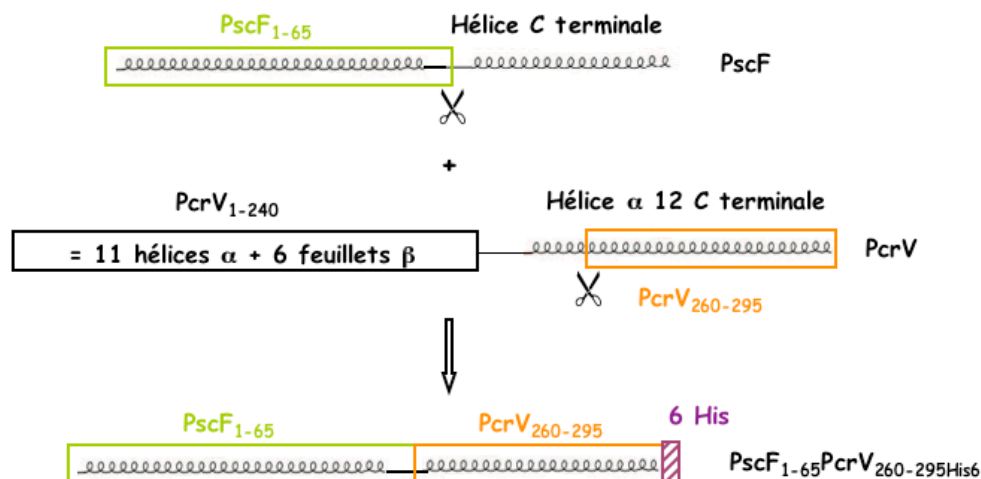


Figure 10.7 : Schéma représentant la protéine hybride $FV_{Cter His6}$.
Les résidus 260 à 295 de PcrV (hélice $\alpha 12$) ont été greffés sur les résidus 1 à 65 de PscF (sans son hélice C terminale).

Afin de déterminer le comportement de la protéine hybride $FV_{Cter His6}$, nous l'avons surproduite et purifiée en deux étapes. En sortie de chromatographie d'affinité au nickel, l'hybride est élué à 200 mM d'imidazole (fractions 8, 9 et 10, Figure 10.8 b) et il

est injecté sur une colonne d'exclusion de taille. La protéine est éluée rapidement entre 40 et 46 mL (Figure 10.8 a) et le gel coloré au bleu de Coomassie (Figure 10.8 b) ainsi qu'une analyse par western blot confirment que le pic est constitué de l'hybride. Nous avons superposé le chromatogramme obtenu avec celui d'une purification classique de la protéine PscF_{His6} afin de comparer l'éluion de ces deux protéines (Figure 10.8 a). PscF_{His6}, sous forme polymérisée, est éluée à un volume compris entre 36 et 50 mL. Deux populations peuvent être distinguées : une entre 36 et environ 40 mL contenant de très longues fibres (>1 μm) et une autre, entre 40 et 50 mL contenant des formes de polymérisation intermédiaires de la protéine (Quinaud *et al.*, 2005). Nous constatons que l'éluion de l'hybride est superposée à l'éluion de ces formes intermédiaires de polymérisation. Afin de vérifier sa capacité à polymériser nous avons observé par MET un échantillon de la fraction 4 de chromatographie d'exclusion de taille (Figure 10.8 c). Il contient en majorité de petites fibres dont la polymérisation est intermédiaire. Il est toutefois possible d'y observer quelques très longues fibres (>1 μm).

L'hybride est donc capable de polymériser ce qui suggère que l'hélice C terminale de PcrV peut fonctionnellement remplacer l'hélice C terminale de PscF.

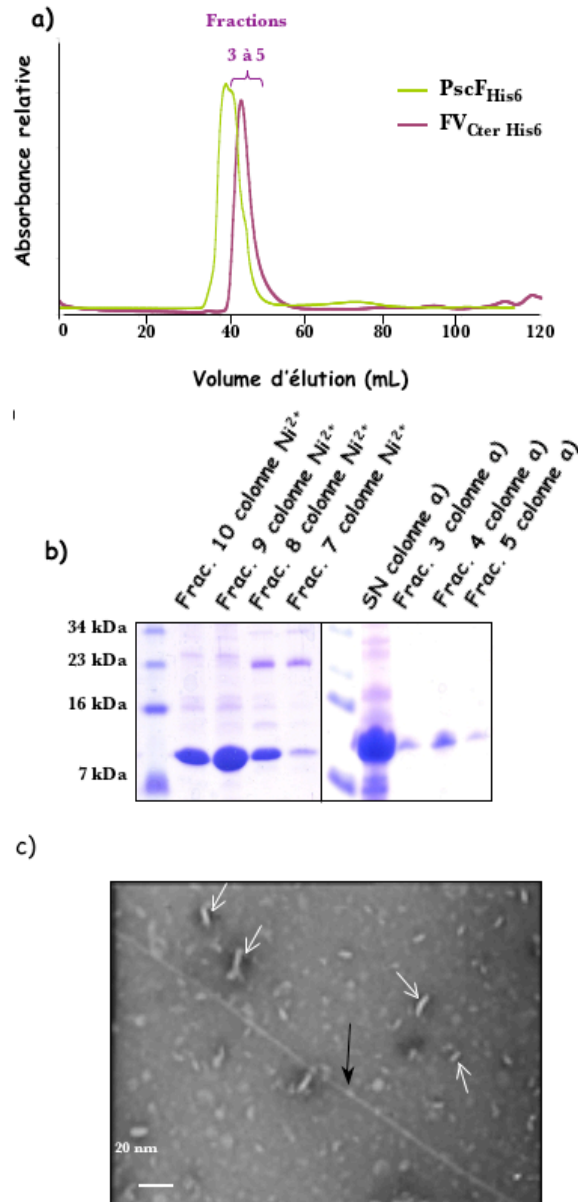


Figure 10.8 : La protéine hybride $FV_{Cter His6}$ est capable de polymériser.
 a) Chromatogramme de la purification par exclusion de taille. Superposition des résultats d'une purification de $PscF_{His6}$ (en vert) et de $FV_{Cter His6}$ (en violet). b) Gel coloré au bleu de Coomassie des fractions de purifications de $FV_{Cter His6}$ après la colonne d'affinité au nickel et d'exclusion de taille. c) Image de MET d'un échantillon de la fraction 4 éluee de la chromatographie d'exclusion de taille de $FV_{Cter His6}$. La flèche noire indique une longue fibre polymérisée et les flèches blanches plusieurs fragments issus d'une polymérisation intermédiaire.

L'hélice C terminale de PscF peut être échangée par l'hélice $\alpha 12$ C terminale de PcrV. Ces résultats confirment les études de modélisation : les hélices C terminales de PscF et de PcrV sont homologues au niveau structural. De plus, l'hélice $\alpha 12$ de PcrV pourrait jouer un rôle important dans l'interaction entre cette protéine et PscF.

2. Interaction PscF et PcrV : étude *in vivo*

2.1 Interaction de PcrV au sommet des aiguilles

L'interaction de PcrV avec l'aiguille de sécrétion *in vivo* a été testée, mais sans succès, par plusieurs techniques.

- Marquage en immunofluorescence de PcrV sur des bactéries entières induites pour l'expression du SST3 et détection par microscopie à fluorescence en utilisant des anticorps anti-PcrV et anti-PscF afin de déterminer si les deux protéines colocalisent à la surface des bactéries.
- Marquage indirect avec un anticorps secondaire greffé à des billes d'or et un anticorps primaire dirigé contre PcrV et observations des aiguilles formées à la surface de la souche CHA Δ FliC ou directement des aiguilles purifiées par MET.
- La détection de PcrV à la surface des bactéries a aussi été testée par cytométrie en flux par marquage indirect en utilisant un anticorps secondaire greffé à un fluorochrome.
- Détection de PcrV par test ELISA sur cellules entières pour lesquelles le SST3 a été induit.

Malheureusement aucune des techniques citées ne nous ont permis d'obtenir des résultats concluants quant à l'interaction entre les deux protéines.

En parallèle aux essais de détection de l'interaction de PcrV et de PscF *in vivo*, nous avons créé une banque de mutants de PscF afin de déterminer les domaines d'interaction entre F et V. En effet, l'étude de mutants des protéines formant l'aiguille, MxiH de *S. flexneri* et YscF de *Y. pseudotuberculosis* ont permis de mieux comprendre l'interaction entre ces deux protéines.

2.2 Etude de mutants de PscF

2.2.1 Choix des mutants de PscF

Au cours de ce travail, des études phénotypiques de mutants de MxiH et de YscF ont été réalisées (Kenjale *et al.*, 2005 ; Davis and Mecsas, 2007). Nous nous sommes basés sur les résultats de ces études pour créer les mutants de PscF pour étudier l'interaction

entre PscF et PcrV. Nous avons choisi 8 mutations parmi les acides aminés conservés entre MxiH, YscF et PscF, dont les mutations chez MxiH ou YscF conduisent à un défaut de translocation des toxines, mais sans défaut de la sécrétion des translocateurs pour YscF (Figure 10.9).

Les mutants équivalents à P44A, Q51A, K72A et D73A de MxiH (Kenjale *et al.*, 2005) ont été créés chez PscF : P47A, Q54A, R75A et D76A (Figure 10.9).

Les mutations qui nous ont paru intéressantes sur YscF (Davis and Mecsas, 2007) sont : A27V, A30V, N31S, A33V, D46A. Leurs équivalents sur PscF ont été générés : A24V, A27V, N28S, D30A et D45A.

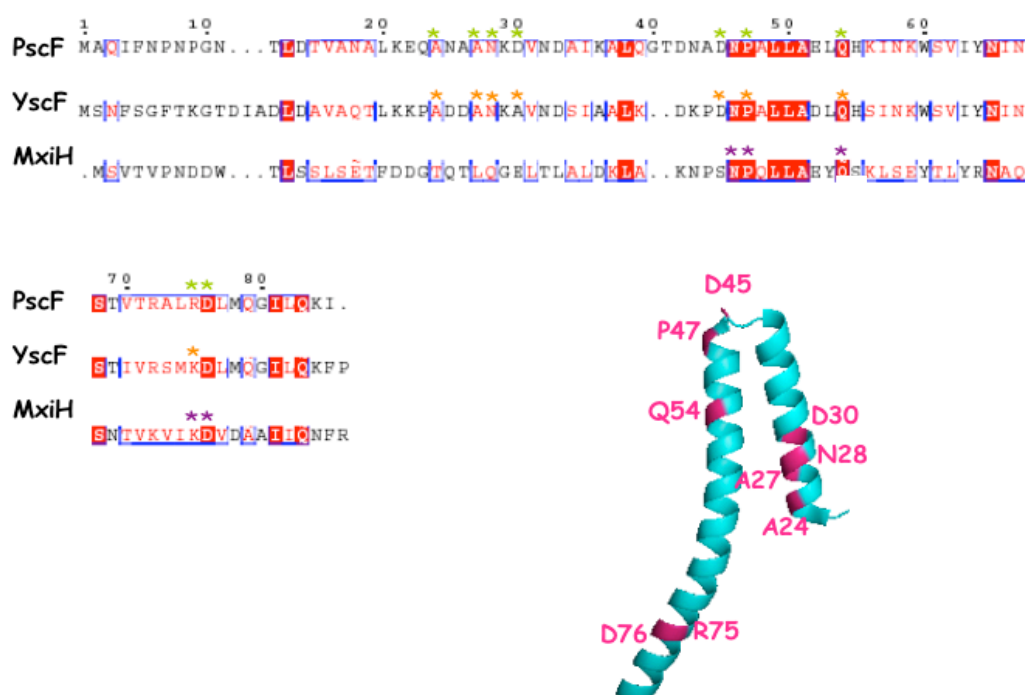


Figure 10.9 : Mutations de PscF étudiées localisées sur la séquence.

a) Les séquences ont été alignées par le programme ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) et mises en forme à l'aide du serveur ESPript (Gouet *et al.*, 1999). Les acides aminés identiques sont représentés en rouge et les acides aminés homologues soulignés en bleu. Les mutations de ces protéines que nous abordons dans ce chapitre sont présentées par des étoiles de couleur vertes pour PscF, oranges pour YscF (Davis and Mecsas, 2007) et violettes pour MxiH (Kenjale *et al.*, 2005). **b)** Localisation des mutations sur la structure de MxiH (Deane *et al.*, 2006, code PDB : 2ca5).

Nous avons choisi d'étudier 10 mutants de PscF en se basant sur l'homologie de séquence de cette protéine avec MxiH et YscF et en tenant compte des études antérieures réalisées sur ces deux protéines. Nous avons créé par mutagenèse

dirigée les mutants : *PscF*_{A24V}, *PscF*_{A27V}, *PscF*_{N28S}, *PscF*_{D30A}, *PscF*_{D45A}, *PscF*_{P47A}, *PscF*_{Q54A}, *PscF*_{P47A/Q54A}, *PscF*_{R75A} et *PscF*_{D76A}.

