



Dissection des interactions entre les composants du système de sécrétion de type II chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*)

Mathilde Lallemand

► To cite this version:

Mathilde Lallemand. Dissection des interactions entre les composants du système de sécrétion de type II chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*). Sciences agricoles. INSA de Lyon, 2011. Français. NNT : 2011ISAL0001 . tel-00665584

HAL Id: tel-00665584

<https://theses.hal.science/tel-00665584>

Submitted on 2 Feb 2012

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.

Thèse

**Dissection des interactions entre les
composants du système de sécrétion de type II
chez la bactérie phytopathogène *Erwinia
chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*).**

Présentée devant
L'institut national des sciences appliquées de Lyon

Pour obtenir
Le grade de docteur

École doctorale : École doctorale Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation
Spécialité Microbiologie Moléculaire

Par
Mathilde Lallemand

Directeur de thèse : Vladimir SHEVCHIK

Soutenue le 10 Janvier 2010 devant la Commission d'examen

Jury :

Examineur	M. P. LEJEUNE	Professeur (INSA de Lyon)
Rapporteur	Mme S. BLEVES	Maître de conférence (CNRS)
Rapporteur	Mme O. FRANCETIC	Chargée de recherche (Institut Pasteur)
Rapporteur	M. C. GRANGEASSE	Directeur de recherche (CNRS)
Directeur de thèse	M. V. SHEVCHIK	Directeur de recherche (CNRS)

Laboratoire de recherche : UMR 5240 Microbiologie, Adaptation et Pathogénie

Sommaire

Liste des abréviations.....	- 5 -
Listes des figures et tableaux	- 6 -
Introduction bibliographique	- 14 -
I. La bactérie phytopathogène <i>Erwinia chrysanthemi</i>	- 16 -
I.A) Taxonomie.....	- 16 -
I. B) Aspects généraux de la pathogénie.....	- 16 -
I.C) Mécanisme principal de la pathogénie	- 18 -
I.C.1) Structure de la paroi végétale	- 18 -
I.C.2) Les enzymes dégradatives	- 20 -
I.C.3) Une dégradation étape par étape.....	- 22 -
I.C.3.1) Les enzymes extracellulaires	- 22 -
I.C.3.2) Les enzymes périplasmiques	- 24 -
I.C.3.3) Les enzymes cytoplasmiques.....	- 24 -
I.C.3.4) Les enzymes peu ou pas caractérisées.....	- 26 -
La sécrétion par le système de sécrétion de type II.....	- 28 -
II. La première étape : l'exportation à travers la membrane interne.....	- 28 -
II.A) Le passage de la membrane interne par le système Sec.....	- 28 -
II.A.1) L'adressage des protéines à exporter par le système Sec.....	- 30 -
II.A.2) Le passage par le translocon Sec.....	- 32 -
II.B) Le passage de la membrane cytoplasmique par le système Tat	- 38 -
II.B.1) L'adressage des protéines à exporter par Tat	- 38 -
	- 0 -

II.B.2) Le passage par le système Tat	- 40 -
III. Le système de sécrétion de type II : la translocation à travers la membrane externe	- 44 -
III. A) Généralités	- 44 -
III. A. 1) Répartition chez les bactéries à Gram négatif.....	- 44 -
III. A.2) Rôle des systèmes de sécrétion de type II.....	- 46 -
III. A. 3) Localisation du T2SS.....	- 48 -
III. B) Les composants de la machinerie de sécrétion	- 50 -
III. B. 1) La sécrétine GspD et sa pilotine GspS.....	- 51 -
III. B.1.1) La sécrétine : pore de la membrane externe.....	- 52 -
III.B.1.2) La pilotine GspS	- 58 -
III. B. 2) Le pseudopilus	- 60 -
III.B.2.1) Précurseurs de pseudopilines et prépiline peptidase	- 60 -
III. B. 2.2) La pseudopiline majeure	- 62 -
III.B.2.3) Les pseudopilines mineures	- 66 -
III.B.3) Les protéines associées ou intégrales de la membrane interne	- 70 -
III.B.3.1) L'ATPase GspE : fournisseur d'énergie	- 70 -
La plateforme de la membrane interne	- 75 -
III.B.3.2) GspF	- 76 -
III.B.3.3) GspC	- 78 -
III.B.3.4) GspL et GspM.....	- 90 -
III.B.4) Les protéines accessoires GspN, GspA et GspB	- 100 -
III.C) La spécificité des systèmes	- 104 -
III.C.1) Les exoprotéines	- 104 -
III.C.2) GspC et GspD : gardiens de la spécificité ?	- 110 -
IV. Parallèle avec les systèmes de biogénèse des pili de type IV	- 116 -

IV.A) Fonctions des pili de type IV	116 -
IV. B) Architecture de la machinerie de biogénèse des T4Pa	120 -
IV.B.1) Le pilus	120 -
IV.B.2) La sécrétine et sa pilotine.....	126 -
IV.B.3) Les ATPases du système	128 -
IV.B.4) Les protéines de la membrane interne des T4P	134 -
Matériels et Méthodes	146 -
A) Plasmides, souches et conditions de culture	146 -
B) Double-hybride bactérien.....	146 -
C) Double-hybride bactérien adapté à l'étude des TMS.....	150 -
D) Création du mutant d'outM d'E. chrysanthemi	150 -
E) Analyse d'une localisation correcte des protéines bitopiques dans la membrane interne par accessibilité aux protéases.....	153
F) GST pull-down.....	156 -
Résultats	158 -
Chapitre I : étude des interactions entre OutC, OutM et OutL par double-hybride bactérien	159
I.A) Homodimérisation entre les protéines entières OutC, OutM et OutLΔc par double-hybride bactérien	162 -
I. A. 1) Homodimérisation d'OutC	162 -
I. A.. 2) Homodimérisation d'OutM	163 -
I. A. 3) Homodimérisation d'OutLΔc	165 -
I. B) Interactions entre OutC, OutLΔc et OutM	167 -
I. B. 1) Interaction d'OutLΔc et OutM	168 -
I. B. 2) Interaction d'OutC et OutLΔc	168 -
I.B.3) Interaction d'OutC et OutM	170 -
I. C) Discussion et conclusion	170 -
	- 2 -

Chapitre II : étude des interactions entre les régions périplasmiques d'OutC, OutL et OutM	- 180 -
II. A) Interactions entre les régions périplasmiques d'OutC, OutL et OutM en double-hybride bactérien	- 180 -
II. A.1) Homodimérisation des régions périplasmiques d'OutC, OutL et OutM.....	- 180 -
II.A.2) Interactions entre les régions périplasmiques des trois protéines	- 182 -
II. B) Dissection des interactions décelées avec OutL _{péri} et OutM _{péri} : raccourcissement des régions périplasmiques	- 184 -
II.B.1) Rôle du domaine de type ferrédoxine dans les interactions d'OutL et OutM	- 186 -
II. B.2) Etude de la courte partie de la région périplasmique d'OutL dépourvue du domaine de type ferrédoxine	- 192 -
II.C) Etude de la compatibilité des interactions entre les régions périplasmiques d'OutL et OutM	- 196 -
II.C. 1) Mise au point d'un triple-hybride bactérien	- 198 -
II.C.2) Triple fusion avec la GST	- 200 -
II.C.3) Etude de l'homodimérisation d'OutM dans un mutant outM d'E. chrysanthemi. -	202 -
II.D) Discussion et conclusion.....	- 206 -
Chapitre III : études des interactions entre les segments transmembranaires d'OutC, OutL et OutM par adaptation de la technique du double-hybride bactérien	- 221 -
III.A) Localisation des triples fusions.....	- 224 -
III. A. 1) Vérification de la localisation des triples fusions par les tests de résistance à l'ampicilline.....	- 224 -
III. A. 2) Vérification de la localisation des triples fusions par accessibilité à la protéolyse dans les sphéroplastes.....	- 226 -
III.B) Etude des interactions entre segments transmembranaires en double-hybride bactérien	- 228 -
III. B. 1) TMS d'OutC, OutM et OutL.....	- 230 -
III. B. 1. 1) Les TMS d'OutC, OutM et OutL sont-ils impliqués dans l'homodimérisation ?... -	230 -
III. B. 1. 2) Interactions entre les segments transmembranaires d'OutC, OutM et OutL -	232 -

III. B. 2) Test de fiabilité de la technique du DHB adapté aux études de TMS.....	- 234 -
III. B. 2. 1) Utilisation du TMS de la glycophorine A.....	- 234 -
III. B. 2. 2) Utilisation du TMS de TetA	- 236 -
III. B. 3) Application de la technique : étude d'un mutant d'OutC	- 238 -
III. B. 4) Discussion et conclusion.....	- 244 -
Chapitre IV : étude du phénomène de dissociation du complexe OutCpéri/ OutDpéri par OutLpéri.....	- 263 -
IV.A) Phénomène en double-hybride bactérien.....	- 264 -
IV. A. 1) Premières observations	- 264 -
IV. A. 2) Précision de la région d'OutLpéri impliquée	- 266 -
IV. A. 3) OutLpéri a-t-elle un effet sur OutCpéri ou sur OutDpéri ?	- 270 -
IV.B) Phénomène en pull-down	- 272 -
IV.C) Discussion et conclusion.....	- 276 -
Chapitre V : Construction de dérivés d'OutL et d'OutM pour une analyse structurale. -	- 279 -
V. A) Principe de la cristallographie aux rayons X et de la RMN	- 280 -
V.B) Co-purification des régions périplasmiques d'OutL et d'OutM	- 282 -
V.B.1) Approches choisies pour la co-purification d'OutLpéri et outMpéri.....	- 282 -
V.B.2) Résultats de la co-purification des fusions GST::OutLpéri et GST::OutMpéri	- 284 -
V.C) Conclusion et discussion.....	- 286 -
Perspectives	- 288 -
Références bibliographiques	- 294 -

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
Amp	Ampicilline
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AMP-PNP	5'-adenylyl- β , γ -imidodiphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
bp	Paire de bases
CAP	Catabolite activator protein
Cm	Chloramphénicol
CMC	Carboxyméthyl cellulose
Cya::OutX	Fusions des protéines Out correspondantes avec l'une des sous-unités de Cya, T18 ou T25
Da	Dalton
DHB	Double-hybride bactérien
DKI	5-céto-4-désoxyuronate
DKII	2,5-dicéto-désoxygluconate
EDTA	Acide éthylènediamine tétra-acétique
GST	Glutathion S-Transferase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
KDG	2-céto-3-désoxygluconate
Km	Kanamycine
LB	Luria-Bertani
OEPP	Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes
ONP	Orthonitrophenol
ONPG	Orthonitrophényl- β -D-galactopyranoside
OutXpéri	Région périplasmique d'une protéine membranaire Out
PCR	Polymerase chain reaction
PGA	Polygalacturonate
PMSF	Phenylmethyl-sulphonyl fluoride
RMSD	Root mean square deviation (écart quadratique moyen entre deux structures)
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
T2SS	Système de sécrétion de type II
T4P	Pili de type IV
TMS	Segment transmembranaire
UA	Unité arbitraire
WB	Western-blot

Listes des figures et tableaux

Introduction bibliographique

Côté de la page

Figure 1 : Dégradation des tissus végétaux par <i>Erwinia chrysanthemi</i> (<i>Dickeya dadantii</i>)	14
Figure 2 : Représentation schématique de la structure de la pectine des parois végétales.	15
Figure 3 : Voie de dégradation et d'assimilation de la pectine	16
Figure 4 : Comparaison schématique des peptides signal N-terminaux des substrats des systèmes Sec et Tat	20
Figure 5 : Différents mécanismes d'adressage et de passage de la membrane interne chez les bactéries	21
Figure 6 : Représentation schématique du processus de translocation par le système Sec avec SecA en 5 étapes	21
Figure 7 : Structure tridimensionnelle du dimère de SecA, le moteur de la translocase Sec à partir de la structure du monomère SecA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
Figure 8 : Modèle d'organisation d'un dimère de SecYEG. Vue de la face intérieure	22
Figure 9 : Structure cristallographique du complexe SecYE de <i>Pyrococcus furiosus</i>	23
Figure 10 : Trois structures cristallographiques de complexes SecYE(β) de <i>Methanococcus jannaschii</i> , <i>Thermus thermophilus</i> et <i>Pyrococcus furiosus</i> pouvant représenter les trois états du translocon lors de l'insertion latérale des protéines	24
Figure 11 : Représentation schématique du modèle de la translocase Tat avec le regroupement de deux complexes TatA et TatBC	25
Figure 12 : Représentation schématique de la translocation des substrats du système Tat.	26
Figure 13 : Organisation des opérons des systèmes de sécrétion de type II	28
Figure 14 : Modélisation tridimensionnelle de la sécrétine dodécamérique PulD de <i>K. oxytoca</i> .	31
Figure 15 : Modèle d'anneaux dodécamériques formés par les sous-domaines de GspD	32
Figure 16 : Structure de la sécrétine EspD de <i>V. cholerae</i> dans un état « fermé ».	33
Figure 17 : Regroupement des structures tridimensionnelles des domaines N0, N1, N2 et la prédiction de N3 de GspD d' <i>E. coli</i> et le modèle 3D de la sécrétine dans son état « fermé ».	33
Figure 18 : Structures de différentes (pseudo)pilines majeures	37
Figure 19 : Modèle d'assemblage du pseudopilus de <i>K. oxytoca</i>	38
Figure 20 : Modèle d'organisation des pseudopilines mineures GpsI, GspJ et GspK selon la structure cristallographique hétérotrimérique de ces protéines	39
Figure 21 : Structure tridimensionnelle de GspE	40