2.2.2 Détermination du phénotype des mutants

L'effet des mutations de *PscF* dans *P. aeruginosa* a été déterminé par analyse des phénotypes de souches CHAΔF complémentées pour l'expression de chacun des mutants. Pour cela, les souches ont été testées pour leur pouvoir cytotoxique sur les macrophages (insertion d'un pore de translocation) (Figure 10.10 a). La majorité des mutants testés présentent un phénotype comparable à celui d'une souche sauvage. Le mutant D76A et le double mutant P47A/Q54A, quant à eux, ne sont plus capables d'infecter les macrophages et ont un phénotype similaire à celui d'une souche CHAΔF. La mutation R75A a un faible effet sur le fonctionnement du SST3 avec une diminution de 25 à 30% de la cytotoxicité en comparaison à la souche sauvage.

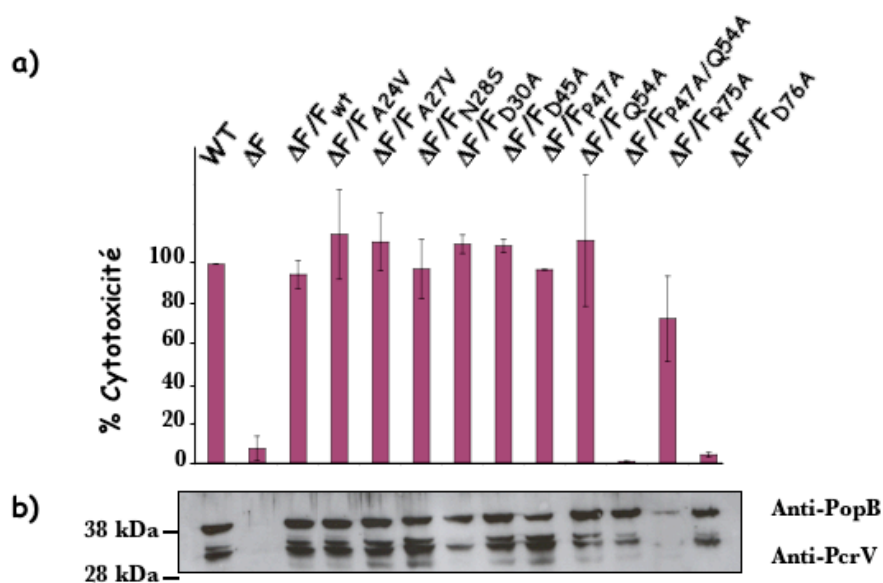


Figure 10.10 : Phénotype des mutants de *PscF* : étude de la cytotoxicité et de la sécrétion des translocateurs.

a) La perte de l'activité dépendante du SST3 a été observée après infection de macrophages et de la cytotoxicité. Le simple mutant F_{D76A} et le double mutant F_{P47A/Q54A} ne sont plus capable d'infecter les macrophages. **b)** La fonctionnalité globale du SST3 a été vérifiée par western blot sur les protéines sécrétées après induction du système. La synthèse et la sécrétion de *PscF*, des translocateurs *PcrV* et *PopB* (Figure 10.10 b)

ainsi que de la toxine ExoS ont été analysées par western blot après induction du SST3 sur des culots et surnageants de culture, respectivement. Toutes les souches sont capables de produire les translocateurs et les effecteurs à un niveau comparable (non montré). PscF, les effecteurs PcrV et PopB (Figure 10.10 b) ainsi que la toxine ExoS sont sécrétés à des taux comparables pour la majorité des souches. La souche exprimant la protéine mutante F_{D30A} semble toutefois avoir une sécrétion un peu diminuée. Le mutant R75A, quant à lui, présente un défaut de sécrétion important : seul très peu de PcrV est sécrété et un niveau faible de PopB. Ceci pourrait expliquer que ce mutant ne présente qu'environ 70% de cytotoxicité comparé à une souche sauvage.

En troisième lieu, nous avons vérifié si les toxines sont transloquées dans les cellules hôtes par observation de la déformation du cytosquelette de fibroblastes dont l'actine est fusionnée à la GFP. Les résultats de l'expérience de translocation des toxines sont synthétisés dans le tableau 6.

Souche	Sécrétion	Cytotoxicité	Translocation
WT	++	++	++
ΔF	-	-	-
ΔF/F_{A24V}	++	+++	++
ΔF/F_{A27V}	++	+++	+/-
ΔF/F_{N28S}	++	++	++
ΔF/F_{D30A}	+	+++	+
ΔF/F_{D45A}	++	+++	ND
ΔF/F_{P47A}	++	++	+/-
ΔF/F_{Q54A}	++	+++	ND
ΔF/F_{P47A/Q54A}	+	-	+/-
ΔF/F_{R75A}	+/-	+	ND
ΔF/F_{D76A}	++	-	+/-

Tableau 6 : Récapitulatif du phénotype des mutants de PscF étudiés.

ND : Non déterminé

Une diminution de la capacité à injecter des toxines dans les cellules hôtes est observée pour plusieurs souches. Les deux mutants non cytotoxiques, PscF_{P47A/Q54A} et PscF_{D76A}, voient leur capacité à transloquer les toxines très diminuée sans être complètement abolie. La détermination de la translocation des toxines par cette technique n'est pas quantitative et, aux vues des résultats que nous avons obtenus, il serait intéressant de réaliser d'autres expériences qui permettraient une détermination plus quantitative de

la translocation. Pour le moment, nous ne tiendrons donc compte que de la capacité des mutants à insérer ou non les pores de translocations pour nos conclusions.

Les simples mutants PscF_{R75A} et PscF_{D76A} et le double mutant PscF_{P47A/Q54A} ont un phénotype assez intéressant. Les deux derniers semblent présenter un défaut d'insertion du pore de translocation. Par contre la sécrétion des effecteurs et translocateurs apparaît être similaire à celle d'une souche sauvage.

Le mutant PscF_{R75A}, quant à lui, présente un défaut de sécrétion qui doit expliquer son incapacité à former des pores de translocation.

2.2.3 Insertion du pore de translocation par les mutants de PscF

Le phénotype des mutants PscF_{D76A} et PscF_{P47A/Q54A} suggère un défaut de la formation d'un pore de translocation fonctionnel. Pour vérifier ceci, nous avons infecté des érythrocytes de mouton et mesuré la capacité de lyse de ces cellules par les souches CHA sauvage, ΔF et ΔF complémentée par PscF ou par les deux mutants sélectionnés (Figure 10.11 a). La capacité des deux mutants de PscF à lyser les érythrocytes est comparable à celle d'une souche n'exprimant pas *p_{scF}*. Comme nous l'avons observé dans le paragraphe précédent, la sécrétion de PscF et des translocateurs PcrV et PopB/PopD par ces deux mutants est comparable à celle d'une souche sauvage (Figure 10.10 b). Les résultats de lyse ne sont donc pas dus à un défaut d'export de l'aiguille de sécrétion.

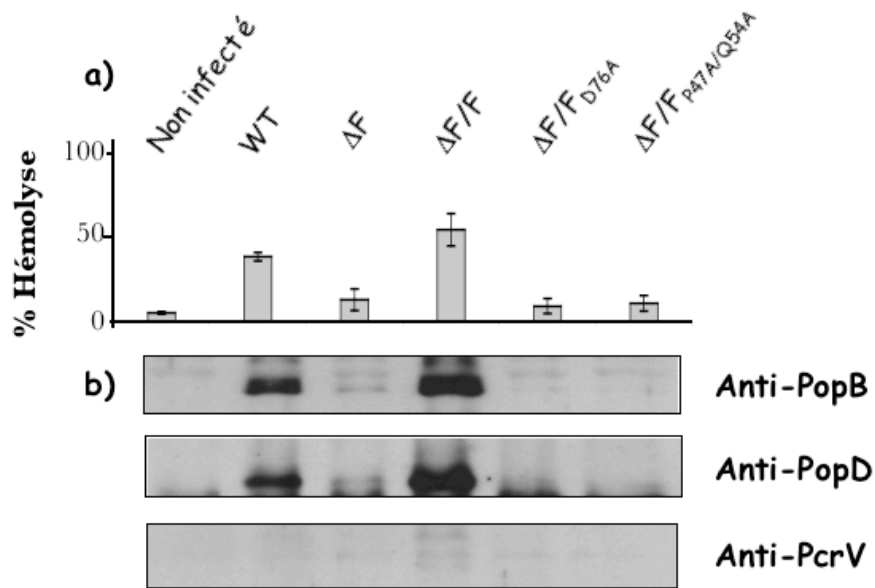


Figure 10.11 : Phénotype des mutants de PscF : insertion du pore de translocation dans les membranes d'érythrocytes.

a) L'activité dépendante du SST3 a été observée par mesure de la lyse d'érythrocytes. Le simple mutant F_{D76A} et le double mutant F_{P47A/Q54A} sont non hémolytiques. **b)** Les membranes des érythrocytes infectés ont été purifiées et le contenu protéique analysé en western blot.

Pour chacune des souches, les protéines insérées dans les membranes des érythrocytes infectés ont été analysées (Figure 10.11 b). L'absence de la protéine PcrV dans les membranes atteste qu'elles ne sont pas contaminées par les protéines présentes dans le surnageant de culture cellulaire ou dans le cytoplasme bactérien. Les souches cytotoxiques CHA et ΔF/PscF insèrent les protéines PopB et PopD en grande quantité dans les membranes des cellules hôtes. Par contre, nous observons que dans le cas des cellules infectées par ΔF/F_{D76A} et ΔF/F_{P47A/Q54A}, aucun des deux translocateurs hydrophobes n'est inséré.

Ainsi, ces deux mutants ne sont plus capables de former un pore de translocation fonctionnel dans les cellules eucaryotes ce qui explique leur défaut d'infection. Ce phénotype pourrait être dû à un défaut d'assemblage de PcrV sur PscF.

2.2.4 Choix des mutations à étudier plus amplement

Les mutations de PscF qui nous semblent les plus intéressantes correspondent aux mutations K72A de MxiH et K76D de YscF pour R75A de PscF. La simple mutation

D76A et la double mutation P47A/Q54A de PscF correspondent aux mutations D73A et P44A/Q51A de MxiH, respectivement.

Le mutant R75A de PscF a un phénotype assez semblable au mutant K76A de YscF mis à part que la sécrétion des translocateurs est faible contrairement à ce dernier. Les auteurs ayant étudié la mutation YscF_{K76A}, proposent que ce défaut provienne d'un mauvais assemblage des aiguilles (Davis and Meccas, 2007). En effet, les aiguilles formées ont été analysées par l'utilisation d'un agent pontant et montrent un défaut de polymérisation. Cette mutation est localisée dans la partie C terminale de YscF, région connue comme capitale pour la polymérisation de la protéine (Deane *et al.*, 2006 ; Quinaud *et al.*, 2007). Malgré cela, l'interaction avec LcrV semble maintenue car pendant l'infection, les toxines sécrétées ne fuient pas dans le milieu extérieur ce qui semble impliquer qu'une structure soit formée au sommet de l'aiguille.

La même mutation chez MxiH, entraîne un phénotype semblable. Dans ce cas, les aiguilles sont un peu plus courtes que les aiguilles d'une souche sauvage, ce qui pourrait expliquer le défaut de sécrétion des toxines entraînant l'incapacité à infecter et envahir les cellules hôtes. Par contre ces aiguilles conservent leur capacité à être induites artificiellement supposant qu'IpaD et d'autres translocateurs peuvent toujours interagir à leur sommet. Les auteurs proposent donc aussi que les défauts observés proviennent du fait que la polymérisation n'est pas optimale.

Les effets de cette mutation paraissent moins drastiques chez PscF (R75A) que chez ses homologues puisque la souche conserve tout de même 70% de son efficacité d'infection. Il serait intéressant de purifier les aiguilles et de faire des expériences de pontage sur ces dernières afin de voir si la polymérisation est intacte ou non. Il serait aussi intéressant de voir si le peu de PcrV sécrété peut interagir avec les aiguilles purifiées.

Le mutant D76A de PscF a un phénotype sensiblement comparable au mutant D73A de MxiH. Comme PcrV n'a pas d'effet sur la sécrétion des translocateurs et effecteurs, contrairement à IpaD, seul le phénotype de sécrétion n'est pas le même. MxiH_{D73A} présente une sécrétion constitutive et n'est pas inductible artificiellement (Kenjale *et al.*, 2005). Cette caractéristique est similaire à celle d'une souche mutante n'exprimant pas *ipaD* mis à part la vitesse du phénomène. La purification des aiguilles de *S. flexneri* suivie de leur séparation en chromatographie d'exclusion de taille a permis d'observer qu'IpaD n'est pas présent sur ces aiguilles (Veenendaal *et al.*, 2007). Ainsi, les défauts de

ce mutant auraient pour origine l'absence du translocateur hydrophile. La modélisation de l'aiguille de *S. flexneri* montre que l'acide aminé D73 est situé au niveau de la queue d'une sous unité de MxiH, qui est en interaction avec la tête de la sous unité placée au-dessous. Cette localisation n'est pas directement liée à la zone d'interaction de l'aiguille avec IpaD mais les auteurs proposent que la mutation induit des changements très faibles dans l'assemblage de l'hélice, signal qui pourrait induire la sécrétion des effecteurs (d'où le phénotype de sécrétion constitutive). Ces modifications pourraient peut-être aussi entraîner l'absence du translocateur.

Chez PscF, ce mutant conduit à une incapacité à infecter les macrophages ainsi qu'à un défaut important de la translocation des toxines dans les cellules. Cette mutation a déjà été caractérisée lors de l'étude du complexe formé entre PscF, PscG et PscE (Quinaud *et al.*, 2007). Le phénotype observé était alors une absence de translocation des toxines ainsi qu'un défaut de leur sécrétion. De plus, il est intéressant de noter que cette mutation a un effet dominant négatif. Les auteurs proposent qu'elle perturbe la formation de l'aiguille et que le mélange de sous unités mutantes avec les sauvages ne permet pas toujours la formation d'aiguilles fonctionnelles.

Nous avons pu aussi vérifier que ce mutant n'était pas capable de lyser les globules rouges, phénomène dû à l'absence de l'insertion de PopB et PopD dans les membranes de ces cellules. Il serait donc intéressant de vérifier la localisation ou l'absence de PcrV au sommet des aiguilles produites par ce mutant. Ceci nous permettrait de vérifier si le défaut de formation du pore de translocation est dû à l'absence de PcrV ou à un mauvais assemblage de la protéine sur l'aiguille.

Les simples mutants P44A et Q51A de MxiH sont constitutivement actifs pour la sécrétion mais elle est lente à se mettre en place et n'est observée qu'après culture des bactéries sur la nuit (Kenjale *et al.*, 2005). Les souches mutantes n'exprimant pas *ipaD* ou *ipaB* sont elles aussi constitutivement actives mais de façon rapide car la sécrétion peut être détectée dès 15 minutes de culture (Veenendaal *et al.*, 2007). La purification des aiguilles de *S. flexneri* et l'analyse de leur composition après passage sur chromatographie d'exclusion de taille, a permis d'observer que les aiguilles formées par MxiH_{P44A} présentent IpaD à leur sommet (Veenendaal *et al.*, 2007). Le phénotype observé de sécrétion constitutive pourrait s'expliquer par l'absence d'IpaB qui est nécessaire à former le bouchon. MxiH_{Q51A} quant à lui, forme des aiguilles qui présentent IpaD, IpaB et IpaC à leur sommet. La présence d'IpaC est surprenante, mais elle expliquerait aussi le phénotype de sécrétion constitutive car si le complexe au

sommet de l'aiguille est prêt à être inséré, il n'y aurait plus de blocage de la sécrétion des effecteurs.

Le double mutant P44A/Q51A, après étude de la composition de son complexe distal, contient aussi IpaD, IpaB et une quantité très importante d'IpaC (Veenendaal *et al.*, 2007). Les auteurs proposent que, comme les 3 Ipas sont présents au sommet de l'aiguille, la bactérie est capable d'insérer un pore de translocation dans les membranes des érythrocytes lorsque le contact entre les bactéries et les cellules est forcé. Ceci expliquerait les 30% résiduels d'hémolyse qui sont observés. Le contact doit être forcé car les signaux de contact cellulaires perçus par l'aiguille ou par IpaD ne le sont plus de par la présence d'IpaC. C'est pourquoi l'invasion des cellules par ce mutant n'est plus possible.

Pour PscF, les simples mutants P47A et Q54A ne présentent pas de phénotype particulier. Par contre le double mutant est intéressant car il perd sa capacité à former des pores fonctionnels et à injecter les toxines dans les cellules. Ce phénotype n'est pas dû à un défaut de sécrétion des translocateurs et des toxines. Mais nous avons pu vérifier que ce mutant n'était plus capable de lyser les globules rouges, sans activité résiduelle détectée comme pour MxiH, phénotype dû à une incapacité à insérer les protéines PopB et PopD dans les membranes des cellules infectées. Il serait intéressant de déterminer si PcrV est présent ou non au sommet de l'aiguille de ces mutants afin de comprendre si le défaut d'insertion du pore de translocation est dû à un défaut de l'interaction de PcrV et PscF ou à un mauvais assemblage de la protéine sur l'aiguille.

Les mutants PscF_{D76A} et PscF_{P47A/Q54A} ont été sélectionnés pour une étude plus approfondie afin de pouvoir expliquer les phénotypes observés pour chacune des protéines mutantes. En effet, il est possible que ces mutations touchent la capacité de l'aiguille à interagir avec PcrV.

2.2.5 Interaction de PscF_{D76A} et PscF_{P47A/Q54A} et de PcrV

Afin d'évaluer la capacité de ces mutants à interagir avec PscF, les mêmes mutations ont été introduites dans le vecteur de surproduction pETDuet1-*pscF_{His6}-pcrV*. Les conditions dans lesquelles se sont déroulées les co-purifications sont toujours les mêmes que celles décrites précédemment. Les résultats que nous avons obtenus sont synthétisés dans le tableau 7.

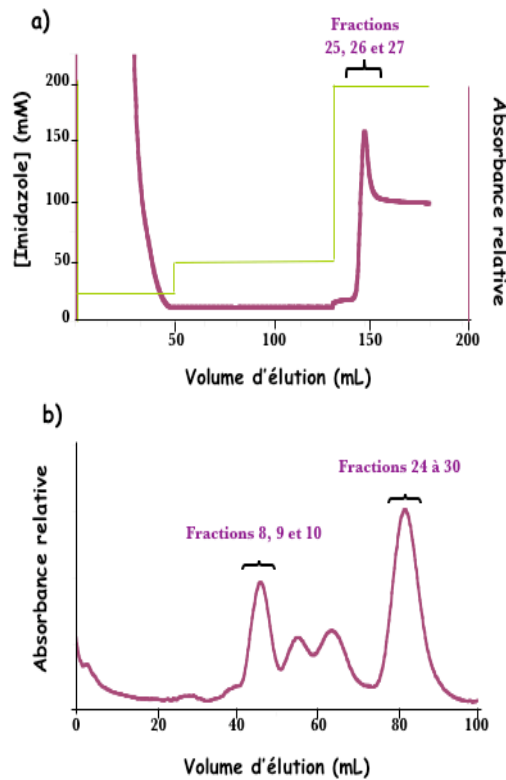
Ces expériences nous ont permis d'observer que les deux mutants de PscF conservent leur capacité d'interaction avec la protéine PcrV *in vitro*. En effet, des complexes entre ces deux protéines sont formés et peuvent être co-purifiés.

Mutant testé	Echangeuse d'anions	Affinité au nickel	Exclusion de taille
PscF _{D76A}	Co-élution dans le FT	Co-élution à 200 mM d'imidazole	Pas de Co-élution 40 < V _E PscF < 50mL 76 < V _E PcrV < 86mL
PscF _{P47A/Q54A}	Co-élution dans le FT	Co-élution à 200 mM d'imidazole	Co-élution 44 < V _E PscF + PcrV < 58mL 80 < V _E PcrV seul < 90mL

Tableau 7 : Synthèse des résultats de co-purification de PscF_{D76A} et PscF_{P47A/Q54A} et de PcrV.

FT : "Flow Through", V_E : Volume d'élution

Néanmoins, il semblerait que le complexe formé entre PscF_{D76A} et PcrV soit instable car il ne co-purifie que sur deux colonnes (Figure 10.12 a et c). En effet, lors de la chromatographie d'exclusion de taille, les deux protéines sont éluées séparément (Figure 10.12 b et c).



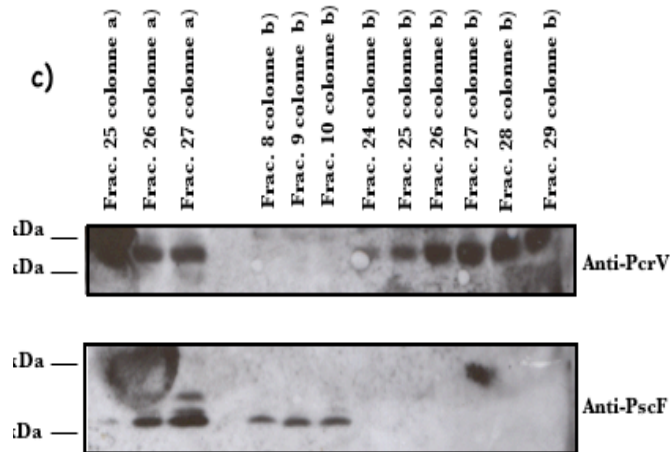


Figure 10.12 : Les protéines PscF_{D76AHis6} et PcrV co-purifient sur colonne d'affinité au nickel mais pas en chromatographie d'exclusion de taille.

a) Chromatogramme de la purification par affinité au nickel. b) Chromatogramme de l'étape de purification par exclusion de taille. c) Les fractions de purification présentant un pic d'absorbance à 280 nm ont été analysées par western blot.

SN : surnageant, FT : "Flow through", Frac. : Fraction.

Le double mutant PscF_{P47A/Q54A}, quant à lui, semble former un complexe plus stable (Figure 10.13). Il n'est néanmoins pas exclu qu'une petite partie du complexe formé se dissocie car nous avons observé un pic faible ne contenant que PcrV éluant en fin de chromatographie d'exclusion de taille (Figure 10.13 b et c).

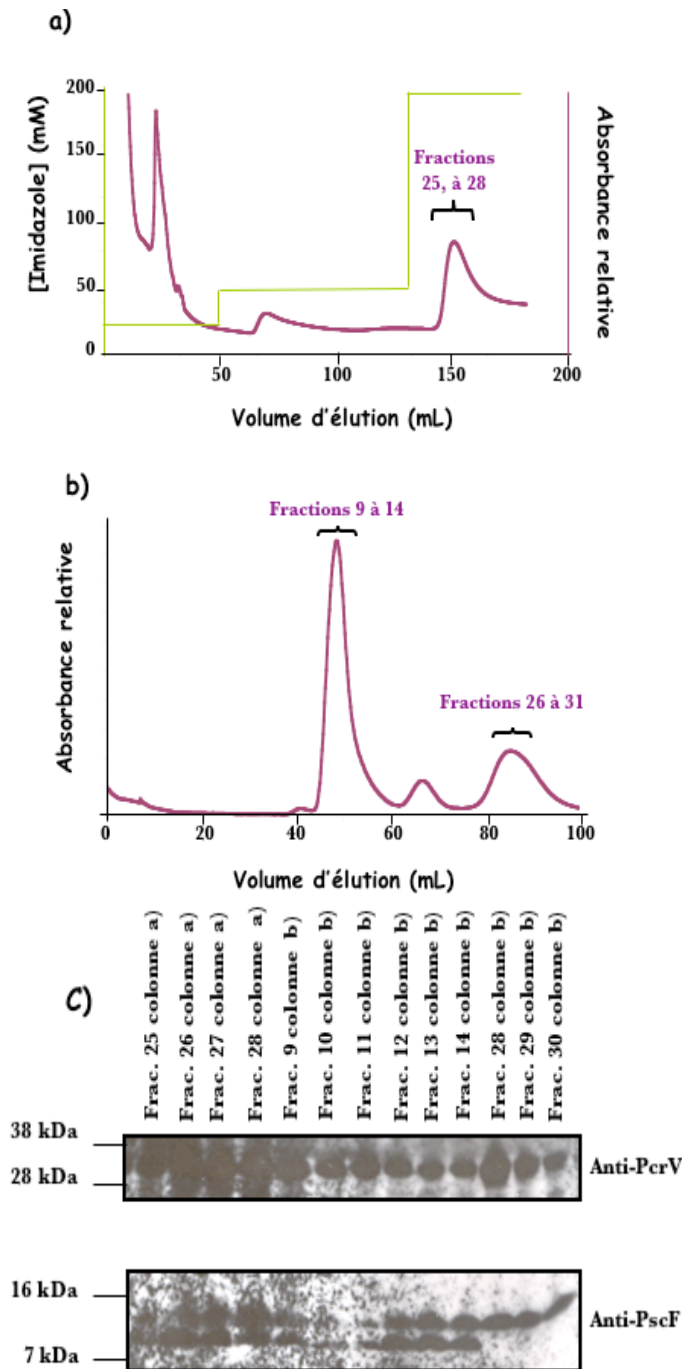


Figure 10.13 : Les protéines PscF_{P47A/Q54A His6} et PcrV co-purifient sur colonne d'affinité au nickel et en chromatographie d'exclusion de taille.

a) Chromatogramme de la purification par affinité au nickel. b) Chromatogramme de l'étape de purification par exclusion de taille. c) Les fractions de purification présentant un pic d'absorbance à 280 nm ont été analysées par western blot.

SN : surnageant, FT : "Flow through", Frac. : Fraction.

Nous n'avons pas pu vérifier la composition des aiguilles de *P. aeruginosa* formées par PscF_{D76A} et PscF_{P47A/Q54A} *in vivo*, mais les analyses par co-purification permettent de formuler des hypothèses quant à la présence ou l'absence de PcrV au sommet de ces aiguilles.

En effet, le complexe formé entre PscF_{D76A} et PcrV semble instable et il est possible d'imaginer que, comme chez *S. flexneri*, le complexe PcrV ne peut se maintenir au sommet des aiguilles formées par ce mutant.

Par contre, PscF_{P47A/Q54A} et PcrV semblent former un complexe stable et il est donc possible de penser que les aiguilles composées par ce mutant, comme chez *S. flexneri*, sont capables de maintenir à leur sommet la structure formée de PcrV. Dans ce cas de figure, les défauts observés proviendraient d'un mauvais assemblage du complexe au sommet de l'aiguille plutôt qu'à une incapacité d'interaction entre les deux protéines.