Figure 22 : Modèles du déroulement des interactions de XpsE avec l'ATP, lui-même et EpsL	41
Figure 23 : Interactions entre le domaine N1 d'EspE et la région cytoplasmique d'EpsL (cyto-EpsL)	42
Figure 24 : Topologie de GspF et structure cristallographique du dimère du domaine cytoplasmique de GspF de <i>V. cholerae</i>	43
Figure 25 : Représentation schématique des protéines OutC, XcpP, XpsN, représentants de la famille GspC chez les bactéries <i>E. chrysanthemi</i> , <i>P. aeruginosa</i> et <i>X. campestris</i>	45
Figure 26 : Structure cristallographique du domaine PDZ d'EpsC	45
Figure 27 : Structure cristallographique du domaine cytoplasmique d'EpsL de <i>V. cholerae</i>	51
Figure 28 : Structure cristallographique de la région périplasmique d'EpsL.	52
Figure 29 : Structure cristallographique du domaine périplasmique d'EpsM de <i>V. cholerae</i>	53
Figure 30 : Modèle d'association et de dissociation des trois composants de la plateforme de la membrane interne XpsL, XpsM et XpsN	54
Figure 31 : Représentation schématique d'une possible architecture des composants GspE, GspL et GspM selon les structures cristallographiques disponibles des différents composants	55
Figure 32 : Pili de type IV (a) de la bactérie <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	62
Figure 33 : Organisation des gènes codant pour les T4P chez quelques espèces	63
Figure 34 : Structures cristallographiques des pilines des T4P	64
Figure 35 : Comparaison des structures cristallographiques du domaine soluble de PulG, pseudopiline majeure du T2SS chez <i>K. oxytoca</i> , PilA et PilE, pilines majeures des T4Pa de <i>P. aeruginosa</i> et <i>N. gonorrhoeae</i>	64
Figure 36 : Comparaison des diagrammes de topologie des pseudopilines EpsH et PulG des T2SS avec ceux des pilines majeures PilA et PilE des T4Pa	65
Figure 37 : Représentation schématique de quatre sécrétines GspD, InvG, pIV et PilQ de la superfamille des sécrétines	66
Figure 38 : Structures cristallographiques de l'hexamère de PilT	67
Figure 39 : Différents stades de l'ATPase PilT et modèles de fonctionnement	68
Figure 40 : Modèle du tétramère de PilG de <i>N. gonorrhoeae</i> par microscopie électronique et sa topologie	69
Figure 41 : Modèle de la machinerie d'assemblage du pilus chez <i>P. aeruginosa</i>	70
Figure 42 : PilO et EspM : homologues structuraux	70
Figure 43 : Comparaison des complexes de la membrane interne des pili de type IV (a) et des systèmes de sécrétion de type II (c), et représentation schématique de PilM, PilN, PilO et leurs homologues structuraux EpsL et EpsM	71
Figure 44 : Structure de la région périplasmique de PilO ($\Delta 68$).	72
Figure 45 : Modèle de repliement de la région périplasmique de PilN grâce à son homologie de structure avec PilO	73
Figure 46 : Structures des dimères de PilO et EpsM	73
Figure 47 : Principe du double-hybride bactérien	78
Figure 48 : Test sur boîte PGA des colonies 102 et 103, présentant une résistance au chloramphénicol	80
Figure 49 : Vérification de l'insertion du gène de résistance au chloramphénicol dans le gène <i>outM</i> par PCR sur ADN génomique	80

Figure 50 : Complémentation des mutants 102 et 103 par le plasmide Δ HB M	80
Figure 51 : Oligonucléotides utilisés dans cette étude	82

Tableau 1 : Nomenclature des composants des systèmes de biogénèse des pili de type IVa chez les bactéries <i>P. aeruginosa</i> et <i>Neisseria</i> sp.	62
--	----

Perspectives

Figure 52 : Modèle du système de sécrétion de type II Out d' <i>E. chrysanthemi</i>	
---	--

Résultats chapitre I

Tableau I.1 : Plasmides utilisés pour ce chapitre	85
Figure I.1 : Séquence protéique des trois protéines OutC, OutM et OutL	86
Figure I.2 : Représentations schématiques d'OutC, OutM et OutL et de leur dérivé construit pour le double-hybride bactérien	87
Figure I.3 : Analyse des interactions entre les protéines entières en double-hybride bactérien	88
Figure I.4 : Fonctionnalité des fusions Cya::OutM et Cya::OutC chez <i>E. chrysanthemi</i>	89
Figure I.5 : Expression des fusions des protéines entières Out en double-hybride bactérien	90
Figure I.6 : Représentation schématique des interactions décelées par double-hybride bactérien entre les protéines OutC, OutL Δ c et OutM du système de sécrétion de type II d' <i>E. chrysanthemi</i>	90

Résultats chapitre II

Tableau II.1 : Plasmides utilisés dans ce chapitre	95
Figure II.1 : Représentation schématique des fusions de T18 avec les parties périplasmiques d'OutC, OutM et OutL et de leurs dérivés, construits pour le double-hybride bactérien	96
Figure II.2 ; Analyse des interactions entre les régions périplasmiques d'OutC, M et L en double-hybride bactérien	97
Figure II.3 : Expression des fusions des régions périplasmiques d'OutC, M et L en double-hybride bactérien	97
Figure II.4 : Analyse des interactions entre les régions périplasmiques d'OutM et OutL contenant le motif de type ferrédoxine en DHB	99
Figure II.5 : Expression des fusions des dérivés d'OutM et OutL en double-hybride bactérien	101
Figure II.6 : Représentation schématique des fusions de T18 avec OutM et OutL et de leurs dérivés, construits pour le double-hybride bactérien et utilisées dans le chapitre II.B.2	102
Figure II.7 : Analyse des régions périplasmiques tronquées d'OutL et d'OutM en double-hybride bactérien	103

Figure II.8 : Expression des fusions des dérivés d'OutL (A et B) et OutL et OutM (C) en double-hybride bactérien	103
Figure II.9 : Représentation schématique des constructions de (A) la fusion T18::OutLpéri co-exprimée avec OutMpéri pour le triple-hybride et (B) la triple fusion T25::GST::OutLpéri	104
Figure II.10 : Analyse des interactions entre les régions périplasmiques d'OutL et OutM en triple-hybride bactérien	105
Figure II.11 : Expression des fusions Cya::OutLpéri + OutMpéri en triple-hybride bactérien.	105
Figure II.12 : Analyse des interactions des les régions périplasmiques d'OutL et OutM avec la triple fusion T25::GST::OutLpéri en double-hybride bactérien	106
Figure II.13 : Expression de la fusion T25::GST::OutLpéri en double-hybride bactérien	106
Figure II.14 : Expression de la fusion T25::GST::OutLpéri en double-hybride bactérien	107
Figure II.15 : Fonctionnalité des mutants cystéine d'OutM chez <i>E. chrysanthemi</i>	108
Figure II.16 : Cystein-bonding des mutants cystéines d'OutM : vérification de la présence de monomères avec 2-mercaptoéthanol	108
Figure II.17 : Représentation schématique des interactions décelées par double-hybride bactérien entre les régions périplasmiques d'OutC, OutL et OutM du système de sécrétion de type II d' <i>E. chrysanthemi</i>	109
Figure II.18 : Représentation schématique des protéines GspM et GspL et les régions impliquées dans les interactions entre elles	110
Figure II.19 : Structure du dimère des régions périplasmiques de PilO et modèle de la structure de la région périplasmique de PilN	113
Figure II.20 : Structure du dimère des régions périplasmiques de PilO, EpsM et EpsL	114

Résultats chapitre III

Tableau III.1 : Plasmides utilisés dans ce chapitre	116
Figure III.1 : Représentations schématiques des triples fusions utilisées en double-hybride bactérien avec la séquence d'acides aminés des TMS	117
Figure III.2 : Détections de triples fusions utilisées en double-hybride bactérien	117
Figure III.3 : Test de résistance à l'ampicilline des triples fusions T18::TMS::BlaM	118
Figure III.4 : Sensibilité des triples fusions à la trypsine	119
Figure III.5 : Analyse des TMS d'OutC, M et L en double-hybride bactérien	120
Figure III.6 : Expression de triples fusions lors d'expériences de double-hybride bactérien	122
Figure III.7 : Utilisation du TMS de GPA dans le DHB	
Figure III.8 : Utilisation du TMS de TetA comme témoin négatif dans le double-hybride bactérien	124
Figure III.9 : Effet de la triple mutation dans le TMS d'OutC sur les interactions des protéines entières	125

Figure III.10 : Effet de la triple mutation dans le TMS d'OutC sur les interactions des triples fusions Cya::TMS::BlaM	126
Figure III.11 : Nombre attendu de motifs contenant des résidus aromatiques et nombre d'apparitions dans une base de données de TMS bactériens	132
Figure III.12 : Alignement de la région contenant le TMS de 7 membres de la super-famille GspM (par CLUSTALW).	133
Figure III.13 : Alignement de la région contenant le TMS de 7 membres de la super-famille GspL (par CLUSTALW)	134
Figure III.14 : Projection hélicoïdale des hélices α des TMS d'OutM, OutL et OutC	135
Figure III.15 : Représentation schématique récapitulative des interactions détectées par double-hybride bactérien entre OutC, OutL et OutM	135

Résultats Chapitre IV

Figure IV.1 : Représentation schématique d'OutC et OutD et de leurs dérivés utilisés dans cette étude	137
Figure IV.2 : Représentation schématique de la construction des fusions T18::OutCpéri co-exprimé avec OutDpéri	137
Figure IV.3 : Analyse des interactions entre les régions périplasmiques d'OutL ou d'OutM et celle d'OutC co-exprimé avec OutDpéri en triple-hybride bactérien	138
Figure IV.4 : Expression des différentes combinaisons de fusions contenant T18::OutCpéri-OutDpéri en double-hybride bactérien	138
Figure IV.5 : Analyse des interactions entre les régions périplasmiques d'OutL et ses dérivés avec celle d'OutC co-exprimé avec OutDpéri en triple-hybride bactérien	139
Figure IV.6 : Expression des différentes combinaisons de fusions contenant T18::OutCpéri-OutDpéri en double-hybride bactérien	139
Figure IV.7 : Diagramme des activités β -galactosidase avec T18::Cpéri observées dans différentes combinaisons et la quantité de protéines correspondante détectée par Western-blot	140
Figure IV.8 : Diagramme des activités β -galactosidase observées avec T18::Dpéri et la quantité de protéines correspondante par Western-Blot	140
Figure IV.9 : Analyse de la copurification d'OutDpéri sur GST::OutCpéri en présence ou absence de GST::OutLpéri	141
Figure IV.10 : Analyse de la copurification d'OutDANS et OutDAC sur GST::CABX, en présence ou absence de GST::Lpéri	141
Figure IV.11 : Analyse de la copurification d'OutDANS, OutDAC et {OutDANS, OutDAC} sur GST::CABX en présence ou absence d'OutLpéri	142

Résultats Chapitre V

Tableau V.1 : Plasmides utilisés dans ce chapitre	144
Figure V.1 : Représentation schématique de la construction des fusions d'OutLpéri et OutMpéri avec la GST	144
Figure V.2 : Surproduction d'OutLpéri et OutMpéri	145
Figure V.3 : Co-purification d'OutLpéri et OutMpéri	145
Figure V.4 : Surproduction d'OutLpéri et OutMpéri	146

Avant-propos

Le transport actif qu'est la sécrétion est un processus bactérien essentiel. En effet, chez les bactéries pathogènes ou non, la sécrétion d'enzymes, toxines, effecteurs, ADN doit être finement contrôlée pour ne pas engendrer de perte d'énergie et des fuites du milieu intracellulaire. La présence de deux barrières, les membranes cytoplasmique et externe, chez les bactéries à Gram négatif, complexifie la sécrétion. Pour pallier à cela, les bactéries à Gram négatif utilisent plusieurs stratégies : à l'heure actuelle, 6 systèmes de sécrétion sont connus. Ils sont différenciés selon leur fonctionnement, l'assemblage de la machinerie et le type de substrats. Les systèmes de sécrétion de type I, III, IV et VI permettent une sécrétion en une seule étape, du cytoplasme au milieu extracellulaire ou directement dans la cellule-hôte. Les systèmes de type II, parfois IV, Va (auto-transporteurs) et Vb (système à deux partenaires) et la voie chaperone-usheR permettent la translocation des protéines du périplasme à travers la membrane externe. Le passage de la membrane interne, ou exportation, nécessite principalement le système Sec et pour certaines protéines le système Tat.

Notre modèle d'étude, la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi* ou *Dickeya dadantii*, possède plusieurs de ces systèmes mais le système de sécrétion de type II est primordial pour le pouvoir pathogène de cette bactérie : il permet la sécrétion d'une douzaine de pectinases qui vont dégrader les tissus végétaux. Les mutants dans ce système qui ne sécrètent plus de pectinases sont non-pathogènes. Malgré une étude intensive de ce système depuis plusieurs décennies, le fonctionnement et l'assemblage du système de sécrétion de type II sont encore obscurs. La machinerie est constituée de 12 à 15 composants. L'étude de chacun de ses composants et les interactions entre eux est la stratégie que nous avons employée afin de mieux caractériser ce système.

Dans la partie bibliographique de ce travail, une courte introduction d'*Erwinia chrysanthemi* et de son pouvoir pathogène sera présentée, suivie d'un court chapitre sur les mécanismes de passage de la membrane cytoplasmique, prérequis pour la sécrétion par les systèmes de sécrétion de type II. Puis l'état des connaissances sur ce système de sécrétion et enfin une courte présentation des systèmes de biogénèse des pili de type IV qui, par leur similitude avec les systèmes de sécrétion de type II, pourront apporter des éclaircissements utiles.

Introduction bibliographique

A.



B.



FIGURE 1 : Dégradation des tissus végétaux par *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*). (A) Nécrose de tige sur un pied d'œillet (*Dianthus caryophyllus*) (Central Science Laboratory, York**). (B). Nécrose de tubercule de pomme de terre par *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*).**

I. La bactérie phytopathogène Erwinia chrysanthemi

I.A) Taxonomie

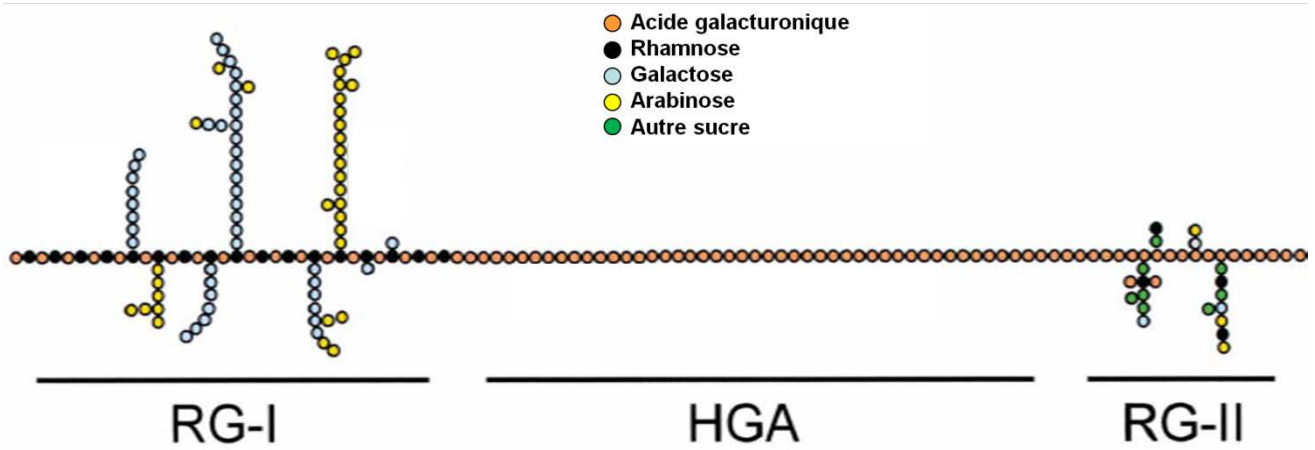
Notre modèle d'étude, la souche *Erwinia chrysanthemi* 3937 est une α -protéobactérie, de la famille des Entérobactéries. Bactérie à Gram négatif, en forme de bacille, elle est anaérobie facultative et dispose d'un flagelle péritriche. Cette espèce regroupait un grand nombre de souches. En 2005, de par leurs caractères phénotypiques, par hybridation ADN-ADN, sérologie, analyse de séquences ARNr 16S, certaines souches d'*E. chrysanthemi* ainsi que l'espèce *Brenneria paradisiaca* ont été placées dans un nouveau genre *Dickeya* et réparties en 6 nouvelles espèces (Samson *et al.*, 2005) : *Dickeya chrysanthemi*, *D. dianthicola*, *D. dieffenbachiae*, *D. paradisiaca*, *D. zae* et *D. dadantii*. La souche d'*E. chrysanthemi* 3937 fait désormais partie de l'espèce *Dickeya dadantii*. Cependant, la dénomination *E. chrysanthemi* a toujours été utilisée, nous avons continué à utiliser ce nom.

I. B) Aspects généraux de la pathogénie

Erwinia chrysanthemi a été initialement isolée dans les pays chauds et s'est aujourd'hui étendue sur la presque totalité de l'Europe et une grande partie des états à climat chaud ou tempéré de l'Asie, d'Amérique et même de l'Océanie.

Erwinia chrysanthemi est une bactérie phytopathogène à large spectre d'hôtes. En effet, elle peut infecter de multiples plantes, mono- ou dicotylédones. Citons parmi d'autres la pomme de terre, l'endive, la pastèque, le concombre, le riz, le maïs ou le chrysanthème (Rapport OEPP). C'est une bactérie pectinolytique : elle provoque la macération des tissus végétaux par dégradation de la pectine. La maladie causée porte le nom de la pourriture molle (« soft rot ») (Figure 1). Les bactéries se logent dans les blessures ou lenticelles de la plante hôte où elles peuvent rester en dormance (Pérombelon, 2002). Elles peuvent également survivre dans le sol, infectant la culture suivante aux champs. Le développement de la maladie atteint sa vitesse maximale à des températures de 25°C à 30°C mais sa distribution mondiale suggère une adaptation des bactéries aux températures moins élevées.

A.



B.

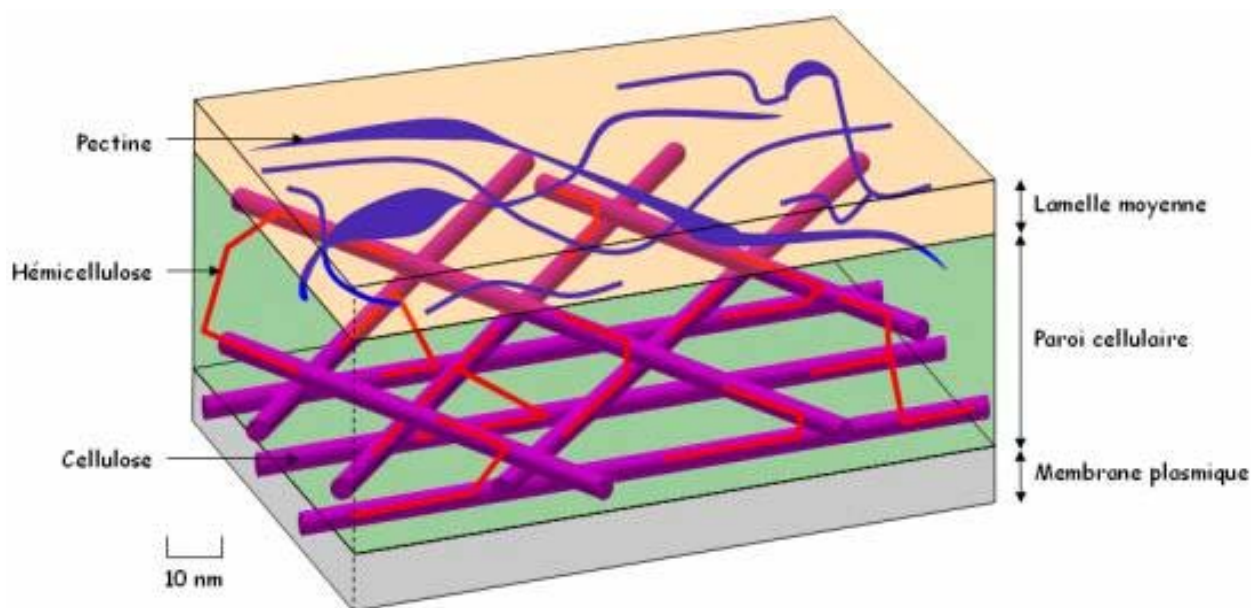


FIGURE 2 : Représentation schématique de la paroi végétale. (A) structure de la pectine. HGA : homogalacturonane ; RG-I : rhamnogalacturonane I ; RG-II : rhamnogalacturonane II ; (B) représentation schématique des réseaux de pectine, cellulose et hémicellulose (d'après Willats *et al.*, 2001)

Les dégâts causés par cette bactérie sont très difficiles à estimer, de l'aveu même de l'OEPP (organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes). D'abord, les symptômes ne sont pas spécifiques d'*Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*). D'autres bactéries pectinolytiques comme certaines souches d'*Erwinia carotovora* (renommées *Pectobacterium atrosepticum* ou *P. carotovorum* sp. *carotovorum*) provoquent des symptômes similaires et le remaniement de la classification n'a pas simplifié la reconnaissance des bactéries *in planta*. Ensuite, la quantification des pertes aux champs, et en conséquence des pertes économiques nécessitent un vaste travail de terrain au niveau national. Il n'y a donc pour l'instant que très peu de données chiffrées (Echange épistolaire avec l'OEPP ; Août 2010).

L'invasion, la colonisation et la dégradation des tissus végétaux impliquent de nombreux facteurs de virulence. Le principal facteur de pathogénie est la sécrétion extracellulaire d'enzymes dégradatives, pectinases et cellulase, dans la dernière phase du processus infectieux. Ces enzymes extracellulaires sont sécrétées par le système de sécrétion de type II, Out. Les mutants non-sécréteurs de pectinases sont avirulents.

I.C) Mécanisme principal de la pathogénie

I.C.1) Structure de la paroi végétale

La paroi végétale est composée de polysaccharides, protéines, composés aromatiques et aliphatiques, qui donnent leur rigidité aux tissus végétaux. Les polysaccharides sont classés en trois types : la cellulose, l'hémicellulose et la pectine. La pectine contient les homogalacturonanes, rhamnogalacturonanes I et II, qui sont majoritaires et les apigalacturonanes et xylogalacturonanes (Caffal and Mohnen, 2009). L'homogalacturonane est un polymère linéaire d' α -(1,4)-D-acides D-galacturoniques qui peut représenter 60% des pectines de la paroi végétale. L'homogalacturonane est généralement estérifié et lié de manière covalente aux rhamnogalacturonanes I et II, qui s'intercalent entre les chaînes d'homogalacturonane (Figure 2.A) (Willats *et al.*, 2001). Aucune interaction n'a été détectée entre les rhamnogalacturonanes I et II.

La cellulose est un polymère de β -(1,4)-D-glucose formant des chaînes parallèles. Elle se lie avec une forte affinité avec l'hémicellulose. L'hémicellulose est un

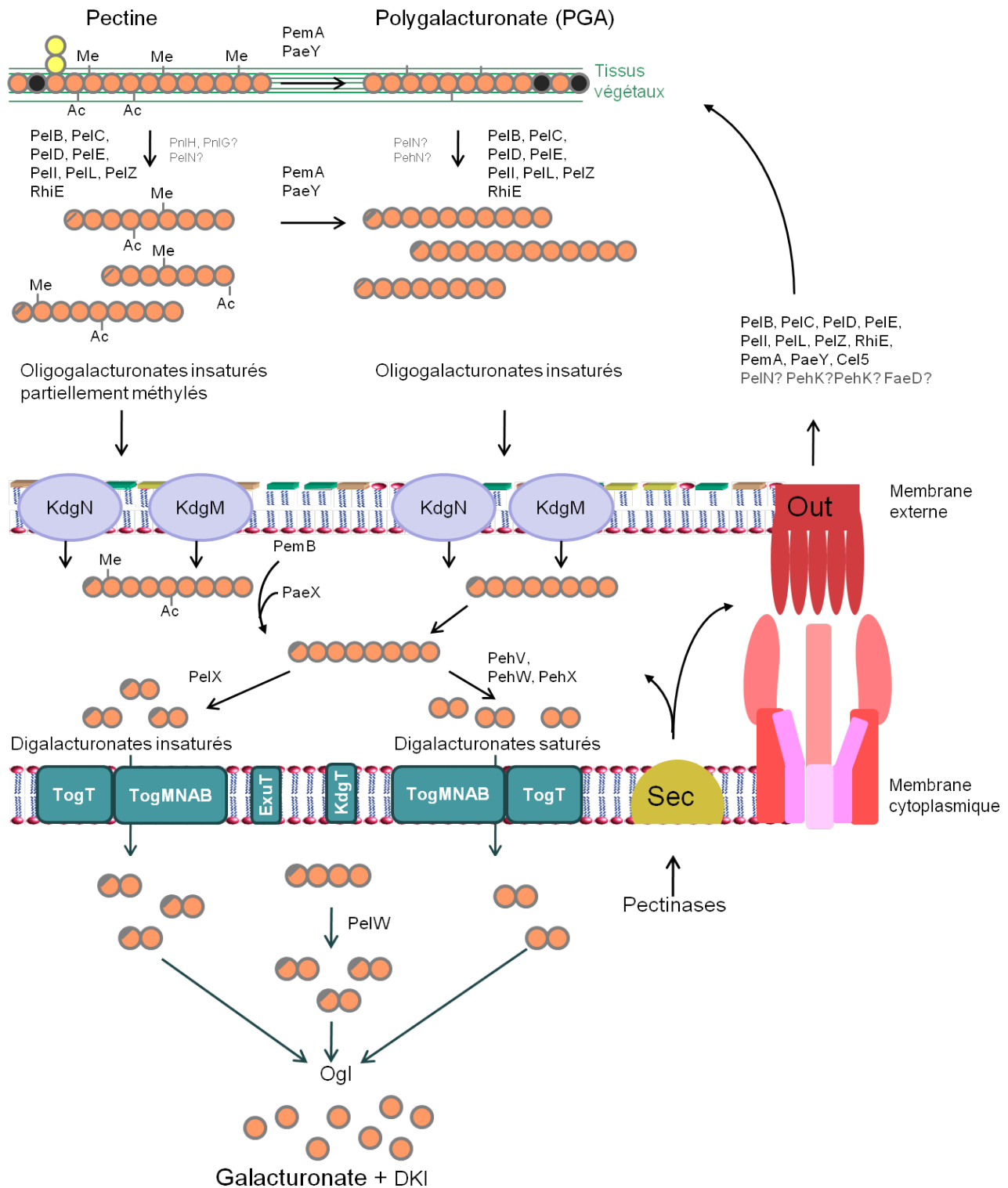


FIGURE 3: Voie de dégradation et d'assimilation de la pectine. Les pectines extracellulaires sont sécrétées par le système de type II Out d'*Erwinia chrysanthemi* et dégradent la pectine afin que les dérivés soient assimilés dans la cellule dans laquelle ils vont subir d'autres dégradations. Le galacturonate et le DKI (5-céto-4-désoxyuronate) ainsi récupéré va être intégré dans le métabolisme cellulaire. Les boules oranges représentent le galacturonate, les noires le rhamnose, les jaunes l'arabinose.

hétéropolysaccharide, composé majoritairement de xylose mais aussi de glucose, galactose, mannose, arabinose, rhamnose, acides galacturonique et mannuronique. Le modèle actuel de la structure de la paroi végétale est un réseau de pectine et un réseau de cellulose, maintenus ensemble par les hémicelluloses (Figure II.B) (Caffall and Mohnen, 2009). L'homogalacturonane fixe des ions calcium et le rhamnogalacturonane fixe de l'acide borique, qui contribuent au maintien de la structure.

I.C.2) Les enzymes dégradatives

La dé-estérification et la dépolymérisation intégrale de la pectine sont amorcées par des enzymes extracellulaires. Après des étapes périplasmiques et cytoplasmiques, les tri- ou digalacturonates sont entièrement dégradés en pyruvate et 3-phosphoglyceraldéhyde qui rentreront dans le cycle de l'acide citrique.

L'ensemble de ces processus requiert deux grands groupes d'enzymes : les pectine estérases et les dépolymérases.

Les pectines estérases permettent la dé-estérification de la pectine en hydrolysant les groupements méthyles ce qui résulte en polygalacturonate (PGA) et méthanol ou les groupements acétyles, ce qui résulte en polygalacturonate (PGA) et acide acétique (Figure 3). On distingue donc les **pectine méthylestérases** et les **pectine acétylestérases**. Il a été montré que la croissance d'*Erwinia chrysanthemi* est fortement ralentie lorsque une pectine très fortement estérifiée est la seule source de carbone (Shevchik *et al.*, 1996). La dé-estérification semble donc être une condition préalable à la dégradation complète de la pectine.

Les dépolymérases regroupent deux types d'enzymes :

- i) **les pectate lyases** clivent par β -élimination les liaisons glycosidiques des polymères pectiques, généralement des polygalacturonates (Tardy *et al.*, 1997) et génèrent des oligogalacturonates planaires avec une double liaison entre C-4 et C-5 à l'extrémité non-réductrice ; **les pectine lyases** clivent par β -élimination des polymères hautement ou moyennement méthylés ;
- ii) **les polygalacturonases** clivent les liaisons glycosidiques des polygalacturonates par hydrolyse et génèrent également des oligogalacturonates.

Les dépolymérases se distinguent également par leur clivage aléatoire (endo-) ou à partir d'une extrémité du polymère (exo-). Il a été observé que les exo-dépolymérases d'*E. chrysanthemi* sont périplasmiques tandis que les endo-dépolymérases sont sécrétées. L'hypothèse est que les fragments de grande taille générés par les endo-dépolymérases peuvent atteindre le périplasme mais seuls des fragments de petites tailles, que peuvent générer les exo-dépolymérases, pourraient passer par les transporteurs de la membrane cytoplasmique (Shevchik *et al.*, 1999).

Les dépolymérases rassemblent également les **rhamnogalacturonate lyases**. Ces dernières clivent le rhamnogalacturonate I entre un acide galacturonique et un rhamnose (Laatu and Condemine, 2003).

Les **cellulases** participent également à la dégradation de la paroi végétale en clivant la cellulose (Boccara *et al.*, 1994).