Quatrième partie

Conclusion et perspectives

Chapitre 11

L'interactome des antigènes V : relation structure-fonction

Ce travail de thèse a consisté en la recherche des partenaires des antigènes V à la surface de la bactérie et à la caractérisation des interactions mises en évidence.

Deux partenaires directs ont été caractérisés : l'antigène lui-même et le composant de l'aiguille de sécrétion.

1. Partenaire PcrV/LcrV

Après dépliement et repliement de PcrV ou de LcrV, ces protéines sont capables de former des espèces multimériques. Celles-ci sont constituées d'au moins quatre sous unités et forment des structures annulaires visibles en MET dont la taille est du même ordre que celle du pore de translocation, suggérant une continuité possible entre les deux structures.

L'hélice $\alpha 12$, très conservée entre PcrV et LcrV, est indispensable à l'oligomérisation de ces protéines. Ce sont plus particulièrement les résidus hydrophobes engagés dans la formation d'un coiled-coil intramoléculaire avec l'hélice $\alpha 7$ qui jouent un rôle primordial.

Ces résultats nous ont conduit à la proposition d'un modèle de multimérisation par un phénomène d'échange de domaines intermoléculaires (Figure 11.1). La structure tridimensionnelle de LcrV et les études fonctionnelles de l'interaction entre LcrV et LcrG suggèrent que le monomère de LcrV peut être retrouvé sous deux conformations distinctes : une où le coiled-coil intramoléculaire entre les hélices $\alpha 7$ et $\alpha 12$ est formé (Figure 11.1 b) (Derewenda *et al.*, 2004) et une forme ouverte où le coiled-coil intramoléculaire est défait et l'hélice C terminale éloignée du reste de la molécule (Figure 11.1 b) (Voir chapitre 4, paragraphe 3.1). Ceci suggère que cette molécule pourrait avoir la capacité d'échanger son hélice $\alpha 12$ avec d'autres unités qui se trouvent en conformation ouverte (Bennett *et al.*, 1995 ; Rousseau *et al.*, 2003). C'est ce qui a été proposé pour la formation des dimères de LcrV (Derewenda *et al.*, 2004) qui pourraient être issus d'un échange réciproque de l'hélice $\alpha 12$ entre deux unités ouvertes (Figure 11.1 c).

Nous proposons que les oligomères de PcrV que nous avons étudiés sont susceptibles de se former par un processus où l'échange de domaines est réalisé de manière propagée entre plusieurs unités ouvertes. Nous avons représenté schématiquement la formation d'un tétramère par échange propagé de l'hélice $\alpha 12$ formant un anneau comme le prévoient nos résultats expérimentaux (Figure 11.1 d). Comme nous ne pouvons pas exclure que des pentamères soient formés et que c'est l'hypothèse avancée par plusieurs équipes (Deane *et al.*, 2006 ; Broz *et al.*, 2007 ; Johnson *et al.*, 2007), nous avons aussi représenté la formation d'un complexe formé de 5 unités (Figure 11.1 d).

Néanmoins, nos résultats expérimentaux n'excluent pas que les multimères soient formés par simple interaction de monomères, avec un rôle particulier de l'hélice $\alpha 12$. Mais ceci semble moins probable du fait qu'aucun oligomère ne se forme sans dépliement au préalable de la protéine. Seule la résolution tridimensionnelle de la structure des oligomères permettrait de trancher la question. Pour cela, une étude plus approfondie du mutant PcrV_{L262D/V273D} est envisagée. En effet, ce mutant est capable de former des multimères en concentration plus importante que la protéine sauvage. Après optimisation des conditions de purification, il sera possible d'essayer de déterminer leur structure. Pour ceci, des expériences de stabilité du complexe permettraient de définir la forme oligomérique la plus immuable et d'effectuer des essais de cristallisation.

PcrV, comme LcrV est localisé à l'extrémité distale des aiguilles de *P. aeruginosa*. Une étude de la fonctionnalité des domaines globulaires de PcrV et de LcrV chez *P. aeruginosa* a été réalisée en collaboration avec l'équipe de G. R. Cornelis. A partir des résultats obtenus il est difficile d'inférer un effet sur la fonctionnalité du SST3 à l'un ou l'autre des domaines globulaires. Ils semblent tous deux nécessaires à la protéine pour remplir sa fonction.

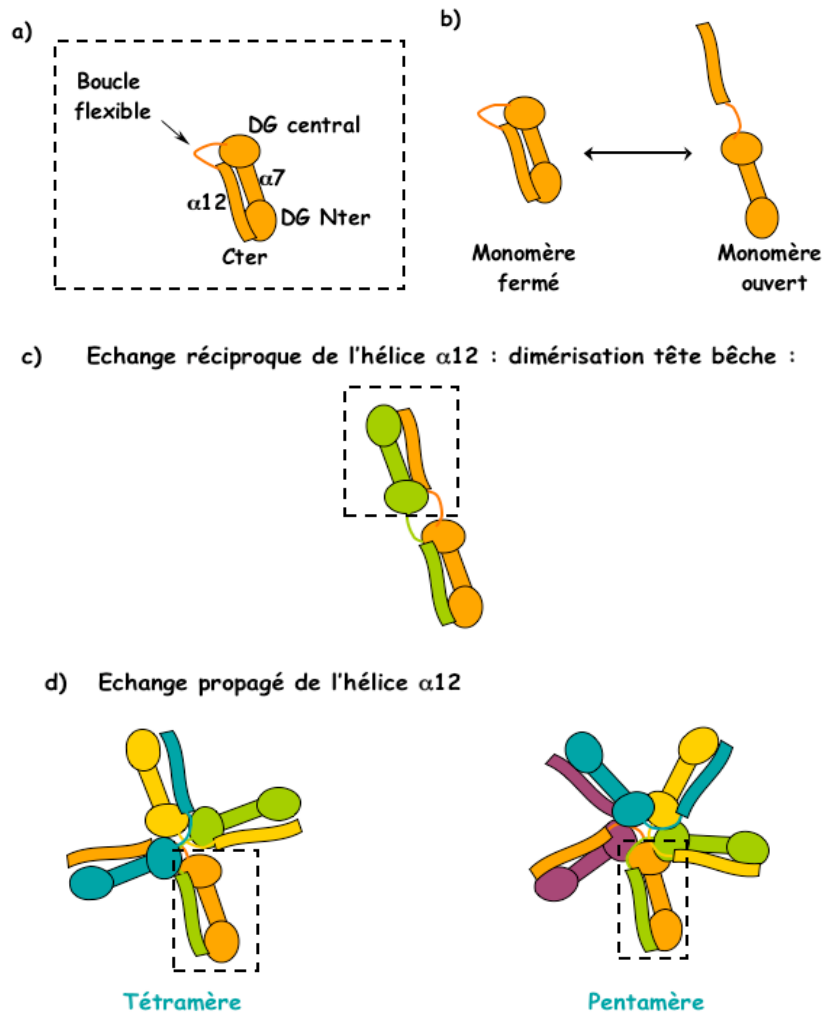


Figure 11.1 : Schéma de l'assemblage de PcrV par échange de domaines intermoléculaires.

a) Représentation schématique de PcrV. DG : Domaine Globulaire, Cter : extrémité C terminale. **b)** Monomère de PcrV en conformation fermée (coiled-coil intramoléculaire formé) et ouverte (hélice $\alpha 12$ écartée). **c)** Représentation d'un échange de domaine intermoléculaire réciproque. Le cadre en pointillé entoure une molécule hybride de structure identique au monomère fermé. **d)** Schéma d'un échange de domaine intermoléculaire propagé. Sont représentées l'association de 4 ou 5 unités en forme d'anneaux.

2. Interaction avec la sous-unité formant l'aiguille

Des expériences de co-purification ont permis de démontrer que les protéines V et F interagissent directement *in vitro* et ceci aussi bien avec la forme polymérisée et monomérique de PscF.

Il est nécessaire de mieux caractériser le complexe PcrV-PscF monomérique pour définir les domaines d'interaction ainsi que la stabilité du complexe. Ceci nous

permettrait, s'il est stable, d'envisager des études structurales. En effet, la détermination de la structure de ce complexe est indispensable pour la compréhension de l'assemblage de la protéine V sur l'aiguille.

L'hélice $\alpha 12$ de PcrV joue aussi un rôle dans l'interaction entre les deux protéines : son absence entraîne une déstabilisation du complexe. De plus, nous avons démontré que l'hélice C terminale de PscF est échangeable au niveau fonctionnel avec cette dernière. Un hybride des deux protéines est, en effet, capable de polymériser. Ces résultats confirment que PcrV interagit au sommet de l'aiguille grâce à son hélice C terminale qui est structurellement homologue à celle de PscF.

Pour analyser l'interaction de PscF et de PcrV *in vivo*, des expériences d'immunoprécipitation des aiguilles par PcrV et, inversement, de PcrV par les aiguilles pourraient être mises au point. Par contre, ces manipulations ne démontreront pas l'interaction directe entre les deux protéines. Il est donc aussi envisageable, comme il a été réalisé sur les aiguilles de *S. flexneri* (Veenendaal et al., 2007), de les purifier et les séparer sur chromatographie d'exclusion de taille afin d'analyser le contenu des fractions de co-purification de PscF.

Parmi une dizaine de mutants de PscF que nous avons construit, deux se sont montrés particulièrement intéressants *in vivo* : PscF_{D76A} et PscF_{P47A/Q54A}. Ceux-ci sont capables de sécréter les translocateurs mais présentent un défaut de translocation des toxines dans les cellules hôtes dû à une mauvaise insertion du pore. Ces acides aminés sont positionnés soit dans l'hélice permettant la polymérisation de PscF, soit dans la région de la boucle PSNP, suggérant que leur mutation entraîne un défaut de l'interaction entre l'aiguille et PcrV.

L'ensemble de ces données nous ont amené à proposer un modèle de l'interaction entre les deux protéines (Figure 11.2).

Comme il a été suggéré par la modélisation d'un complexe pentamérique de LcrV au sommet de l'aiguille de *S. flexneri* (Deane et al., 2006), il est possible que l'assemblage du complexe de PcrV par son hélice $\alpha 12$ sur PscF se fait dans la continuité de l'aiguille par mime du domaine C terminal de PscF (Figure 11.2 a). La structure finale forme un complexe annulaire à l'extrémité distale de l'aiguille (Figure 11.2 b).

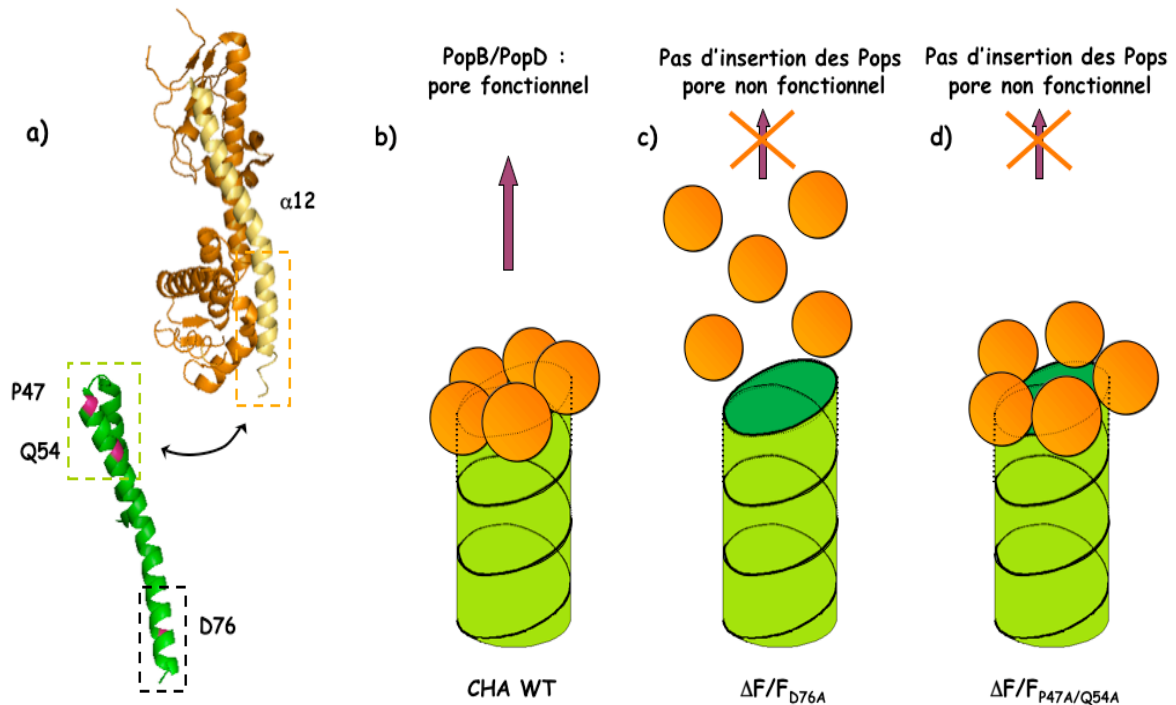


Figure 11.2 : Schéma de l'assemblage de PcrV sur l'aiguille de sécrétion.

Sont représentés en vert l'aiguille (PscF) et en orange les unités de PcrV.

b) Localisation des domaines d'interaction et des mutations de PscF. Les zones interagissant avec PcrV et PscF sont représentées en vert et en noir, respectivement. Structure de PcrV, l'hélice $\alpha 12$ est représentée en clair et la zone d'interaction avec l'aiguille entourée en orange. **b)** Dans le cas d'une souche sauvage. L'oligomère de PcrV peut s'assembler en mimant par son hélice $\alpha 12$ les unités de PscF : le complexe est fonctionnel et permet l'insertion du pore de translocation. **c)** Dans le cas d'une souche exprimant PscF_{D76A}. PcrV n'interagit pas de façon stable avec l'aiguille et sa fonctionnalité s'en trouve altérée. Aucun translocateur hydrophobe n'est inséré dans les membranes et la souche n'est pas virulente. **d)** Dans le cas d'une souche exprimant PscF_{P47A/Q54A}. PcrV interagit avec PscF. Mais sa fonction est altérée : les translocateurs hydrophobes ne sont pas insérés dans les membranes des cellules hôtes et les toxines ne sont pas transférées. Nous proposons que ce défaut est dû le résultat d'un mauvais assemblage du complexe PcrV au sommet de ces aiguilles.

Le mutant PscF_{D76A} (Figure 11.2 a) ne semble pas être capable de recruter de manière efficace la protéine PcrV au sommet de l'aiguille (Figure 11.2 c) : le complexe formé entre PcrV et PscF_{D76A} est instable. L'absence du complexe de PcrV sur ces aiguilles expliquerait qu'aucun des translocateur hydrophobe n'est inséré dans les membranes des cellules hôtes entraînant la formation d'un pore de translocation non fonctionnel.

La double mutation PscF_{P47A/Q54A}, quant à elle, entraîne un phénotype similaire au mutant PscF_{D76A} du point de vue de la formation de pores et de la virulence de la souche. Par contre, l'origine de ce défaut ne semble pas être la même. En effet, dans ce

cas de figure, l'interaction entre PcrV et PscF_{P47A/Q54A} est stable. Une des mutations touche la boucle PSNP et la seconde en est proche : elles sont donc situées à l'interface de la zone d'interaction entre PscF et PcrV (Figure 11.2 a). Nous suggérons que les défauts observés pourraient provenir d'un assemblage incorrect de la protéine V au sommet de ces aiguilles (Figure 11.2 d). En effet, nous avons pu constater dans le premier volet de ces travaux que si la formation des oligomères de PcrV était altérée, ceci entraînait une perte de la virulence. Pour confirmer cela, il serait intéressant d'examiner l'assemblage de PcrV sur l'aiguille mutée, par analyse des complexes formés en MET à balayage.

3. Interaction avec le pore de translocation

La position de PcrV et son rôle dans l'insertion d'un pore de translocation fonctionnel dans les membranes des cellules hôtes suggère que cette protéine interagisse aussi avec les translocateurs hydrophobes PopB et PopD.

Néanmoins, cette interaction n'a pas pu être mise en évidence par des techniques comme l'immunoprécipitation (Goure *et al.*, 2004) ou la co-purification (sans co-expression au préalable) (Schoehn *et al.*, 2003).

Au laboratoire, des études d'interaction entre des pores formés par PopB et PopD dans les membranes de liposomes et PcrV ont déjà été essayées. Pour ceci, des liposomes contenant des pores de translocation ont été greffés sur des supports et la fixation de PcrV sur ces échantillons a été suivie par BIAcore. Ces expériences n'ont pas permis de mettre en évidence une interaction. Il serait envisageable, tout en conservant la même approche, de tester l'interaction en fixant PcrV sur les supports, et en suivant par BIAcore l'éventuelle liaison de liposomes contenant des pores de translocation.

Le fait que l'interaction entre PcrV et le pore de translocation n'a pas pu être observé par des techniques classiques, est peut-être dû à l'utilisation de PcrV replié en monomère et non à des formes oligomériques ou dépliées. Nous pensons donc essayer des expériences de co-expression suivies de co-purification des protéines. Dans ce cas de figure, ce serait PopB ou PopD qui serait greffé à une étiquette et cloné dans le vecteur bicistronique pET-Duet1 contenant la séquence *pcrV*. Si cette technique permettait de mettre en évidence une interaction directe entre PcrV et chacun des

translocateurs hydrophobes, il serait aussi intéressant de surproduire les trois protéines ensemble avec une seule étiquetée pour vérifier si un complexe peut se former avec tous les protagonistes.

4. Thérapies contre *P. aeruginosa* et *Y. pestis*

Comme nous l'avons abordé précédemment pour le développement des immunothérapies, il serait intéressant de générer de nouveaux anticorps monoclonaux contre PcrV et LcrV.

Lors de ces travaux de thèse, nous avons mis en évidence que l'hélice $\alpha 12$ C terminale de PcrV et de LcrV joue un rôle essentiel dans l'assemblage multimérique de la protéine mais aussi dans sa capacité à mimer les sous unités de l'aiguille pour leur interaction avec celle-ci. Ce sont des aspects qui sont nécessaires à la fonctionnalité du SST3, car s'ils sont perturbés, la virulence s'en trouve atténuée. Les anticorps monoclonaux protecteurs disponibles à ce jour contre PcrV et LcrV ne ciblent pas cette hélice $\alpha 12$. Il serait donc intéressant de tester l'efficacité de protection d'anticorps dirigés contre ce domaine.

Il serait également possible d'imaginer une autre approche thérapeutique. Des peptides mimant des domaines protéiques particuliers et empêchant des interactions entre protéines sont de plus en plus envisagés en thérapeutique pour bloquer des fonctions essentielles de certaines protéines (Laudet *et al.*, 2007). Dans le cadre des infections à *P. aeruginosa* et *Y. pestis*, il serait possible de produire un peptide mimant l'hélice $\alpha 12$ de PcrV ou de LcrV. Ceux-ci, en entrant en compétition avec le même domaine sur la protéine, pourraient bloquer l'assemblage correct de PcrV/LcrV et de ce fait altérer sa localisation et sa fonction.

Cinquième partie

Références bibliographiques

Chapitre 12

Références bibliographiques

- Aepfelbacher, M., Trasak, C., and Ruckdeschel, K. (2007) Effector functions of pathogenic *Yersinia* species. *Thromb Haemost* **98**: 521-529.
- Akeda, Y., and Galan, J.E. (2005) Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**: 911-915.
- Allmond, L.R., Karaca, T.J., Nguyen, V.N., Nguyen, T., Wiener-Kronish, J.P., and Sawa, T. (2003) Protein binding between PcrG-PcrV and PcrH-PopB/PopD encoded by the *pcrGVH-popBD* operon of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Infect Immun* **71**: 2230-2233.
- Anderson, D.M., and Schneewind, O. (1997) A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science* **278**: 1140-1143.
- Arai, M., and Kuwajima, K. (2000) Role of the molten globule state in protein folding. *Adv Protein Chem* **53**: 209-282.
- Ball, G., Durand, E., Lazdunski, A. & Filloux, A. (2002). A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **43**, 475-485.
- Bennett, M.J., Schlunegger, M.P., and Eisenberg, D. (1995) 3D domain swapping: a mechanism for oligomer assembly. *Protein Sci* **4**: 2455-2468.
- Bergman, T., Hakansson, S., Forsberg, A., Norlander, L., Macellaro, A., Backman, A., Bolin, I., and Wolf-Watz, H. (1991) Analysis of the V antigen *lcrGVH-yopBD* operon of *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for a regulatory role of LcrH and LcrV. *J Bacteriol* **173**: 1607-1616.
- Berthelot, P., Grattard, F., Mallaval, F.O., Ros, A., Lucht, F., and Pozzetto, B. (2005) [Epidemiology of nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Stenotrophomonas maltophilia*]. *Pathol Biol (Paris)* **53**: 341-348.
- Birtalan, S., and Ghosh, P. (2001) Structure of the *Yersinia* type III secretory system chaperone SycE. *Nat Struct Biol* **8**: 974-978.
- Blocker, A., Gounon, P., Larquet, E., Niebuhr, K., Cabiaux, V., Parsot, C., and Sansonetti, P. (1999) The tripartite type III secretion system of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J Cell Biol* **147**: 683-693.
- Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., Sansonetti, P., and Allaoui, A. (2001) Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretion system. *Mol Microbiol* **39**: 652-663.
- Blocker, A., Komoriya, K., and Aizawa, S. (2003) Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3027-3030.
- Blocker, A.J., Deane, J.E., Veenendaal, A.K., Roversi, P., Hodgkinson, J.L., Johnson, S., and Lea, S.M. (2008) What's the point of the type III secretion system needle? *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 6507-6513.
- Broms, J.E., Forslund, A.L., Forsberg, A., and Francis, M.S. (2003a) PcrH of *Pseudomonas aeruginosa* is essential for secretion and assembly of the type III translocon. *J Infect Dis* **188**: 1909-1921.

- Broms, J.E., Sundin, C., Francis, M.S., and Forsberg, A. (2003b)** Comparative analysis of type III effector translocation by *Yersinia pseudotuberculosis* expressing native LcrV or PcrV from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* **188**: 239-249.
- Broz, P., Mueller, C.A., Muller, S.A., Philippsen, A., Sorg, I., Engel, A., and Cornelis, G.R. (2007)** Function and molecular architecture of the *Yersinia* injectisome tip complex. *Mol Microbiol* **65**: 1311-1320.
- Brubaker, R.R. (1991)** Factors promoting acute and chronic diseases caused by *yersiniae*. *Clin Microbiol Rev* **4**: 309-324.
- Brutinel, E.D., Vakulskas, C.A., Brady, K.M., and Yahr, T.L. (2008)** Characterization of ExsA and of ExsA-dependent promoters required for expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol* **68**: 657-671.
- Burrows, T.W. (1956)** An antigen determining virulence in *Pasteurella pestis*. *Nature* **177**: 426-427.
- Büttner, CR., Sorg, I., Cornelis, GR., Heinz, DW., and Niemann HH. (2008)** Structure of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion translocator chaperone SycD. *J Mol Biol.* **375** : 997-1012.
- Casadevall, A., Dadachova, E., and Pirofski, L.A. (2004)** Passive antibody therapy for infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2**: 695-703.
- Chicurel, M. (2000)** Bacterial biofilms and infections. Slimebusters. *Nature* **408**: 284-286.
- Chuanchuen, R., Narasaki, C.T., and Schweizer, H.P. (2002)** Benchtop and microcentrifuge preparation of *Pseudomonas aeruginosa* competent cells. *Biotechniques* **33**: 760, 762-763.
- Cole, S.T., and Buchrieser, C. (2001)** Bacterial genomics. A plague o' both your hosts. *Nature* **413**: 467, 469-470.
- Cordes, F.S., Komoriya, K., Larquet, E., Yang, S., Egelman, E.H., Blocker, A., and Lea, S.M. (2003)** Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *J Biol Chem* **278**: 17103-17107.
- Cornelis, G.R. (2002)** The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 742-752.
- Cornelis, G.R. (2006)** The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**: 811-825.
- Dacheux, D., Attree, I., Schneider, C., and Toussaint, B. (1999)** Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system. *Infect Immun* **67**: 6164-6167.
- Dacheux, D., Goure, J., Chabert, J., Usson, Y., and Attree, I. (2001)** Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Mol Microbiol* **40**: 76-85.
- Darboe, N., Kenjale, R., Picking, W.L., Picking, W.D., and Middaugh, C.R. (2006)** Physical characterization of MxiH and PrgI, the needle component of the type III secretion apparatus from *Shigella* and *Salmonella*. *Protein Sci* **15**: 543-552.
- Dasgupta, N., Lykken, G.L., Wolfgang, M.C., and Yahr, T.L. (2004)** A novel anti-activator mechanism regulates expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol* **53**: 297-308.
- Davis, A.J., and Meccas, J. (2007)** Mutations in the *Yersinia pseudotuberculosis* type III secretion system needle protein, YscF, that specifically abrogate effector translocation into host cells. *J Bacteriol* **189**: 83-97.