I.C.3) Une dégradation étape par étape

I.C.3.1) Les enzymes extracellulaires

Certaines enzymes vont aller directement au contact de la paroi végétale pour commencer le travail de dégradation. Pour cela, *E. chrysanthemi* sécrète par le système de sécrétion Out :

- Une pectine méthylestérase PemaA (Laurent *et al.*, 1993), et une pectine acétylestérase PaeY (Shevchik and Cotte-Pattat, 1997),
- Huit endo-pectate lyases PelA, PelB, PelC, PelD, PelE, PelI, PelL et PelZ (Cotte-Pattat *et al.*, 1996),
- Une cellulase Cel5 (ou CelZ) (Zhou *et al.*, 1999),
- Une rhamnogalacturonate lyase RhiE (Laatu and Condemine, 2003)
- Une polygalacturonase PehN, supposée extracellulaire en raison de homologie avec les endo-polygalacturonases qui sont la plupart du temps extracellulaires (Cotte-Pattat *et al.*, 2002 ; Abbott and Boraston, 2008).

I.C.3.2) Les enzymes périplasmiques

Les oligogalacturonates sont transportées dans le périplasme par les porines KdgM et KdgN, spécifiques du transport des oligogalacturonates (Figure 3) (Blot *et al.*, 2002, Condemine and Ghazi, 2007). Une fois dans le périplasme, des enzymes périplasmiques digèrent les substrats en di- et tri-galacturonates. Ces enzymes sont :

- Une pectine méthylestérase PemB, qui est ancrée à la face périplasmique de la membrane externe (Shevchik *et al.*, 1996), et une pectine acétylestérase périplasmique, PaeX (Shevchik and Cotte-Pattat, 2003) ;
- Une exo-pectate lyase PelX périplasmique dont le substrat préférentiel est un tétragalacturonate mais qui est aussi active sur des oligomères plus longs. Elle génère des digalacturonates insaturés en clivant l'extrémité réductrice du substrat (Shevchik *et al.*, 1999a) ;
- Trois exo-polygalacturonases PehV, PehW et PehX périplasmiques, qui complètent l'activité de PelX en clivant l'extrémité non-réductrice des polygalacturonates. PehX est l'enzyme la plus active et génère des digalacturonates saturés (Nasser *et al.*, 1999 ; Shevchik *et al.*, 1999a) ;
- Une cellulase CelY périplasmique, moins abondante que la cellulase extracellulaire Cel5 (Boyer *et al.*, 1987).

I.C.3.3) Les enzymes cytoplasmiques

Les transporteurs TogMNAB de la famille des ABC transporteurs et TogT, ainsi que permettent le passage de la membrane interne des digalacturonates saturés et insaturés (Figure 3) (Cotte-Pattat and Reverchon, 2001). Deux autres transporteurs ExuT et KdgT permettent le transport de produits de dégradation plus petits comme le 5-céto-4-désoxyuronate (DKI), le 2,5-dicéto-3-désoxygluconate (DKII) et 2-céto-3-désoxygluconate (KDG). L'exo-pectate lyase PelW cytoplasmique dégrade les derniers oligogalacturonates en digalacturonates saturés ou insaturés (Shevchik *et al.*, 1999). L'oligopectate lyase Ogl prend en charge l'ensemble des digalacturonates saturés ou insaturés et génère des galacturonates et des 5-céto-4-désoxyuronate (DKI) (Shevchik *et al.*, 1999). C'est pourquoi un mutant *ogl* est

incapable de croître en milieu PGA (polygalacturonate comme seule source de carbone) (Reverchon and Robert-Baudouy, 1987).

I.C.3.4) Les enzymes peu ou pas caractérisées

Le séquençage de la souche *Erwinia chrysanthemi* 3937 a révélé l'existence d'autres gènes homologues aux gènes codant pour des enzymes décrites ci-dessus ou des enzymes pectinolytiques. Il y aurait notamment une pectate lyase PelN, une polygalacturonase PehK (Okinaka *et al.*, 2002), une estérase FaeD, une protéine de type Avr : AvrL (Kazemi-Pour and Condemine, 2003) et enfin deux protéines homologues des pectine lyases d'*Erwinia carotovora* PnlH et PlnG. La pectine lyase putative PnlH est sécrétée par le système de sécrétion de type II Stt (Ferrandez and Condemine, 2008). Quatre métalloprotéases PrtA, PrtB, PrtC et PrtG, sécrétées par le système de sécrétion de type I, semblent également impliquées dans la dégradation de la paroi végétale (Wandersman, 1989 ; Barras *et al.*, 1994).

La sécrétion par le système de sécrétion de type II

II. La première étape : l'exportation à travers la membrane interne

Les exoprotéines sécrétées par le système de sécrétion de type II sont prises en charge par celui-ci une fois dans le périplasme. Pour traverser la barrière qu'est la membrane cytoplasmique, les exoprotéines empruntent la voie Sec ou pour certaines exoprotéines la voie Tat (Vouhloux *et al.*, 2001). Ces systèmes généraux ne sont pas seulement impliqués dans la sécrétion extracellulaire mais sont essentiels pour l'insertion des protéines bitopiques ou intégrales de la membrane interne et pour l'exportation des protéines périplasmiques ou de la membrane externe. Le système Sec est ubiquitaire et le système Tat largement distribué dans les règnes du vivant. L'assemblage et le fonctionnement de ces systèmes sont présentés dans ce chapitre.

II.A) Le passage de la membrane interne par le système Sec

Le système Sec est une machinerie indispensable des cellules eucaryotes, dans lesquelles il se trouve au niveau du réticulum endoplasmique, et des cellules procaryotes (archaebactéries et eubactéries) (Wickner *et al.*, 1991). Le système Sec des bactéries à Gram négatif est impliqué et dans l'exportation de protéines non repliées dans le périplasme et dans l'insertion des protéines membranaires dans la membrane cytoplasmique. Pour donner une vision globale, les protéines tout juste traduites ou en cours de traduction sont prises en charge par une chaperonne SecB ou par SRP (signal recognition particle), qui les adressent au système Sec, dont le canal est appelé translocon. Le translocon composé des protéines SecYEG forme un pore dans la membrane et le passage des protéines à exporter se fait grâce à l'énergisation du système par l'ATPase SecA et par la force proton motrice.

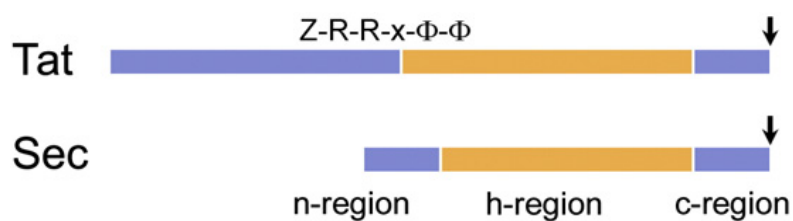


FIGURE 4 : Comparaison schématique des peptides signal N-terminaux des substrats des systèmes Sec et Tat. La région N (n-region) porte une charge nette positive, la région H est hydrophobe, la région C est polaire et contient le site de clivage des signal peptidases LspA ou LepA selon le type de protéines. La séquence spécifique de reconnaissance des peptide signal de Tat est indiquée en haut, Z étant un résidu polaire et Φ des résidus hydrophobes (Natale *et al.*, 2008).

II.A.1) L'adressage des protéines à exporter par le système Sec

Lorsque les chaînes polypeptidiques naissantes sortent du ribosome, elles sont protégées par TF (Trigger Factor) pour les protéines solubles et par SRP pour les protéines membranaires. Toutes les protéines prises en charge par le système Sec possèdent à leur extrémité N-terminale un peptide signal ou une séquence signal. Ils sont indispensables pour un adressage correct au système et sont structuralement très conservés chez les eucaryotes et procaryotes. Le peptide signal des protéines solubles et des lipoprotéines, d'une longueur de 15 à 30 résidus, va être clivé après la translocation. La séquence signal, non clivée, correspond aux régions hydrophobes, donc les segments transmembranaires (TMS), des protéines membranaires. De manière générale, le peptide signal est composé de trois parties caractéristiques : les régions N, H et C (Figure 4). La région N contient des acides aminés chargés positivement. Plus cette région contiendra de charges positives, plus l'interaction avec SecB sera forte. La région H (hydrophobe) contient, comme son nom l'indique, des résidus hydrophobes. Plus cette région sera hydrophobe, plus l'interaction avec SRP sera forte (Natale *et al.*, 2008). Enfin, la région C contient des résidus polaires (généralement les résidus L(A/S)(A/G)C pour les lipoprotéines et AXA pour les autres protéines) qui définissent le site de clivage de la signal peptidase. Ce sont les seuls résidus conservés et pourtant les peptides signal sont interchangeables.

L'adressage des protéines peut être co-traductionnel ou post-traductionnel (Figure 5). Dans le cas de l'adressage post-traductionnel, la chaperonne SecB est requise. Elle n'interagit pas avec le peptide signal des protéines à exporter (Randall *et al.*, 1990) mais interagit avec différents domaines contenant des résidus aromatiques et basiques. Comme les chaperonnes générales GroEL et DnaK peuvent remplacer SecB, certains auteurs émettent l'idée que les chaperonnes générales pourraient remplir la fonction de SecB dans les espèces qui ne possèdent pas SecB. En effet, SecB n'est retrouvé que chez les protéobactéries (van der Sluis and Driessen, 2006). Il a également été montré que SecA cytoplasmique pouvait adresser elle-même les préprotéines (Vrontou and Economou, 2004). SecB se lie aux polypeptides émergents du ribosome après leur dissociation de TF et les stabilisent dans une conformation non-repliée (Kumamoto, 1989). SecB un homotétramère de deux dimères (Zhou and Xu, 2005). Le monomère est composé de la région N, formée de 4 brins β antiparallèles, et de la région C, formée de deux hélices α . Dans le dimère, les 8 brins β forment un feuillet β plat. Dans le tétramère, les hélices α sont toutes à l'intérieur avec les deux feuillets β à l'extérieur

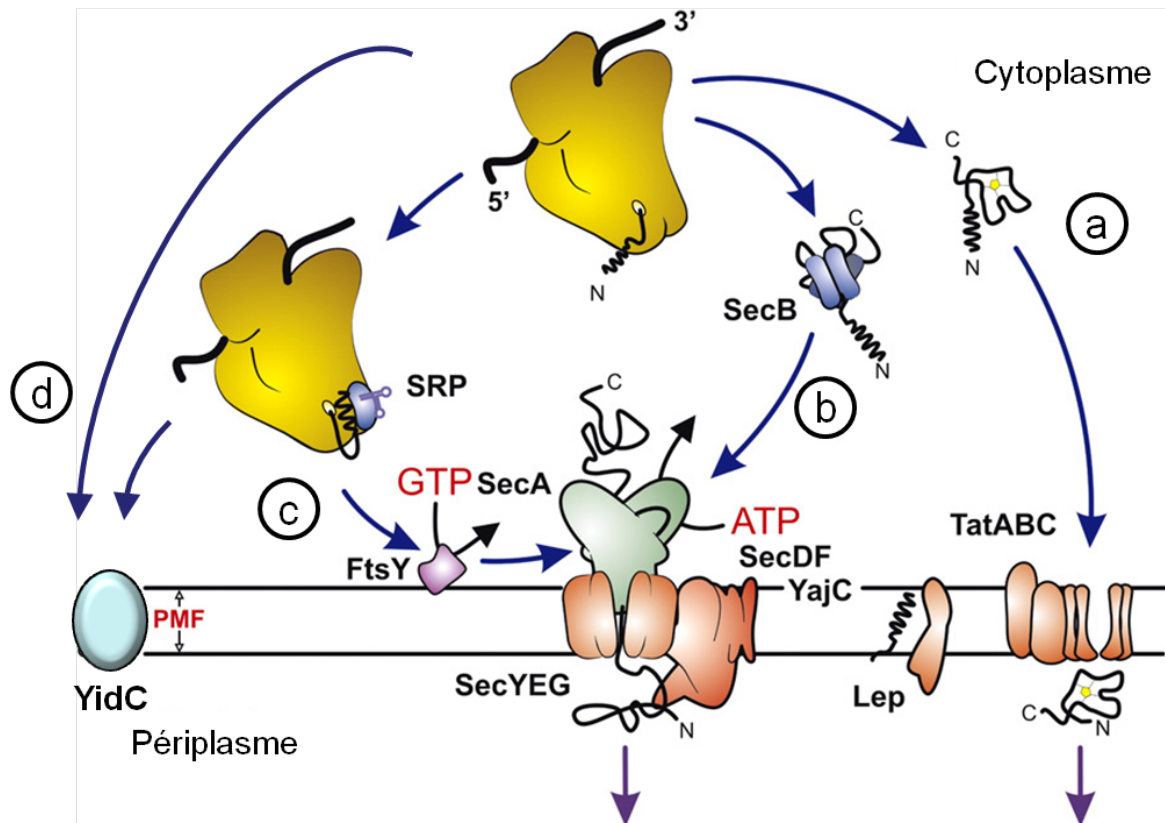


FIGURE 5 : Différents mécanismes d'adressage et de passage de la membrane interne chez les bactéries. a) Voie d'exportation des protéines repliées par le système Tat. b) Voie d'exportation post-traductionnelle par le système Sec. c) Voie d'exportation co-traductionnelle par SRP et le système Sec. d) Voie d'exportation post-traductionnelle pour l'insertion des protéines membranaires par YidC (Sec-indépendante ou Sec-dépendante) (Natale *et al.*, 2008)

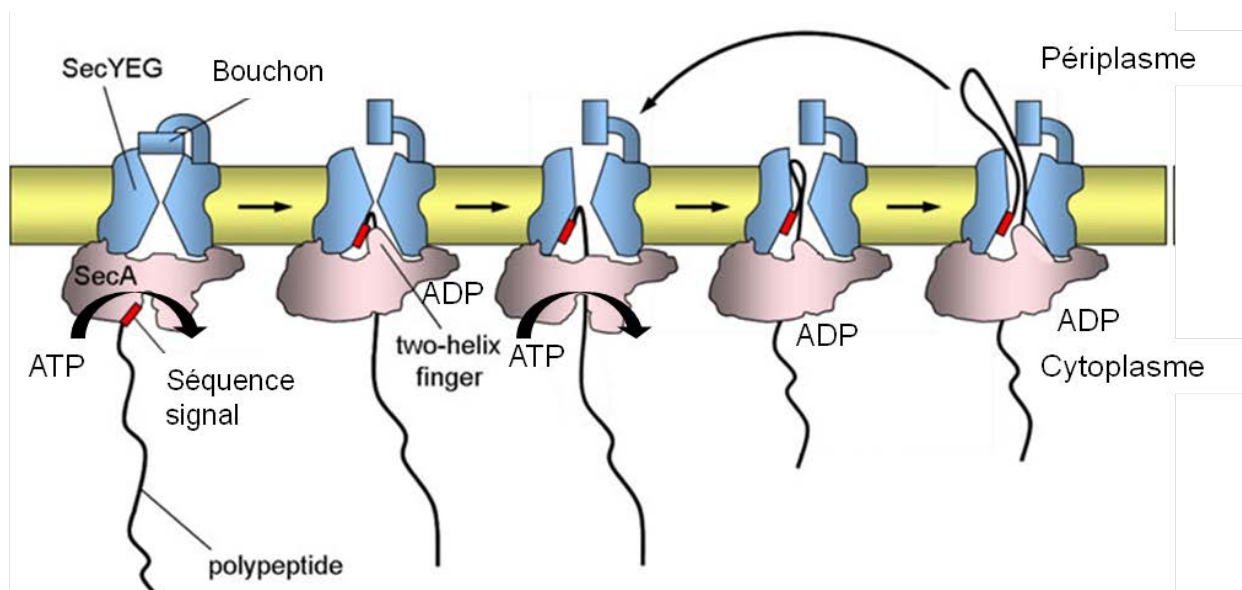


FIGURE 6 : Représentation schématique du processus de translocation par le système Sec avec SecA en 5 étapes. (Facey and Kuhn, 2010).

de chaque côté. Des poches permettant la fixation des protéines à exporter sont ainsi formées (Zhou and Xu, 2005). SecB va ensuite interagir spécifiquement avec les domaines C-terminaux du dimère SecA, ce qui va résulter au transfert des protéines non-repliées de SecB à SecA. Une interaction de faible affinité ayant été détectée *in vitro*, il est supposé qu'un des monomères de SecA se dissocierait de SecB, ce qui provoquerait le transfert de la protéine à exporter (Natale *et al.*, 2008).