- Day, J.B., Ferracci, F., and Plano, G.V. (2003)** Translocation of YopE and YopN into eukaryotic cells by *Yersinia pestis* *yopN*, *tyeA*, *syncN*, *yscB* and *lcrG* deletion mutants measured using a phosphorylatable peptide tag and phosphospecific antibodies. *Mol Microbiol* **47**: 807-823.
- Deane, J.E., Roversi, P., Cordes, F.S., Johnson, S., Kenjale, R., Daniell, S., Booy, F., Picking, W.D., Picking, W.L., Blocker, A.J., and Lea, S.M. (2006)** Molecular model of a type III secretion system needle: Implications for host-cell sensing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 12529-12533.
- DeBord, K.L., Anderson, D.M., Marketon, M.M., Overheim, K.A., DePaolo, R.W., Ciletti, N.A., Jabri, B., and Schneewind, O. (2006)** Immunogenicity and protective immunity against bubonic plague and pneumonic plague by immunization of mice with the recombinant V10 antigen, a variant of LcrV. *Infect Immun* **74**: 4910-4914.
- De Carlo, S., Boisset, N., and Hoenger, A. (2007)** High-resolution single-particle 3D analysis on GroEL prepared by cryo-negative staining. *Micron*.
- Delahay, R.M., and Frankel, G. (2002)** Coiled-coil proteins associated with type III secretion systems: a versatile domain revisited. *Mol Microbiol* **45**: 905-916.
- Dennis, D.T., and Hughes, J.M. (1997)** Multidrug resistance in plague. *N Engl J Med* **337**: 702-704.
- Derewenda, U., Mateja, A., Devedjiev, Y., Rutzahn, K.M., Evdokimov, A.G., Derewenda, Z.S., and Waugh, D.S. (2004)** The structure of *Yersinia pestis* V-antigen, an essential virulence factor and mediator of immunity against plague. *Structure* **12**: 301-306.
- Doring, G., and Pier, G.B. (2008)** Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine* **26**: 1011-1024.
- Edqvist, P.J., Broms, J.E., Betts, H.J., Forsberg, A., Pallen, M.J., and Francis, M.S. (2006)** Tetratricopeptide repeats in the type III secretion chaperone, LcrH: their role in substrate binding and secretion. *Mol Microbiol* **59**: 31-44.
- Erskine, P.T., Knight, M.J., Ruaux, A., Mikolajek, H., Wong Fat Sang, N., Withers, J., Gill, R., Wood, S.P., Wood, M., Fox, G.C., and Cooper, J.B. (2006)** High resolution structure of BipD: an invasion protein associated with the type III secretion system of *Burkholderia pseudomallei*. *J Mol Biol* **363**: 125-136.
- Eser, M. & Ehrmann, M. (2003).** SecA-dependent quality control of intracellular protein localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13231-13234.
- Espina, M., Ausar, S.F., Middaugh, C.R., Picking, W.D., and Picking, W.L. (2006a)** Spectroscopic and calorimetric analyses of invasion plasmid antigen D (IpaD) from *Shigella flexneri* reveal the presence of two structural domains. *Biochemistry* **45**: 9219-9227.
- Espina, M., Olive, A.J., Kenjale, R., Moore, D.S., Ausar, S.F., Kaminski, R.W., Oaks, E.V., Middaugh, C.R., Picking, W.D., and Picking, W.L. (2006b)** IpaD localizes to the tip of the type III secretion system needle of *Shigella flexneri*. *Infect Immun* **74**: 4391-4400.
- Espina, M., Ausar, S.F., Middaugh, C.R., Baxter, M.A., Picking, W.D., and Picking, W.L. (2007)** Conformational stability and differential structural analysis of LcrV, PcrV, BipD, and SipD from type III secretion systems. *Protein Sci* **16**: 704-714.

- Faudry, E., Vernier, G., Neumann, E., Forge, V., and Attree, I. (2006)** Synergistic pore formation by type III toxin translocators of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **45**: 8117-8123.
- Faudry, E., Job, V., Dessen, A., Attree, I., and Forge, V. (2007)** Type III secretion system translocator has a molten globule conformation both in its free and chaperone-bound forms. *Febs J* **274**: 3601-3610.
- Fields, K.A., Nilles, M.L., Cowan, C., and Straley, S.C. (1999)** Virulence role of V antigen of *Yersinia pestis* at the bacterial surface. *Infect Immun* **67**: 5395-5408.
- Filloux, A., Michel, G. & Bally, M. (1998)**. GSP-dependent protein secretion in gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **22**, 177-198.
- Filloux, A., and Vallet, I. (2003)** [Biofilm: set-up and organization of a bacterial community]. *Med Sci (Paris)* **19**: 77-83.
- Francis, M.S., Lloyd, S.A., and Wolf-Watz, H. (2001)** The type III secretion chaperone LcrH co-operates with YopD to establish a negative, regulatory loop for control of Yop synthesis in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* **42**: 1075-1093.
- Frank, D.W., Vallis, A., Wiener-Kronish, J.P., Roy-Burman, A., Spack, E.G., Mullaney, B.P., Megdoud, M., Marks, J.D., Fritz, R., and Sawa, T. (2002)** Generation and characterization of a protective monoclonal antibody to *Pseudomonas aeruginosa* PcrV. *J Infect Dis* **186**: 64-73.
- Frithz-Lindsten, E., Holmstrom, A., Jacobsson, L., Soltani, M., Olsson, J., Rosqvist, R., and Forsberg, A. (1998)** Functional conservation of the effector protein translocators PopB/YopB and PopD/YopD of *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* **29**: 1155-1165.
- Galan, J.E., and Wolf-Watz, H. (2006)** Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**: 567-573.
- Galan, J.E. (2008)** Energizing type III secretion machines: what is the fuel? *Nat Struct Mol Biol* **15**: 127-128.
- Galimand, M., Guiyoule, A., Gerbaud, G., Rasoamanana, B., Chanteau, S., Carniel, E., and Courvalin, P. (1997)** Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. *N Engl J Med* **337**: 677-680.
- Galvan, E.M., Lasaro, M.A., and Schifferli, D.M. (2008)** Capsular antigen fraction 1 and Pla modulate the susceptibility of *Yersinia pestis* to pulmonary antimicrobial peptides such as cathelicidin. *Infect Immun* **76**: 1456-1464.
- Gebus, C., Faudry, E., Bohn, Y.S., Elsen, S., and Attree, I. (2008)** Oligomerization of PcrV and LcrV, protective antigens of *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia pestis*. *J Biol Chem*.
- Gerlach, R. G. & Hensel, M. (2007)**. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol* **297**, 401-415.
- Gophna, U., Ron, E.Z., and Graur, D. (2003)** Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* **312**: 151-163.
- Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D.I., and Metz, F. (1999)** ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**: 305-308.
- Goure, J., Pastor, A., Faudry, E., Chabert, J., Dessen, A., and Attree, I. (2004)** The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes. *Infect Immun* **72**: 4741-4750.

- Goure, J., Broz, P., Attree, O., Cornelis, G.R., and Attree, I. (2005)** Protective anti-V antibodies inhibit *Pseudomonas* and *Yersinia* translocon assembly within host membranes. *J Infect Dis* **192**: 218-225.
- Guiyoule, A., Gerbaud, G., Buchrieser, C., Galimand, M., Rahalison, L., Chanteau, S., Courvalin, P., and Carniel, E. (2001)** Transferable plasmid-mediated resistance to streptomycin in a clinical isolate of *Yersinia pestis*. *Emerg Infect Dis* **7**: 43-48.
- Ha, U.H., Kim, J., Badrane, H., Jia, J., Baker, H.V., Wu, D., and Jin, S. (2004)** An in vivo inducible gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes an anti-ExsA to suppress the type III secretion system. *Mol Microbiol* **54**: 307-320.
- Hahn, H. P. (1997)**. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*--a review. *Gene* **192**, 99-108.
- Hakansson, S., Schesser, K., Persson, C., Galyov, E.E., Rosqvist, R., Homble, F., and Wolf-Watz, H. (1996)** The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *Embo J* **15**: 5812-5823.
- Hamad, M.A., and Nilles, M.L. (2007)** Structure-function analysis of the C-terminal domain of LcrV from *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **189**: 6734-6739.
- Hamze, M., Dabboussi, F., and Izard, D. (2004)** [A 4-year study of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to antibiotics (1998-2001) in northern Lebanon]. *Med Mal Infect* **34**: 321-324.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. & Ala'Aldeen, D. (2004)**. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 692-744.
- Hermant, D., Ménard, R., Arricau, N., Parsot, C., and Popoff, MY. (1995)** Functional conservation of the *Salmonella* and *Shigella* effectors of entry into epithelial cells. *Mol Microbiol.* **4** : 781-789.
- Hill, J., Leary, S.E., Griffin, K.F., Williamson, E.D., and Titball, R.W. (1997)** Regions of *Yersinia pestis* V antigen that contribute to protection against plague identified by passive and active immunization. *Infect Immun* **65**: 4476-4482.
- Hill, J., Eyles, J.E., Elvin, S.J., Healey, G.D., Lukaszewski, R.A., and Titball, R.W. (2006)** Administration of antibody to the lung protects mice against pneumonic plague. *Infect Immun* **74**: 3068-3070.
- Hirakata, Y., Srikumar, R., Poole, K., Gotoh, N., Suematsu, T., Kohno, S., Kamihira, S., Hancock, R.E., and Speert, D.P. (2002)** Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Exp Med* **196**: 109-118.
- Hogardt, M., Roeder, M., Schreff, A.M., Eberl, L., and Heesemann, J. (2004)** Expression of *Pseudomonas aeruginosa* *exoS* is controlled by quorum sensing and RpoS. *Microbiology* **150**: 843-851.
- Hoiczyk, E., and Blobel, G. (2001)** Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4669-4674.
- Holmstrom, A., Olsson, J., Cherepanov, P., Maier, E., Nordfelth, R., Pettersson, J., Benz, R., Wolf-Watz, H., and Forsberg, A. (2001)** LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol Microbiol* **39**: 620-632.

- Ide, T., Laarmann, S., Greune, L., Schillers, H., Oberleithner, H., and Schmidt, M.A. (2001)** Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **3**: 669-679.
- Imberty, A., wimmerova, M., Mitchell, E.P., and Gilboa-Garber, N. (2004)** Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insight into the molecular basis for host glycan recognition. *Microbes Infect* **6**: 221-228.
- Johnson, S., Roversi, P., Espina, M., Olive, A., Deane, J.E., Birket, S., Field, T., Picking, W.D., Blocker, A.J., Galyov, E.E., Picking, W.L., and Lea, S.M. (2007)** Self-chaperoning of the type III secretion system needle tip proteins IpaD and BipD. *J Biol Chem* **282**: 4035-4044.
- Journet, L., Agrain, C., Broz, P., and Cornelis, G.R. (2003)** The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science* **302**: 1757-1760.
- Kenjale, R., Wilson, J., Zenk, S.F., Saurya, S., Picking, W.L., Picking, W.D., and Blocker, A. (2005)** The needle component of the type III secretion system of *Shigella* regulates the activity of the secretion apparatus. *J Biol Chem* **280**: 42929-42937
- Kipnis, E., Sawa, T., and Wiener-Kronish, J. (2006a)** Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect* **36**: 78-91.
- Kirisits, M.J., and Parsek, M.R. (2006b)** Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities? *Cell Microbiol* **8**: 1841-1849.
- Kolter, R., and Losick, R. (1998)** One for all and all for one. *Science* **280**: 226-227.
- Koronakis, V., Eswaran, J., and Hughes, C. (2004)** Structure and function of TolC : the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu Rev Biochem* **73** : 467-489.
- Kostakioti, M., Newman, C. L., Thanassi, D. G. & Stathopoulos, C. (2005).** Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. *J Bacteriol* **187**, 4306-4314.
- Koushik, P., Erhardt, M., Hirano, T., Blair, D., and Hughes KT. (2008)** Energy source of flagellar type III secretion. *Nature* **451** : 489-493.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J.E., and Aizawa, S.I. (1998)** Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**: 602-605.
- Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, SI., Galan, JE. (2000)** Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA* **18** : 10225-10230.
- Lahteenmaki, K., Kuusela, P., and Korhonen, T.K. (2001)** Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 531-552.
- Lamont, I.L., Beare, P.A., Ochsner, U., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (2002)** Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 7072-7077.
- Laudet, B., Prudent, R., Filhol, O., and Cochet, C. (2007)** [Therapeutic agents targeting protein-protein interactions: myth or reality?]. *Med Sci (Paris)* **23**: 273-278.
- Lawton, D.G., Longstaff, C., Wallace, B.A., Hill, J., Leary, S.E., Titball, R.W., and Brown, K.A. (2002)** Interactions of the type III secretion pathway proteins LcrV and LcrG from *Yersinia pestis* are mediated by coiled-coil domains. *J Biol Chem* **277**: 38714-38722.

- Le Berre, R., Faure, K., Nguyen, S., Pierre, M., Ader, F., and Guery, B. (2006)** [Quorum sensing: a new clinical target for *Pseudomonas aeruginosa*?]. *Med Mal Infect* **36**: 349-357.
- Libonati, M., and Gotte, G. (2004)** Oligomerization of bovine ribonuclease A: structural and functional features of its multimers. *Biochem J* **380**: 311-327.
- Liu, F., Chen, H., Galvan, E.M., Lasaro, M.A., and Schifferli, D.M. (2006)** Effects of Psa and F1 on the adhesive and invasive interactions of *Yersinia pestis* with human respiratory tract epithelial cells. *Infect Immun* **74**: 5636-5644.
- Ludtke, S.J., Chen, D.H., Song, J.L., Chuang, D.T., and Chiu, W. (2004)** Seeing GroEL at 6 Å resolution by single particle electron cryomicroscopy. *Structure* **12**: 1129-1136.
- Luo, Y., Bertero, M.G., Frey, E.A., Pfuetzner, R.A., Wenk, M.R., Creagh, L., Marcus, S.L., Lim, D., Sicheri, F., Kay, C., Haynes, C., Finlay, B.B., and Strynadka, N.C. (2001)** Structural and biochemical characterization of the type III secretion chaperones CesT and SigE. *Nat Struct Biol* **8**: 1031-1036.
- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., and Pier, G.B. (2000)** Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* **2**: 1051-1060.
- Ma, Q., Zhai, Y., Schneider, J. C., Ramseier, T. M. & Saier, M. H., Jr. (2003).** Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P fluorescens*. *Biochim Biophys Acta* **1611**, 223-233.
- Markham, A.P., Birket, S.E., Picking, W.D., Picking, W.L., and Middaugh, C.R. (2008)** pH sensitivity of type III secretion system tip proteins. *Proteins* **71**: 1830-1842.
- Marlovits, T.C., Kubori, T., Sukhan, A., Thomas, D.R., Galan, J.E., and Unger, V.M. (2004)** Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science* **306**: 1040-1042.
- Marlovits, T.C., Kubori, T., Lara-Tejero, M., Thomas, D., Unger, V.M., and Galan, J.E. (2006)** Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. *Nature* **441**: 637-640.
- Matson, J.S., and Nilles, M.L. (2001)** LcrG-LcrV interaction is required for control of Yops secretion in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **183**: 5082-5091.
- Mattick, J. S., Whitchurch, C. B. & Alm, R. A. (1996).** The molecular genetics of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*--a review. *Gene* **179**, 147-155.
- Mattick, J.S. (2002)** Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* **56**: 289-314.
- Menard, R., Sansonetti, P., and Parsot, C. (1994)** The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD. *Embo J* **13**: 5293-5302.
- Minamino, T., and Namba, K. (2008)** Distinct roles of the FliI ATPase and the proton motive force in bacterial flagellar protein export. *Nature* **451** : 485-489.
- Moriya, N., Minamino, T., Hughes, K.T., Macnab, R.M., and Namba, K. (2006)** The type III flagellar export specificity switch is dependent on FliK ruler and a molecular clock. *J Mol Biol* **359** : 466-477.
- Mota, L.J., Journet, L., Sorg, I., Agrain, C., and Cornelis, G.R. (2005)** Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Science* **307**: 1278.
- Motin, V.L., Nakajima, R., Smirnov, G.B., and Brubaker, R.R. (1994)** Passive immunity to *yersiniae* mediated by anti-recombinant V antigen and protein A-V antigen fusion peptide. *Infect Immun* **62**: 4192-4201.

- Mougous, J. D., Cuff, M. E., Raunser, S. & other authors (2006).** A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* **312**, 1526-1530.
- Mougous, J. D., Gifford, C. A., Ramsdell, T. L. & Mekalanos, J. J. (2007).** Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Cell Biol* **9**, 797-803.
- Mueller, C.A., Broz, P., Muller, S.A., Ringler, P., Erne-Brand, F., Sorg, I., Kuhn, M., Engel, A., and Cornelis, G.R. (2005)** The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science* **310**: 674-676.
- Mueller, C.A., Broz, P., and Cornelis, G.R. (2008)** The type III secretion system tip complex and translocon. *Mol Microbiol* **68**: 1085-1095.
- Muller, S.A., Pozidis, C., Stone, R., Meesters, C., Chami, M., Engel, A., Economou, A., and Stahlberg, H. (2006)** Double hexameric ring assembly of the type III protein translocase ATPase HrcN. *Mol Microbiol* **61**: 119-125.
- Nanao, M., Ricard-Blum, S., Di Guilmi, A.M., Lemaire, D., Lascoux, D., Chabert, J., Attree, I., and Dessen, A. (2003)** Type III secretion proteins PcrV and PcrG from *Pseudomonas aeruginosa* form a 1:1 complex through high affinity interactions. *BMC Microbiol* **3**: 21.
- Nedialkov, Y.A., Motin, V.L., and Brubaker, R.R. (1997)** Resistance to lipopolysaccharide mediated by the *Yersinia pestis* V antigen-polyhistidine fusion peptide: amplification of interleukin-10. *Infect Immun* **65**: 1196-1203.
- Neely, A.N., Holder, I.A., Wiener-Kronish, J.P., and Sawa, T. (2005)** Passive anti-PcrV treatment protects burned mice against *Pseudomonas aeruginosa* challenge. *Burns* **31**: 153-158.
- Neyt, C., and Cornelis, G.R. (1999)** Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. *Mol Microbiol* **33**: 971-981.
- Nilles, M.L. (2004)** Dissecting the structure of LcrV from *Yersinia pestis*, a truly unique virulence protein. *Structure* **12**: 357-358.
- Nunn, D., Bergman, S. & Lory, S. (1990).** Products of three accessory genes, *pilB*, *pilC*, and *pilD*, are required for biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pili. *J Bacteriol* **172**, 2911-2919.
- Olive, A.J., Kenjale, R., Espina, M., Moore, D.S., Picking, W.L., and Picking, W.D. (2007)** Bile salts stimulate recruitment of IpaB to the *Shigella flexneri* surface, where it colocalizes with IpaD at the tip of the type III secretion needle. *Infect Immun* **75**: 2626-2629.
- Osiecki, J.C., Barker, J., Picking, W.L., Serfis, A.B., Berring, E., Shah, S., Harrington, A., and Picking, W.D. (2001)** IpaC from *Shigella* and SipC from *Salmonella* possess similar biochemical properties but are functionally distinct. *Mol Microbiol* **42**: 469-481.
- Pallen, M.J., Beatson, S.A., and Bailey, C.M. (2005)** Bioinformatics, genomics and evolution of non-flagellar type-III secretion systems: a Darwinian perspective. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 201-229.

- Parkhill, J., Wren, B. W., Thomson, N. R. & other authors (2001).** Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* **413**, 523-527.
- Parkins, M.D., Ceri, H., and Storey, D.G. (2001)** *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Mol Microbiol* **40**: 1215-1226.
- Parsek, M.R., and Greenberg, E.P. (2000)** Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8789-8793.
- Pastor, A., Chabert, J., Louwagie, M., Garin, J., and Attree, I. (2005)** PscF is a major component of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion needle. *FEMS Microbiol Lett* **253**: 95-101.
- Payne, D., Tatham, D., Williamson, E.D., and Titball, R.W. (1998)** The pH 6 antigen of *Yersinia pestis* binds to beta1-linked galactosyl residues in glycosphingolipids. *Infect Immun* **66**: 4545-4548.
- Pederson, K.J., Krall, R., Riese, M.J., and Barbieri, J.T. (2002)** Intracellular localization modulates targeting of ExoS, a type III cytotoxin, to eukaryotic signalling proteins. *Mol Microbiol* **46**: 1381-1390.
- Perry, R.D., and Fetherston, J.D. (1997)** *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev* **10**: 35-66.
- Pettersson, J., Holmstrom, A., Hill, J., Leary, S., Frithz-Lindsten, E., von Euler-Matell, A., Carlsson, E., Titball, R., Forsberg, A., and Wolf-Watz, H. (1999)** The V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation. *Mol Microbiol* **32**: 961-976.
- Picking, W.L., Nishioka, H., Hearn, P.D., Baxter, M.A., Harrington, A.T., Blocker, A., and Picking, W.D. (2005)** IpaD of *Shigella flexneri* is independently required for regulation of Ipa protein secretion and efficient insertion of IpaB and IpaC into host membranes. *Infect Immun* **73**: 1432-1440.
- Pier, G.B., Grout, M., and Zaidi, T.S. (1997)** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 12088-12093.
- Pizarro-Cerda, J., and Cossart, P. (2006)** Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* **124**: 715-727.
- Prentice, M.B., and Rahalison, L. (2007)** Plague. *Lancet* **369**: 1196-1207.
- Price, S.B., Cowan, C., Perry, R.D., and Straley, S.C. (1991)** The *Yersinia pestis* V antigen is a regulatory protein necessary for Ca²⁺(+)-dependent growth and maximal expression of low-Ca²⁺ response virulence genes. *J Bacteriol* **173**: 2649-2657.
- Pugsley, A. P., Francetic, O., Possot, O. M., Sauvonnet, N. & Hardie, K. R. (1997).** Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative bacteria--a review. *Gene* **192**, 13-19.
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., Heidelberg, J. F. & Mekalanos, J. J. (2006).** Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1528-1533.
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Revel, A. T., Sturtevant, D. & Mekalanos, J. J. (2007).** Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 15508-15513.

- Quinaud, M., Chabert, J., Faudry, E., Neumann, E., Lemaire, D., Pastor, A., Elsen, S., Dessen, A., and Attree, I. (2005)** The PscE-PscF-PscG complex controls type III secretion needle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **280**: 36293-36300.
- Quinaud, M., Ple, S., Job, V., Contreras-Martel, C., Simorre, J.P., Attree, I., and Dessen, A. (2007)** Structure of the heterotrimeric complex that regulates type III secretion needle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 7803-7808.
- Remaut, H., and Waksman, G. (2004).** Structural biology of bacterial pathogenesis. *Curr Opin Struct Biol.* **14**: 161-170.
- Remaut, H., Tang, C., Henderson, N. S., Pinkner, J. S., Wang, T., Hultgren, S. J., Thanassi, D. G., Waksman, G. & Li, H. (2008).** Fiber formation across the bacterial outer membrane by the chaperone/usher pathway. *Cell* **133**, 640-652.
- Rietsch, A., Vallet-Gely, I., Dove, S.L., and Mekalanos, J.J. (2005)** ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 8006-8011.
- Rosqvist, R., Magnusson, K.E., and Wolf-Watz, H. (1994)** Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *Embo J* **13**: 964-972.
- Rousseau, F., Schymkowitz, J.W., and Itzhaki, L.S. (2003)** The unfolding story of three-dimensional domain swapping. *Structure* **11**: 243-251.
- Ruer, S., Stender, S., Filloux, A., and de Bentzmann, S. (2007)** Assembly of fimbrial structures in *Pseudomonas aeruginosa*: functionality and specificity of chaperone-usher machineries. *J Bacteriol* **189**: 3547-3555.
- Russel, M. (1998).** Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type II protein secretion systems. *J Mol Biol* **279**, 485-499.
- Sani, M., Botteaux, A., Parsot, C., Sansonetti, P., Boekema, E.J., and Allaoui, A. (2007)** IpaD is localized at the tip of the *Shigella flexneri* type III secretion apparatus. *Biochim Biophys Acta* **1770**: 307-311.
- Sato, H., Frank, D.W., Hillard, C.J., Feix, J.B., Pankhaniya, R.R., Moriyama, K., Finck-Barbancon, V., Buchaklian, A., Lei, M., Long, R.M., Wiener-Kronish, J., and Sawa, T. (2003)** The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *Embo J* **22**: 2959-2969.
- Sato, H., Feix, J.B., and Frank, D.W. (2006)** Identification of superoxide dismutase as a cofactor for the *pseudomonas* type III toxin, ExoU. *Biochemistry* **45**: 10368-10375.
- Sawa, T., Yahr, T.L., Ohara, M., Kurahashi, K., Gropper, M.A., Wiener-Kronish, J.P., and Frank, D.W. (1999)** Active and passive immunization with the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury. *Nat Med* **5**: 392-398.
- Sayner, S.L., Frank, D.W., King, J., Chen, H., VandeWaa, J., and Stevens, T. (2004)** Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. *Circ Res* **95**: 196-203.
- Scaife, R.M., Courtneidge, S.A., and Langdon, W.Y. (2003)** The multi-adaptor proto-oncoprotein Cbl is a key regulator of Rac and actin assembly. *J Cell Sci* **116**: 463-473.
- Schoehn, G., Di Guilmi, A.M., Lemaire, D., Attree, I., Weissenhorn, W., and Dessen, A. (2003)** Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*. *Embo J* **22**: 4957-4967.

- Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamano, K., Sasakawa, C., and Abe, A. (2001)** Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 11638-11643.
- Shaver, C.M., and Hauser, A.R. (2004)** Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun* **72**: 6969-6977.
- Sing, A., Roggenkamp, A., Geiger, A.M., and Heesemann, J. (2002)** *Yersinia enterocolitica* evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice. *J Immunol* **168**: 1315-1321.
- Smiley, S.T. (2008)** Current challenges in the development of vaccines for pneumonic plague. *Expert Rev Vaccines* **7**: 209-221.
- Sory, MP., Cornelis, GR. (1994)** Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol Microbiol* **3** : 583-594.
- Soscia, C., Hachani, A., Bernadac, A., Filloux, A., and Bleves, S. (2007)** Cross talk between type III secretion and flagellar assembly systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**: 3124-3132.
- Spangenberg, C., Heuer, T., Burger, C., and Tummeler, B. (1996)** Genetic diversity of flagellins of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett* **396**: 213-217.
- Stebbins, C.E., and Galan, J.E. (2001)** Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature* **414**: 77-81.
- Stebbins, C.E., and Galan, J.E. (2003)** Priming virulence factors for delivery into the host. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 738-743.
- Stevens, J.M., Galyov, E.E., and Stevens, M.P. (2006)** Actin-dependent movement of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* **4**: 91-101.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S., and Olson, M.V. (2000)** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.
- Sukhan, A., Kubori, T., Wilson, J., and Galan, JE (2001)** Genetic analysis of assembly of the *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* type III secretion-associated needle complex. *J Bacteriol* **183** : 1159-1167.
- Sun, J., and Barbieri, J.T. (2003)** *Pseudomonas aeruginosa* ExoT ADP-ribosylates CT10 regulator of kinase (Crk) proteins. *J Biol Chem* **278**: 32794-32800.
- Sundin, C., Hallberg, B., and Forsberg, A. (2004)** ADP-ribosylation by exoenzyme T of *Pseudomonas aeruginosa* induces an irreversible effect on the host cell cytoskeleton in vivo. *FEMS Microbiol Lett* **234**: 87-91.
- Swietnicki, W., Powell, B.S., and Goodin, J. (2005)** *Yersinia pestis* Yop secretion protein F: purification, characterization, and protective efficacy against bubonic plague. *Protein Expr Purif* **42**: 166-172.