Les protéines ayant une région hydrophobe sont prises en charge par SRP. La région hydrophobe est cachée dans une rainure hydrophobe de SRP. Cette interaction serait renforcée par des interactions électrostatiques dues aux résidus basiques de la préprotéine (Peterson *et al.*, 2003). Dans le cas des protéines membranaires possédant une large région cytoplasmique, une région amphiphile de l'extrémité cytoplasmique sert de séquence signal (Maier *et al.*, 2008). SRP est une ribo-protéine formée par la GTPase Ffh et un ARN. SRP va interagir avec le ribosome et stopper la traduction. Il y a donc translocation co-traductionnelle. Le complexe ribosome-SRP-préprotéine est adressé au translocon grâce à l'interaction de SRP avec son récepteur FtsY. Ce récepteur est lui-même une GTPase associée à la membrane interne et en interaction avec le translocon. Au moment de cette interaction, deux GTP vont être hydrolysés et permettre le transfert de la préprotéine au complexe SecA et SecYEG (Shan *et al.*, 2007). La traduction va être terminée au fur et à mesure de la translocation.

II.A.2) Le passage par le translocon Sec

L'ATPase SecA est le récepteur des protéines à exporter et le moteur du système. Elle est associée aux phospholipides chargés négativement de la membrane cytoplasmique et interagit fortement avec le canal SecYEG. La structure de SecA a été étudiée intensivement : 8 structures sont disponibles. Parmi elles, sept ont décrit un dimère antiparallèle de SecA dans les cristaux (Figure 7) et une a décrit un dimère parallèle (du Plessis *et al.*, 2010). L'activité ATPase est apportée par les deux domaines de fixation de l'ATP NBF1 et NBF2. SecA interagit avec la préprotéine par l'intermédiaire du domaine PPXD, qui va subir un changement conformationnel, comme le domaine HWD, après hydrolyse de l'ATP. Le domaine HWD interagit fortement avec le translocon. Le domaine HSD contient une hélice α qui va interagir avec les autres domaines et maintenir ainsi la structure. Enfin, le domaine C-terminal CTL forme un doigt de zinc et interagit avec SecB et les phospholipides.

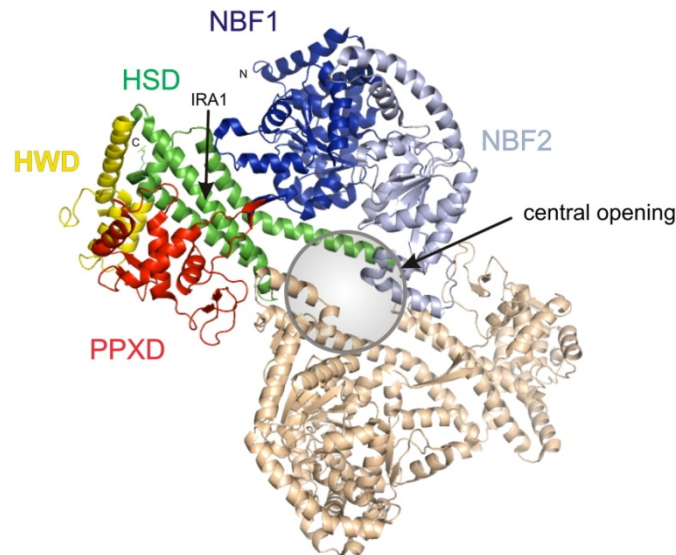


FIGURE 7 : Structure tridimensionnelle du dimère de SecA, le moteur de la translocase Sec à partir de la structure du monomère SecA de *Mycobacterium tuberculosis*. Vue de la face intérieure. La formation d'un pore central est représentée par un cercle. Les différents domaines de SecA sont représentés par différentes couleurs : le pre-protein cross-linking domain (PPDX) ainsi que le HSD (helical scaffold domain) et le NBF1 (nucleotide binding fold 1) interagissent avec la chaîne polypeptidique. Les domaines NBF1 et 2 forment l'ATPase et le site d'hydrolyse de l'ATP noté IRA1 est dans le HSD. Le HWD (helical wing domain) permettrait l'interaction avec SecYEG. (d'après **du Plessis *et al.*, 2010**)

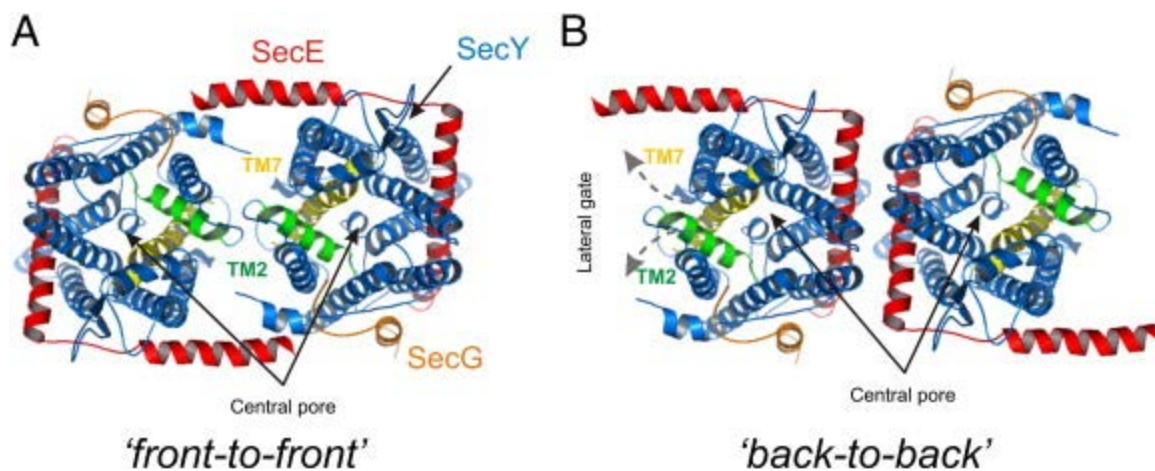


FIGURE 8 : Modèle d'organisation d'un dimère de SecYEG. Vue de la face intérieure (A) Le modèle « front-to-front » où les deux protomères seraient l'un en face de l'autre permettrait la formation d'un large pore après un déplacement des TMS 2 et 7 de SecY. (B) Le modèle « back-to-back » des protomères de SecA montrerait un alignement des hélices transmembranaires de SecE et une position opposée des « ouvertures latérales » formées par les TMS 2 et 7 de SecY (du Plessis *et al.*, 2010).

SecA contient une molécule de zinc nécessaire pour la stabilisation du domaine C-terminal dans une conformation spécifique.

Le pore formé par SecYEG est hydrophile. SecY comprend deux séries de 5 TMS connectés par une boucle périplasmique qui par leur symétrie centrale prennent une forme de coquillage ou de clapet avec le canal au centre. Le canal est resserré en son milieu et obstrué du côté périplasmique par le linker des TMS 1 et 2. Une étude très récente a montré par cross-linking *in vivo* qu'il suffit d'un léger mouvement du bouchon pour permettre la translocation (Nijeholt *et al.*, 2010). L'ouverture du canal se ferait par le changement conformationnel de la boucle périplasmique, provoquant l'éloignement des deux moitiés de SecY et plus particulièrement les TMS 2 et 7 de l'autre côté de la structure. Les deux moitiés de SecY sont maintenues ensemble grâce à SecE, qui agit comme une pince. SecG est situé à la périphérie de SecY et SecE. L'oligomérisation du complexe est sujet à controverse : plusieurs études apportent des indications sur un état dimérique (Natale *et al.*, 2008). Mais la structure d'un complexe ribosome/chaîne polypeptidique naissante/ Sec61 (homologue de SecYEG) chez un eucaryote a été résolue par cryo-microscopie électronique : un seul hétérotrimère est suffisant pour la translocation (Becker *et al.*, 2009). Dans ce cas d'un dimère, l'arrangement du dimère avec les canaux l'un en face de l'autre permettrait la formation d'un large pore (Figure 8) (Mitra *et al.*, 2005). Ce modèle « front-to-front », bien que très attractif, est fortement compromis par une étude structurale très récente au profit du modèle « back-to-back », comme cela va être expliqué plus loin.

SecA interagit avec deux régions de SecY (Van der Sluis *et al.*, 2006). Le domaine N du peptide signal de la préprotéine, encore liée à SecA, interagit avec une région intérieure du canal grâce aux résidus polaires basiques chargés positivement. Ces deux événements vont fortement augmenter son activité d'hydrolyse de l'ATP (Natale *et al.*, 2004). Le pore formé par SecY est bouché du côté cytoplasmique par deux hélices de SecA. Au moment de l'hydrolyse d'ATP, SecA relâche la protéine engagée dans le canal. SecA se dissocierait de SecYEG pour se réassocier, et hydrolyserait un autre ATP. Ces deux événements permettraient la translocation de 20 à 30 résidus chacun et les cycles seraient multiples jusqu'à la translocation complète de la protéine à exporter (van der Wolk *et al.*, 1997 ; Economou *et al.*, 1995). Le mécanisme par lequel l'hydrolyse d'ATP promeut la translocation n'est pas connu mais il est supposé que le phénomène serait causé par des changements conformationnels de SecA, à l'image des hélicases RecA ou PrcA (Ye *et al.*, 2004). Bien que ne pouvant pas initier la translocation, la force proton motrice peut efficacement faire

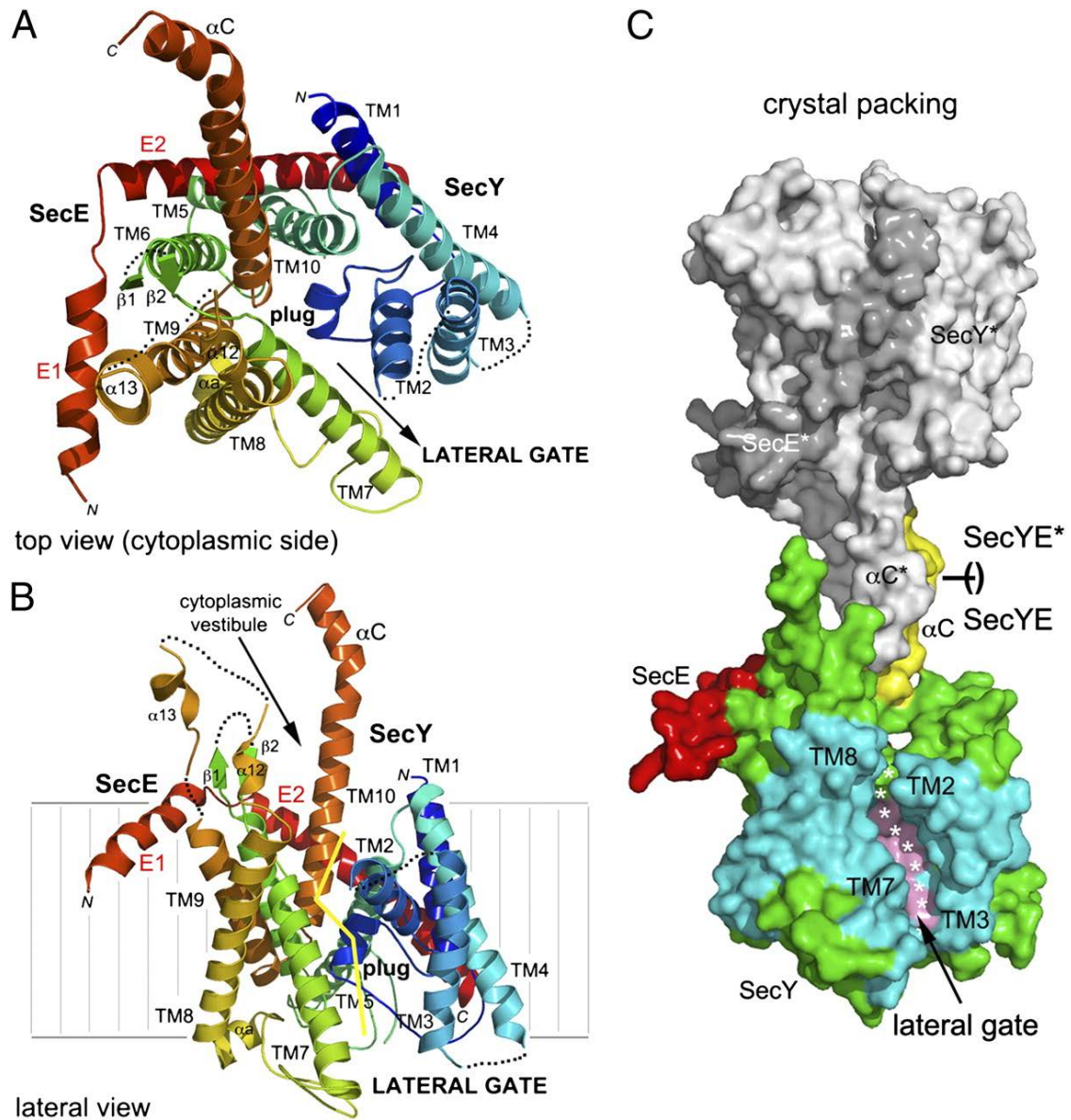


FIGURE 9 : Structure cristallographique du complexe SecYE de *Pyrococcus furiosus*. (A) Vue de dessous montrant le vestibule cytoplasmique et le pore dont le bouchon est formé par l'hélice α en bleu au centre (plug). La voie d'insertion latérale se trouve entre les TMS 2/3 et 8/7. (B) Vue latérale avec le cytoplasme en haut et le périplasme en bas. Le chemin emprunté par la pré-protéine est indiqué par une ligne jaune. (C) Représentation de surface de deux complexes tels qu'ils ont été trouvés dans le cristal. Un complexe SecYE interagit par insertion de l'extrémité C-terminale (hélice αC en orange) dans le vestibule cytoplasmique du second complexe SecYE. Cette structure dimérique ne correspond très probablement pas au dimère *in vivo* mais la voie latérale est bien visible (Egea and Stroud, 2010).

terminer la translocation d'une protéine dont le peptide signal est déjà dans le canal et semble avoir un rôle dans l'ouverture du canal (Nouwen *et al.*, 1996).

SecD, SecF et YajC sont aussi des protéines de la membrane interne et peuvent interagir avec SecYEG. SecDF facilitent l'insertion dans la membrane et l'export de nombreuses protéines. Le rôle de YajC dans l'exportation est inconnu. Chez *E. coli*, SecD et SecF ont 6 TMS tandis que YajC n'en possède qu'un. Elles forment également un complexe, qui stimule jusqu'à 10 fois l'exportation (Nouwen *et al.*, 2001).

Une fois transloquées, les préprotéines vont, selon leur destination finale, i) être repliées par les chaperonnes périplasmiques générales telles que Skp, SurA ou DegP ou par une chaperonne spécifique (pour les protéines périplasmiques et de la membrane externe) ou ii) être insérées dans la membrane interne. Dans le premier cas, avant le repliement, le peptide signal va être clivé par LepB ou par LspA pour les lipoprotéines (Zwizinski and Wickner, 1980 ; Dev *et al.*, 1985).

L'hypothèse de l'insertion des protéines dans la membrane interne par translation latérale à partir du canal Sec a été formulée plusieurs fois. Une étude structurale vient de montrer que cela est plausible. La structure du complexe SecYE de l'archae *Pyrococcus furiosus* (Pfu) a été résolue par cristallographie aux rayons X (Egea and Stroud, 2010). Il a été montré que Secβ, l'homologue de SecG, n'est pas indispensable au processus d'exportation ; les auteurs ne l'ont donc pas joint au complexe SecYE. Cette structure révèle un canal monomérique qui subit des changements conformationnels (par rapport aux autres structures connues) pour accueillir un peptide en hélice α . Cette hélice est entourée dans le canal par trois boucles cytoplasmiques. Dans la structure, le canal semble prêt pour l'insertion latérale d'un segment transmembranaire de protéine membranaire tandis que le bouchon périplasmique obstrue le pore (Figure 9). Les auteurs de cette étude proposent un modèle d'ouverture latérale de SecYE en trois étapes grâce aux structures SecYEβ de *Methanococcus jannaschii* et *Thermus thermophilus* qui correspondraient aux états fermé et intermédiaire (Figure 10) (Egea and Stroud, 2009).

Un petit nombre de protéines de la membrane interne peuvent y être insérées de manière Sec-indépendante par YidC. Le point commun des protéines prises en charge par YidC est leur petite taille et une courte région périplasmique hydrophile. Néanmoins, YidC peut aussi fonctionner avec le translocon par l'intermédiaire de SecDFYajC avec qui elle

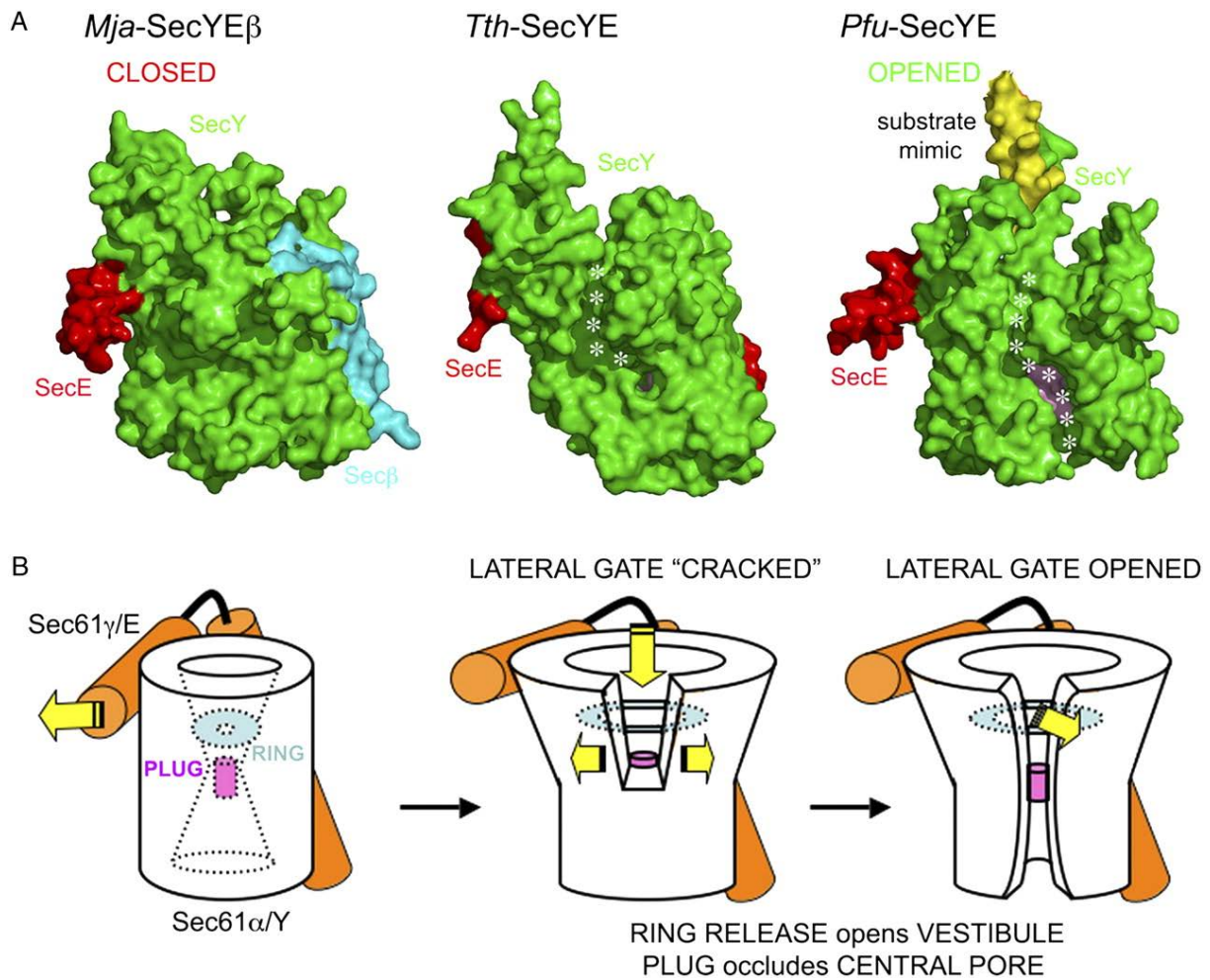


FIGURE 10 : Trois structures cristallographiques de complexes SecYE(β) de *Methanococcus jannaschii*, *Thermus thermophilus* et *Pyrococcus furiosus* pouvant représenter les trois états du translocon lors de l'insertion latérale des protéines. A) Représentations de surface des structures fermée, intermédiaire et ouverte. B) Schémas correspondants aux structures, dans lesquels le relâchement de l'anneau central du translocon et l'ouverture latérale du canal sont représentés. (Egae and Stroud, 2010).

interagit. Il a été montré que YidC est une insertase : elle est capable d'insérer seule la protéine Pf3, et joue un rôle dans le repliement correct des protéines membranaires et dans leur assemblage (Serek *et al.*, 2004 ; Dalbey *et al.*, 2004).

II.B) Le passage de la membrane cytoplasmique par le système Tat

Le système Tat (Twin-Arginine Translocation) est présent chez les eucaryotes (dans les chloroplastes de plantes) et chez les procaryotes mais il n'a pas la distribution universelle du système Sec : il n'a pas été retrouvé chez les levures, les animaux et de nombreux procaryotes (notamment ceux avec un petit génome). Sa découverte plus récente que le système Sec rend son fonctionnement moins bien connu. Il a la capacité d'exporter des protéines dans leur état replié. Globalement, le translocon est composé de TatA et TatC ou TatABC. Ces protéines forment le récepteur et le canal à travers la membrane interne. Les protéines TatE (paralogue de TatA et TatB) et TatD sont présentes chez quelques espèces et leur rôle est obscur. L'énergie nécessaire à l'exportation des protéines est fournie par la force proton motrice.

II.B.1) L'adressage des protéines à exporter par Tat

Les substrats du système Tat possèdent un peptide signal à leur extrémité N-terminale. Comme pour le système Sec, ce peptide n'est pas clivé lorsqu'il s'agit de protéines membranaires telles que les protéines de Rieske FeS des thylakoïdes chloroplastiques ou le cytochrome *bc1* chez les procaryotes et sert ensuite de segment transmembranaire (Sargent, 2007). Ce peptide signal est plus long que le peptide signal du système Sec mais a la même organisation générale : une région N chargée positivement, une région H hydrophobe et une région polaire C contenant le site de clivage de la signal peptidase (Figure 4). A l'interface des régions N et H se trouve le motif presque invariable contenant deux arginines. Chez les bactéries, ce motif serait Z-R-R-x-Φ-Φ où Z est un résidu polaire et Φ des résidus hydrophobes. La région H est moins hydrophobe que celle de Sec. La région C contient plusieurs résidus chargés positivement qui pourraient servir à éviter le système Sec (Bogsch *et al.*, 1997). Le motif double arginine est très conservé et les mutations ponctuelles dans ce motif provoquent une baisse considérable de l'efficacité de la translocation. Il existe quelques exceptions pour lesquelles la première arginine est remplacée par une lysine. La substitution

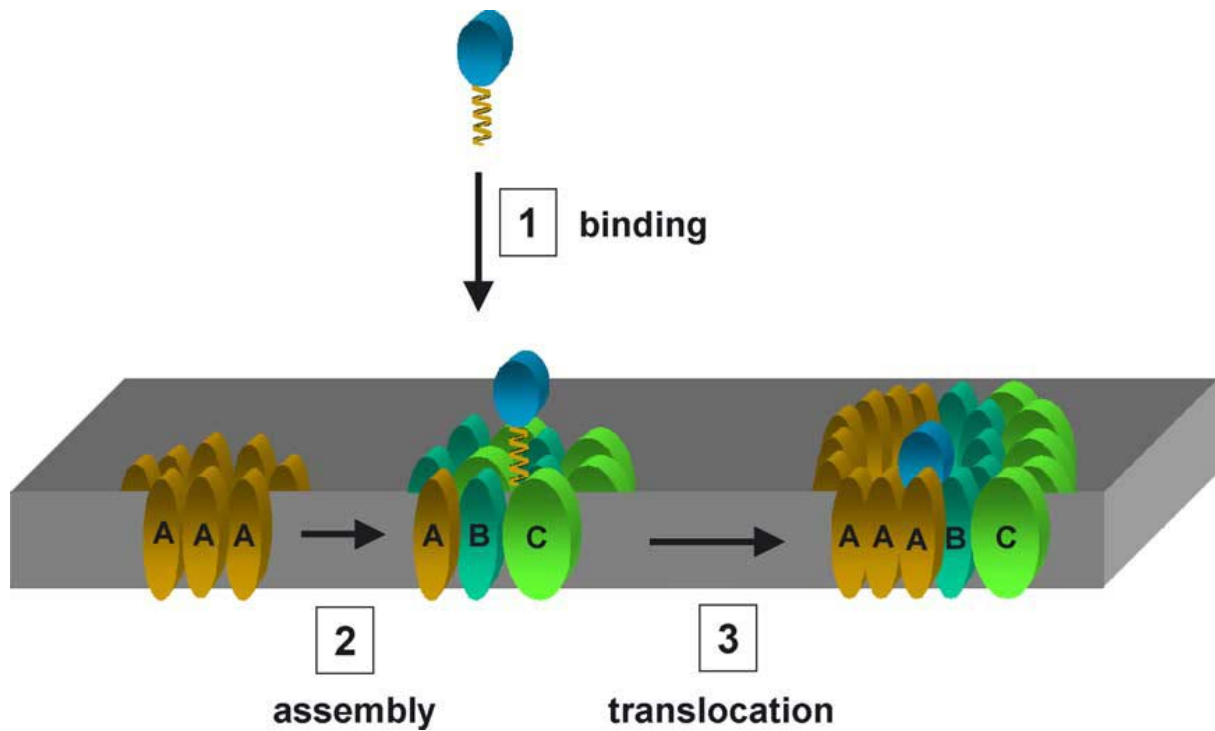


FIGURE 11 : Représentation schématique du modèle de la translocase Tat avec le regroupement de deux complexes TatA et TatBC. 1) Interaction de la pré-protéine avec le complexe TatBC ; 2) Recrutement des multimères de TatA ; 3) Formation du pore de translocation, ici proposé comme un demi-cercle de chaque complexe (Robinson and Bolhuis, 2004).

du peptide signal Tat à la place du peptide signal Sec de la protéine MexA chez *P. aeruginosa* a engendré la translocation de la protéine hybride par le système Tat (Yoneyama *et al.*, 2010) mais d'autres études ont montré au contraire que le peptide signal de TorA ne permettait pas la translocation de 7 protéines sur les 9 testées (Jack *et al.*, 2004).

La translocation des protéines par le système Tat est uniquement post-traductionnelle. De plus, seules les protéines repliées seront prises en charge par le système Tat (DeLisa *et al.*, 2004). Les substrats du système Tat se replient dans le cytoplasme grâce aux chaperonnes cytoplasmiques, notamment DnaK, GroEL et SlyD qui peuvent interagir avec le peptide signal (Graubner *et al.*, 2007) ou grâce à des chaperonnes spécifiques. La liaison de co-facteurs à certaines enzymes est permise par le repliement cytoplasmique des substrats de Tat. L'exemple le plus documenté est la TMAO réductase, codée par *torA*, qui contient une molécule de molybdène (Sargent *et al.*, 1998). Mais le système Tat ne transporte pas uniquement des enzymes à co-facteur. Par exemple, l'hydrogénase-2 d'*E. coli* est un hétérodimère de HybC, qui ne possède pas de peptide signal, et de HybO. Le dimère doit être formé dans le cytoplasme pour empêcher la translocation de HybO seul par le système Tat (Jack *et al.*, 2004). De manière surprenante, la substitution du peptide signal de HybO par celui de TorA ne permet pas la translocation du complexe actif HybC-HybO sans la surexpression de TorD, la chaperonne spécifique de TorA (Jack *et al.*, 2004). TorD se fixe sur le peptide signal et permet l'assemblage des protéines en retardant la translocation. D'autres chaperonnes spécifiques empêchent également l'initiation de la translocation avant que le co-facteur ne se soit inséré et avant le repliement et la multimérisation (Berks *et al.*, 2005). TatD, par exemple, semble être un élément important pour le « contrôle » de certains substrats d'*E. coli* (Matos *et al.*, 2009). Ce phénomène est appelé « proofreading », c'est-à-dire activité à lecture correctrice.