- Tamano, K., Aizawa, S., Katayama, E., Nonaka, T., Imajoh-Ohmi, S., Kuwae, A., Nagai, S., and Sasakawa, C. (2000)** Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *Embo J* **19**: 3876-3887.
- Tardy, F., Homble, F., Neyt, C., Wattiez, R., Cornelis, G.R., Ruyschaert, J.M., and Cabiliaux, V. (1999)** *Yersinia enterocolitica* type III secretion-translocation system: channel formation by secreted Yops. *Embo J* **18**: 6793-6799.
- Thomas, N.A., Deng, W., Baker, N., Puente, J., and Finlay, B.B. (2007)** Hierarchical delivery of an essential host colonization factor in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **282**: 29634-29645.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994)** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.
- Torruellas, J., Jackson, M.W., Pennock, J.W., and Plano, G.V. (2005)** The *Yersinia pestis* type III secretion needle plays a role in the regulation of Yop secretion. *Mol Microbiol* **57**: 1719-1733.
- Toussaint, B., Delic-Attree, I., and Vignais, P.M. (1993)** *Pseudomonas aeruginosa* contains an IHF-like protein that binds to the algD promoter. *Biochem Biophys Res Commun* **196**: 416-421.
- Troisfontaines, P., and Cornelis, G.R. (2005)** Type III secretion: more systems than you think. *Physiology (Bethesda)* **20**: 326-339.
- Urbanowski, M.L., Brutinel, E.D., and Yahr, T.L. (2007)** Translocation of ExsE into Chinese hamster ovary cells is required for transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Infect Immun* **75**: 4432-4439.
- Vallet, I., Olson, J.W., Lory, S., Lazdunski, A., and Filloux, A. (2001)** The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6911-6916.
- Vallis, A.J., Finck-Barbancon, V., Yahr, T.L., and Frank, D.W. (1999)** Biological effects of *Pseudomonas aeruginosa* type III-secreted proteins on CHO cells. *Infect Immun* **67**: 2040-2044.
- Veenendaal, A.K., Hodgkinson, J.L., Schwarzer, L., Stabat, D., Zenk, S.F., and Blocker, A.J. (2007)** The type III secretion system needle tip complex mediates host cell sensing and translocon insertion. *Mol Microbiol* **63**: 1719-1730.
- Vendrely, C., Valadie, H., Bednarova, L., Cardin, L., Padeloup, M., Cappadoro, J., Bednar, J., Rinaudo, M., and Jamin, M. (2005)** Assembly of the full-length recombinant mouse prion protein I. Formation of soluble oligomers. *Biochim Biophys Acta* **1724**: 355-366
- Ventre, I., Goodman, A.L., Vallet-Gely, I., Vasseur, P., Soscia, C., Molin, S., Bleves, S., Lazdunski, A., Lory, S., and Filloux, A. (2006)** Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 171-176.
- Vollmer, W., Pils, H., Hantke, K., Holtje, J.V., and Braun, V. (1997)** Pesticin displays muramidase activity. *J Bacteriol* **179**: 1580-1583.

- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M. L., Lazdunski, A., Wu, L. F. & Filloux, A. (2001).** Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *Embo J* **20**, 6735-6741.
- Wall, D. & Kaiser, D. (1999).** Type IV pili and cell motility. *Mol Microbiol* **32**, 1-10.
- Wang, C.Y., Jerng, J.S., Chen, K.Y., Lee, L.N., Yu, C.J., Hsueh, P.R., and Yang, P.C. (2006)** Pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalised patients: clinical features, risk-factors and outcomes. *Clin Microbiol Infect* **12**: 63-68.
- West, N.P., Sansonetti, P., Mounier, J., Exley, R.M., Parsot, C., Guadagnini, S., Prevost, M.C., Prochnicka-Chalufour, A., Delepierre, M., Tanguy, M., and Tang, C.M. (2005)** Optimization of virulence functions through glucosylation of *Shigella* LPS. *Science* **307**: 1313-1317.
- Wilharm, G., Lehmann, V., Krauss, K., Lehnert, B., Richter, S., Ruckdeschel, K., Heesemann, J., and Trulzsch, K. (2004)** *Yersinia enterocolitica* type III secretion depends on the proton motive force but not on the flagellar motor components MotA and MotB. *Infect Immun* **72**: 4004-4009.
- Winans, S.C. (2002)** Bacterial esperanto. *Nat Struct Biol* **9**: 83-84.
- Wolfgang, M.C., Lee, V.T., Gilmore, M.E., and Lory, S. (2003)** Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway. *Dev Cell* **4**: 253-263.
- Wu, W., and Jin, S. (2005)** PtrB of *Pseudomonas aeruginosa* suppresses the type III secretion system under the stress of DNA damage. *J Bacteriol* **187**: 6058-6068.
- Yahr, T.L., Vallis, A.J., Hancock, M.K., Barbieri, J.T., and Frank, D.W. (1998)** ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13899-13904.
- Yahr, T.L., and Wolfgang, M.C. (2006)** Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol* **62**: 631-640.
- Yip, C.K., Finlay, B.B., and Strynadka, N.C. (2005)** Structural characterization of a type III secretion system filament protein in complex with its chaperone. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 75-81.
- Yip, C.K., and Strynadka, N.C. (2006)** New structural insights into the bacterial type III secretion system. *Trends Biochem Sci* **31**: 223-230.
- Yonekura, K., Maki-Yonekura, S., and Namba, K. (2003)** Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* **424**: 643-650.
- Young, G.M., Schmiel, D.H., and Miller, V.L. (1999)** A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6456-6461.
- Zavialov, A. V., Berglund, J., Pudney, A. F., Fooks, L. J., Ibrahim, T. M., MacIntyre, S. & Knight, S. D. (2003).** Structure and biogenesis of the capsular F1 antigen from *Yersinia pestis*: preserved folding energy drives fiber formation. *Cell* **113**, 587-596.
- Zhang, G., Campbell, E.A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., and Darst, S.A. (1999)** Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell* **98**: 811-824.
- Zheng, Z., Chen, G., Joshi, S., Brutinel, E.D., Yahr, T.L., and Chen, L. (2007)** Biochemical characterization of a regulatory cascade controlling transcription of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *J Biol Chem* **282**: 6136-6142.

Sixième partie

Annexe

Annexe I

Mesure du poids moléculaire des protéines par MALLS (Vendrely *et al.*, 2005)

Pour chacun des points du chromatogramme obtenu après passage sur la colonne de chromatographie d'exclusion de taille, la quantité de lumière diffusée est directement proportionnelle au produit de la concentration en protéine et de son poids moléculaire. Ces constatations sont en accord avec l'équation de Zimm, valable pour les solutions de polymères diluées :

$$\frac{R_{\theta}}{K^*C} = MP(\theta) - 2A_2CM^2P^2(\theta) \quad (1)$$

Dans cette équation, R_{θ} est la mesure de diffusion de la lumière selon l'angle θ (rapport de Rayleigh), C est la concentration en protéine en g.ml^{-1} , M est le poids moléculaire en g.mol^{-1} , $P(\theta)$ est le facteur prenant en compte la forme de la molécule et décrivant la dépendance angulaire de la lumière diffusée, et, A_2 est le second coefficient virial (caractéristique des interactions entre particules dans un système). K^* est une constante optique dont la valeur est déterminée par l'équation suivante :

$$K^* = \frac{1}{N_A} \left(\frac{2\pi n_0}{\lambda^2} \right)^2 \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \quad (2)$$

Dans cette équation, N_A est le nombre d'Avogadro, n_0 est l'index de réfraction du solvant à la longueur d'onde incidente du faisceau laser (1,333 pour un tampon aqueux), λ est la longueur d'onde du faisceau incident (690 nm) et dn/dc en ml.g^{-1} est l'index de réfraction spécifique du soluté. Pour les protéines, l'index de réfraction varie très peu en fonction de la longueur d'onde du faisceau incident (si celui-ci est supérieur à 500 nm) : pour cette étude, nous avons utilisé une valeur de dn/dc de $0,190 \text{ ml.g}^{-1}$ caractéristique des protéines.

Comme les particules protéiques sont petites, il est possible de simplifier l'équation (1). En effet, dans ces conditions, il n'y a pas de dépendance angulaire de la lumière diffusée vis à vis de la forme des molécules. Dans ce système, il est donc possible d'ajuster la valeur $P(\theta)$ à 1.

De même, les interactions entre les particules peuvent être considérées comme négligeables et la valeur de A_2 peut être ajustée à 0. L'équation (1) simplifiée peut donc s'écrire :

$$\frac{R_\theta}{K^*C} = M$$

La masse moléculaire des protéines peut donc être mesurée en chacun des points si sa concentration est connue.

Résumé

Pseudomonas aeruginosa et *Yersinia pestis* sont responsables d'infections graves chez les individus immunodéprimés et de la peste, respectivement. Leur pathogénicité repose sur de nombreux facteurs de virulence dont le système de sécrétion de type III (SST3). Il est composé d'une base ancrée dans la double membrane bactérienne, d'une aiguille creuse érigée à la surface et d'un pore de translocation inséré dans la membrane de la cellule hôte permettant à la bactérie d'y injecter des toxines. L'objet de cette thèse est l'étude de l'interactome de l'antigène protecteur V, PcrV chez *P. aeruginosa* et LcrV chez *Y. pestis*. Celui-ci est situé au sommet de l'aiguille et est nécessaire au processus de translocation des toxines. L'étude des propriétés biochimiques de la protéine *in vitro* nous a permis de mettre en évidence sa capacité à former des oligomères présentant une structure en forme d'anneaux. Les multimères ont été observés par chromatographie d'exclusion de taille, gel natif, spectrométrie de masse native et microscopie électronique à transmission. Leur formation est dépendante de la présence de l'hélice $\alpha 12$ de PcrV et de l'intégrité de ses résidus hydrophobes. Le processus d'assemblage de la protéine est nécessaire à sa fonction *in vivo* : des mutants qui sont incapables d'oligomériser perdent leur cytotoxicité envers les cellules eucaryotes.

Puis, l'interaction directe entre PcrV et la sous unité formant l'aiguille, PscF, a été mise en évidence *in vitro* par co-purification. De plus, deux mutants ponctuels de PscF dont le phénotype présente un défaut de translocation se sont montrés défectueux pour la liaison avec PcrV. Enfin, l'hélice C terminale de PscF est échangeable avec l'hélice $\alpha 12$ de PcrV comme l'atteste la capacité de polymérisation d'un hybride créé entre ces deux protéines, suggérant un rôle de celle-ci dans la formation du complexe F-V. L'ensemble de ces études montre que l'assemblage multimérique des antigènes V ainsi que leur position au sommet de l'aiguille sont des éléments essentiels à leur fonction, avec un rôle prépondérant de l'hélice $\alpha 12$ de PcrV. Ces conclusions pourraient permettre de mieux cibler les développements futurs de nouveaux vaccins ou agents antimicrobiens.

Mots clés : *P. aeruginosa* et *Y. pestis*, facteur de virulence, SST3, Antigènes V (PcrV, LcrV), oligomérisation, assemblage, injectisome, cible thérapeutique.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa can cause severe infections in immunocompromised patients, and *Yersinia pestis* is the causative agent of plague. Both bacteria rely on numerous virulence factors including a common type III secretion system (T3SS). It is composed of a basal body anchored in the bacterial bilayer membrane and a hollow needle assembled at the cell surface. The effector molecules are directly injected into the target cells *via* a translocation pore inserted into the host cell membrane. The aim of this study is to determine the interactome of the protective V antigens PcrV in *P. aeruginosa* and LcrV in *Y. pestis*. Both are localised at the tip of type III needles being essential for the translocation process. Biochemical studies *in vitro* showed that V proteins are able to form oligomeric ring like structures which were characterised by size exclusion chromatography, native gel, native mass spectrometry and transmission electronic microscopy. Moreover, the multimerization depends on the hydrophobic residues within the $\alpha 12$ helix. The fact that the strains expressing the mutant proteins incapable of oligomerizing are non-cytotoxic toward macrophages supports the idea that oligomerization is required for the proper function of the V antigens.

Next, direct interaction between PcrV and the needle forming subunit, PscF, was demonstrated by co-purification *in vitro*. Moreover, two PscF mutants exhibiting a translocation defect were shown to be incapable of forming a stable translocation complex. Lastly, the fact that the C terminal α helix of PscF can be exchanged by the $\alpha 12$ helix of PcrV resulting in an hybrid protein that can polymerise, suggests that this helix may be necessary for the formation of the complex. Taken together, these studies show that the assembly of the multimeric V proteins as well as their tip location are essential for their functions with the $\alpha 12$ helix of PcrV playing a major role. These conclusions could be of great importance for the future development of new vaccines and antimicrobials.

Key words : *P. aeruginosa* and *Y. pestis*, virulence factor, T3SS, V antigens (PcrV, LcrV), oligomerisation, assembly, injectisome, therapeutic target.