II.B.2) Le passage par le système Tat

Le translocon Tat peut être composé de complexe(s) qui diffèrent selon les organismes considérés (Natale *et al.*, 2008). Le translocon TatABC concerne notamment les protéobactéries et les chloroplastes. TatC est une protéine intégrale de 6 TMS et interagit avec le motif « Twin-arginine », même durant la translocation (Alami *et al.*, 2003). TatA et TatB sont très similaires : elles possèdent une région N-terminale étant très hydrophobe prédite comme permettant l'ancrage dans la membrane. TatB interagit de manière stable avec TatC et

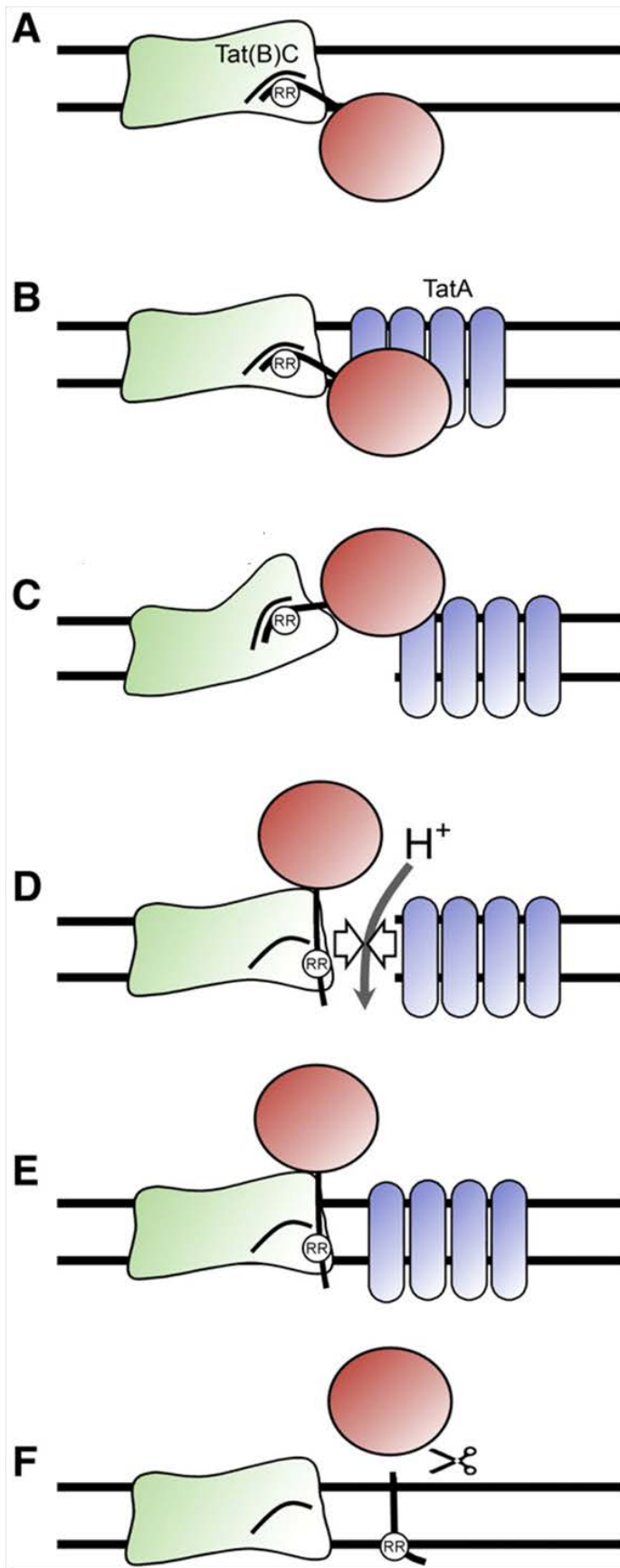


FIGURE 12 : Représentation schématique de la translocation des substrats du système Tat. A) Liaison du peptide signal au complexe TatBC. B) Recrutement de TatA et formation du pore. C) Changement conformationnel de TatBC et translocation du substrat. D) Flux de protons. E) Fermeture du pore. F) Dissociation du complexe TatBC de TatA, dissociation du peptide signal et clivage de celui-ci. (Natale *et al.*, 2008)

le complexe TatBC ainsi formé serait au moins un hétérodimère. Etant donné la différence de taille entre TatC et TatB, il est couramment admis que TatB formerait un cylindre interne avec TatC autour. Or, les substrats se lient à la périphérie du complexe, ce qui appuie l'idée de TatC à l'extérieur (Tarry *et al.*, 2009). Il a été suggéré récemment que plusieurs monomères de TatB interagissent avec une protéine à exporter (Maurer *et al.*, 2010). Des multimères de TatA (bactérienne) de différentes tailles ont été visualisés sur gel natif (Oates *et al.*, 2005). Ces complexes représentent des pores de différentes tailles formés par TatA. Ces résultats ont été confortés par les analyses de complexes TatA par microscopie électronique (Gohlke *et al.*, 2005) mais il reste à déterminer si des pores de toutes tailles sont pré-formés dans la membrane ou si la taille des pores s'adapte en fonction du substrat. Des complexes de TatA et TatB formant des pores de différents diamètres ont aussi été détectés en quantité moindre (Oates *et al.*, 2005). Il existe aussi chez plusieurs organismes les protéines TatE et TatD, qui n'a probablement pas de fonction dans le système.

Le modèle le plus courant (Sargent, 2007 ; Natale *et al.*, 2008) est (Figure 11) : A) le peptide à exporter interagit avec un complexe TatBC, B) ceci induit un changement conformationnel dans TatBC et expose un site de fixation pour TatA, qui est recrutée de manière dépendante de la force proton motrice, D) l'assemblage des trois composants Tat en cylindre avec TatA d'un côté et TatBC de l'autre permet la translocation des substrats et est accompagné par un flux de protons, peut-être dû à la fragilisation de la membrane suite au recrutement de TatA, E) la membrane se refermerait et la protéine exportée prendrait une conformation permettant F) le clivage du peptide signal et le désassemblage du complexe TatABC. Néanmoins, d'autres modèles sont proposés à partir de nombreuses études souvent contradictoires, notamment à propos du fonctionnement de TatA.

Une fois les protéines transloquées, le peptide signal des protéines solubles, qui sont la vaste majorité des substrats connus de Tat, va être clivé par LspA pour les lipoprotéines et LepB pour les autres. Les protéines membranaires seraient insérées dans la membrane cytoplasmique selon le même principe que par le système Sec. La séquence signal serait insérée latéralement dans la membrane par une ouverture de côté du complexe Tat. L'hydrophobicité des lipides induirait la formation spontanée de l'hélice α transmembranaire (Sargent, 2007).

III. Le système de sécrétion de type II : la translocation à travers la membrane externe

III. A) Généralités

III. A. 1) Répartition chez les bactéries à Gram négatif

Depuis 25 ans, le système de sécrétion de type II (T2SS) a été largement étudié dans six espèces principales : *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella oxytoca*, *Erwinia chrysanthemi*, *Aeromonas hydrophila* et *Xanthomonas campestris*. Mais les séquençages extensifs de la dernière décennie ont permis de découvrir que le système de sécrétion de type II est largement répandu chez les protéobactéries. Il semble être le plus représenté chez les γ -protéobactéries, dont font partie les six espèces citées, mais est aussi présent chez les α -protéobactéries (*Bradyrhizobium*, *Caulobacter*), chez les β -protéobactéries (*Burkholderia*, *Ralstonia*) et les δ -protéobactéries (*Geobacter sulfurreducens*). Il faut noter que le T2SS n'a pas été retrouvé chez toutes les bactéries à Gram négatif (Bactéroïdes, Spirochètes, Fusobactéries...). Il ne serait donc pas un système général de sécrétion mais plutôt un système ayant des rôles spécifiques selon la bactérie (Cianciotto *et al.*, 2005). Un noyau de plus ou moins douze composants est requis pour former un système fonctionnel. Les gènes codants pour les composants sont organisés en un ou plusieurs opérons qui contiennent souvent les mêmes gènes chez les différents organismes (Figure 13). Les gènes de la machinerie de type II sont communément appelés Gsp, faisant référence à « general secretory pathway ». En réalité, cette dénomination est basée sur une confusion du vocabulaire. Initialement, le système d'exportation Sec était aussi appelé GSP et le T2SS était appelé MTB pour « main terminal branch » du GSP. Très vite, le terme Gsp a été utilisé pour nommer la famille des gènes du T2SS. Pour le système Sec comme pour le T2SS, la dénomination est fautive, puisque le système Tat permet également l'exportation à travers la membrane interne et que les systèmes de type IV et V (ce dernier est beaucoup plus représenté que le T2SS) permettent également la translocation des protéines à travers la membrane externe (Desvaux *et al.*, 2004). Néanmoins, pour une question pratique, les familles des protéines homologues du T2SS seront appelées Gsp dans ce manuscrit.

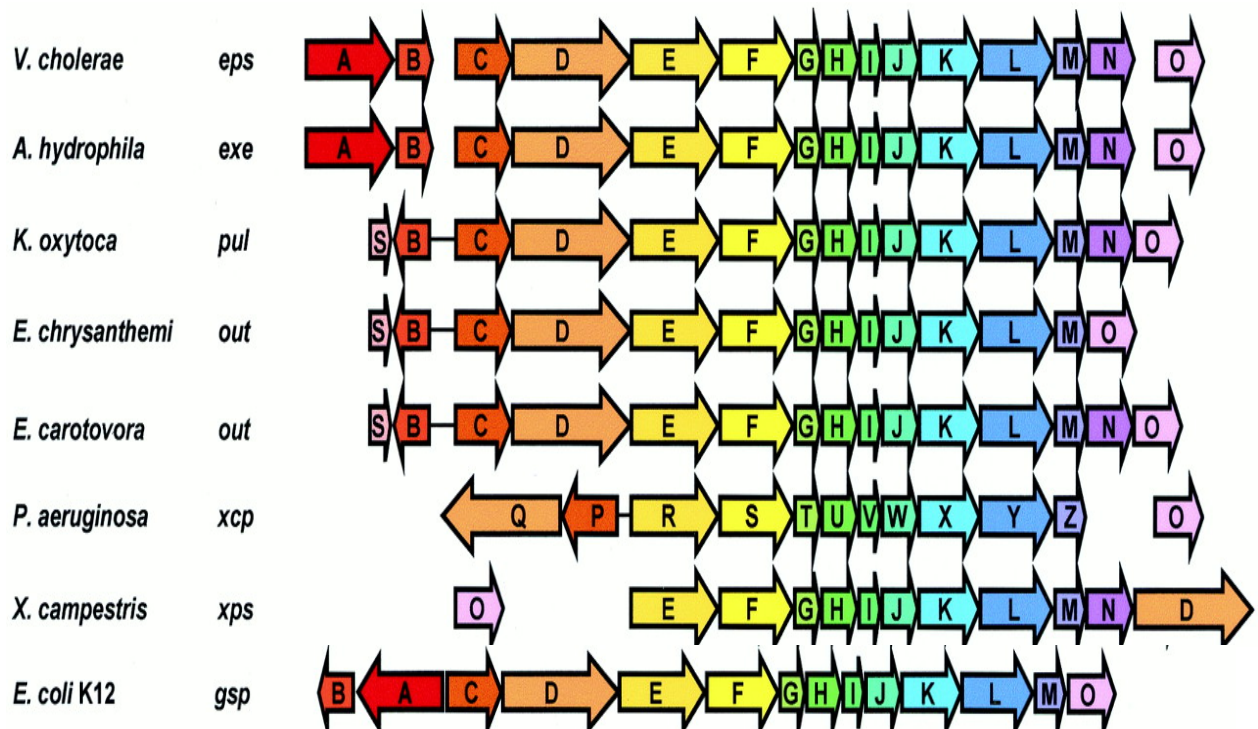


FIGURE 13 : Organisation des opérons des systèmes de sécrétion de type II. Les gènes homologues codant pour les composants des T2SS sont de même couleur. Ont été présentés les organismes dans lesquels le T2SS a été extensivement étudié : *V. cholerae*, *A. hydrophila*, *K. oxytoca*, *E. chrysanthemi*, *E. carotovora*, *P. aeruginosa*, *X. campestris* et *E. coli*. (d'après Filloux et al., 2004)

III. A.2) Rôle des systèmes de sécrétion de type II

Les systèmes de sécrétion de type II permettent la prise en charge de protéines à sécréter dans le périplasme. Ces protéines (exoprotéines) varient selon chaque système mais il s'agit principalement d'enzymes lytiques ou de toxines. Quant à leur nombre, il peut varier d'une exoprotéine (la pullulanase de *K. oxytoca*) à au moins douze (pectinases d'*E. chrysanthemi*) (Kazemi-Pour *et al.*, 2004).

Le T2SS est utilisé chez de nombreuses bactéries pathogènes pour le transport des enzymes ou toxines et est parfois un facteur de pathogénie primordial pour la bactérie. Les sécrétomes étudiés sont presque tous ceux de bactéries pathogènes :

- de l'homme (*Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Vibrio cholerae*...)
- d'animaux (*Aeromonas hydrophila*)
- ou de plantes (*Erwinia chrysanthemi*, *Xanthomonas campestris*, *Cellvibrio japonicus*) (Kazemi-Pour *et al.*, 2004 ; Gardner and Keating, 2010).

Une bactérie non-pathogène commensale de la canne à sucre, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a été caractérisée comme sécrétant la levansucrase par un T2SS (Arrieta *et al.*, 2004). Le T2SS de *Pseudomonas alcaligenes*, bactérie du sol, permet la sécrétion de la lipase A (Gerritse *et al.*, 1998) et celui d'*Acinetobacter calcoaceticus*, bactérie de l'eau et du sol, la sécrétion d'estérase et de lipase (Parche *et al.*, 1997). Les gènes codant pour le noyau de composants du T2SS ont été trouvés chez plusieurs autres bactéries non-pathogènes, dont des bactéries symbiotiques, comme *Vibrio fisheri*, symbiote du calamar, ou *Bradyrhizobium japonicum*, symbiote de plante (Cianciotto *et al.*, 2005).

Deux machineries de type II fonctionnelles, codées par des gènes homologues, ont été retrouvées chez certaines bactéries dont *P. aeruginosa*, *X. campestris* et *E. chrysanthemi*. (Ball *et al.*, 2002 ; Szczesny *et al.*, 2010 ; Ferrandez and Condemine, 2008). Le second système Hxc de type II de *P. aeruginosa* sécrète la phosphatase alcaline de faible poids moléculaire LapA, de manière indépendante du système de type II Xcp, dit principal. LapA serait sécrétée dans des conditions particulières, notamment en milieu limité en phosphate, lorsque le système Xcp ne pourrait plus s'acquitter de la sécrétion d'une autre phosphatase alcaline, PhoA (Ball *et al.*, 2002). Le second système de type II Xcs de *X. campestris* pv. *vesicatoria* ne semble pas

impliqué dans la virulence (Szczesny *et al.*, 2010). Le second système de type II Stt d'*E. chrysanthemi* sécrète une protéine homologue des pectine lyases, PnlH. Cette protéine est dépendante du système Tat pour son exportation à travers la membrane interne et serait ancrée à la face externe de la membrane externe grâce à une séquence signal inhabituelle (Ferrandez and Condemine, 2008). De plus, le système Stt n'est pas régulé par les régulateurs de synthèse de pectinases et de sécrétion (KdgR, PecS) comme le système Out, mais est réprimé par H-NS et dépendant de la température.

Outre les rôles dans les échanges avec le milieu extérieur, le T2SS a également un rôle dans l'intégrité de la membrane externe. En plus du défaut de sécrétion, les mutants de la machinerie Eps de *V. cholerae* provoquent une forte diminution de la quantité des protéines de la membrane externe OmpU, OmpT et OmpS (Sandkvist *et al.*, 1997) et l'intégrité de la membrane est compromise : une fuite du contenu périplasmique et une sensibilité accrue aux sels biliaires et à la polymyxine A ont été observées (Sikora *et al.*, 2007). Des phénomènes similaires ont été observés dans d'autres organismes. Le mécanisme par lequel le T2SS serait impliqué dans ces phénomènes est inconnu mais il a été suggéré que le T2SS pourrait participer à la biogénèse de la membrane externe. Quoiqu'il en soit, l'accumulation de protéines dans le périplasme peut provoquer la réponse au stress d'enveloppe cellulaire σE , qui limite les dommages causées par ces mutations et induit une cascade de réponses cellulaires (Sikora *et al.*, 2007).

III. A. 3) Localisation du T2SS

Quelques études se sont penchées sur la location des T2SS dans les cellules. Dans *V. cholerae*, le gène de la GFP (green fluorescent protein) a été fusionné aux extrémités 5' d'*epsL* et d'*espM*. La fluorescence a permis de détecter la présence d'EpsM et d'EspL au pôle le plus ancien du bacille (Scott *et al.*, 2001). La sécrétion de protéase correspond au locus de la fluorescence, montrant que le système de sécrétion est fonctionnel. De plus, le flagelle unique et la machinerie de sécrétion Eps s'assemblent à ce même pôle. Exprimée dans *E. coli*, seule la protéine chimère GFP-EpsM est localisée au pôle, suggérant que la protéine porte les informations nécessaires à la localisation aléatoire du système (Scott *et al.*, 2001). A l'inverse de cette première étude, l'utilisation de protéines chimères de PulL et PulM de *K. oxytoca* avec la GFP dans *E. coli* a suggéré une localisation à la circonférence de la cellule, c'est-à-dire au

niveau de la paroi (Buddelmeijer *et al.*, 2006). Dans *K. oxytoca*, les mêmes fusions ont formé quelques groupements de fluorescence mais ont été surtout également localisées à la circonférence. Ces groupements pourraient représenter la formation de systèmes fonctionnels en présence des autres composants du système. Les auteurs ont donc proposé l'hypothèse que les T2SS seraient regroupés en plusieurs sites sur l'intégralité de la surface cellulaire (Buddelmeijer *et al.*, 2006). La protéine chimérique GFP-PulG est quant à elle distribuée uniformément dans la paroi d'*E. coli* (Francetic *et al.*, 2007). Ces chercheurs ont également étudié la localisation de la sécrétine PulD en utilisant une fusion avec la RFP (Red Fluorescent Protein) (Buddelmeijer *et al.*, 2009). L'apparition uniforme de groupements fluorescents de PulD fusionnée à la RFP à la périphérie des cellules tend à démontrer la localisation de ce composant similaire à celle de PulM (Buddelmeijer *et al.*, 2006). Il n'a pas encore été démontré que les groupements fluorescents de PulD correspondaient à ceux de PulM. Enfin une dernière étude (Lybarger *et al.*, 2009) sur la localisation d'EspM et EspC dans *Vibrio cholerae*, également fusionnées à la GFP ou à la RFP, montrerait qu'effectivement les protéines sont réparties sur tout le pourtour de la membrane et forment des groupements fluorescents discrets, ce qui est complètement opposé à l'étude précédente de ces auteurs (Scott *et al.*, 2001). De plus, Lybarger et collaborateurs ont montré que la formation de groupements fluorescents GFP-EpsC et GFP-EpsM dépendent de la présence de la sécrétine EpsD.

Quant au nombre de T2SS par bactérie, il semblerait qu'il soit de l'ordre de 50 à 100 (Brok *et al.*, 1999). Tout cela reste néanmoins mal connu.

III. B) Les composants de la machinerie de sécrétion

Les séquences génomiques ont révélé l'existence de nombreux systèmes incomplets, mais les bactéries *Acinetobacter* et *Gluconacetobacter* arborent une activité de sécrétion malgré l'absence d'un ou deux gènes essentiels dans les autres systèmes. Les composants manquants pourraient être remplacés par des protéines homologues d'autres systèmes de transport comme les pili de type IV. Néanmoins, aucune sécrétion n'a été détectée chez les bactéries dont les systèmes sont encore plus réduits (Cianciotto, 2005). Dans ce chapitre sont présentés les 16 composants du T2SS : le noyau de 12 protéines et les 4 protéines qui ne sont présentes que dans certains systèmes.

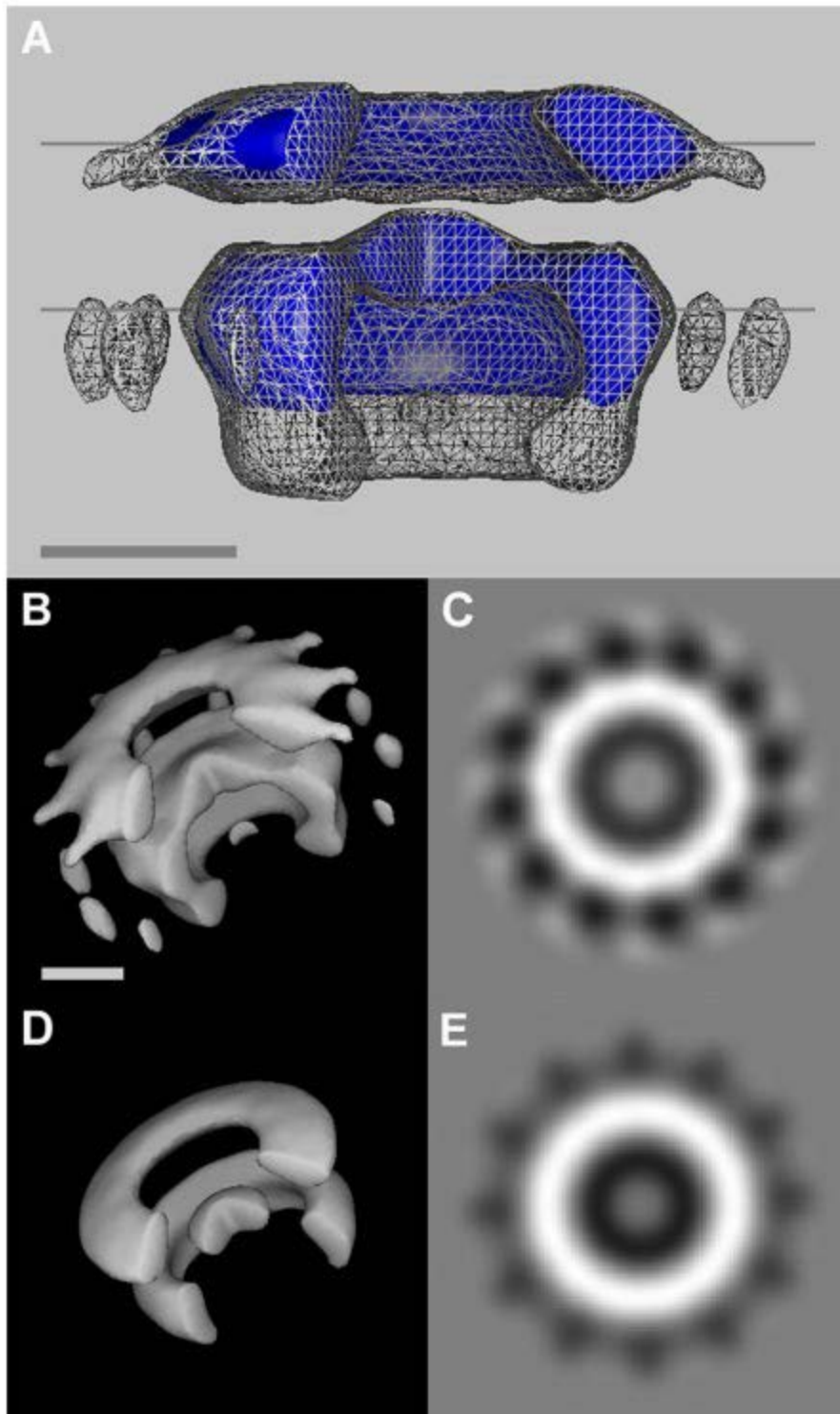


FIGURE 14 : Modélisation tridimensionnelle de la sécrétine dodécamérique PulD de *K. oxytoca*. (A) Le domaine résistant à la protéolyse (en bleu) correspond au domaine C inséré dans la membrane externe. Le domaine sensible à la protéolyse (en gris) correspond aux domaine N et domaine S (petites masses latérales). (B) Vues en perspective du multimère de PulD entier (en haut) et du domaine résistant à la protéolyse (en bas). (C) Vues axiales correspondantes. (Chami *et al.*, 2005)

III. B. 1) La sécrétine GspD et sa pilotine GspS

III. B.1.1) La sécrétine : pore de la membrane externe

La superfamille des sécrétines comprend les sécrétines du T2SS (GspD), du T3SS (YscC), les sécrétines des systèmes de sécrétion des phages filamenteux pIV et des systèmes d'assemblage des pili de type IV (PilQ) (Genin and Boucher, 1994). Le rôle de ces protéines est similaire (elles forment un pore dans la membrane externe pour la translocation de macromolécules) à tel point que chez *V. cholerae*, la sécrétine EpsD du T2SS est aussi requise pour la sécrétion du phage filamenteux CTX ϕ (Davis *et al.*, 2000). Douze à 14 sécrétines s'assemblent pour former un complexe en anneau, creux en son centre et selon une symétrie axiale. Le pore mesure entre 5 et 10 nm selon les systèmes considérés. La sécrétine PulD de *K. oxytoca* est composée de 12 protomères (Nouwen *et al.*, 1999 ; Chami *et al.*, 2005).

Monomères de GspD

La sécrétine GspD et sa pilotine OutS sont les seuls composants du T2SS à être ancrés dans la membrane externe. La protéolyse ménagée de PulD et XcpQ (GspD) et les différents degrés de conservation dans les séquences ont permis de définir deux grands domaines : le domaine C-terminal, résistant aux protéases et le domaine N-terminal (Guilvout *et al.*, 1999 ; Brok *et al.*, 1999 ; Genin and Boucher, 1994).

Le domaine C-terminal (300 à 400 résidus) est très conservé dans la superfamille des sécrétines (Brok *et al.*, 1999). Il avait été prédit comme composé de brins β transmembranaires (Pugsley, 1993 ; Bitter *et al.*, 1998) mais les analyses de ce domaine par dichroïsme circulaire ont prédit 27% de brins β uniquement (Chami *et al.*, 2005) ce qui est inhabituel dans les protéines de la membrane externe (Koebnik *et al.*, 2000). Le début du domaine résistant à la protéolyse coïncide avec le début de cette région très conservée.

Le domaine N-terminal de GspD serait majoritairement périplasmique. Le domaine N est constitué de quatre sous-domaines, N0, N1, N2 et N3. Récemment, une structure cristallographique à haute résolution des domaines N0, N1 et N2, en complexe avec un nanobody, a été résolue par diffraction aux rayons X (Korotkov *et al.*, 2009). N0 est composé de deux hélices α flanquées d'un côté de trois brins β et de l'autre de deux brins β formant un feuillet antiparallèle. Les auteurs ont remarqué l'intéressante similarité de structure entre ce

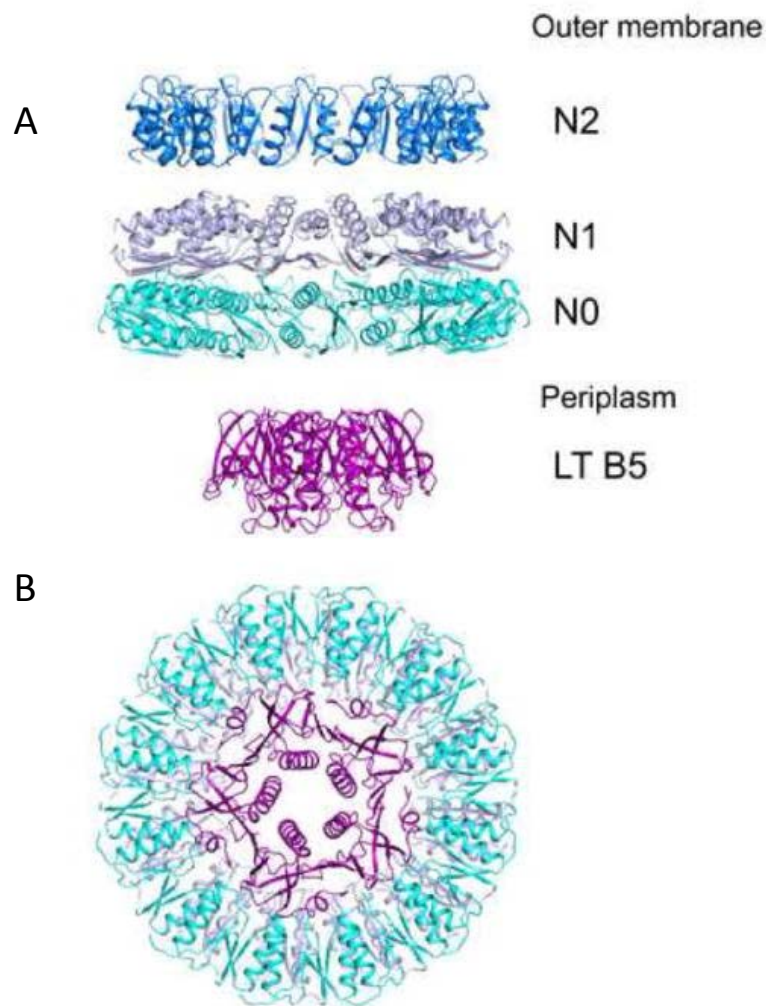


FIGURE 15 : Modèle d'anneaux dodécamériques formés par les sous-domaines de GspD. A partir de la structure des sous-domaines périplasmiques de la sécrétine GspD d'*E. coli* N0, N1 et N2, un anneau dodécamérique a été formé. Les anneaux formés par N0 et N1 respectent l'interaction formée par ces 2 sous-domaines. Le domaine N2 a dû être séparé à cause de la position du linker, qui peut ne pas refléter la réalité. (A) Vue de côté, avec le cytoplasme en haut et le périplasme en bas, dans lequel a été placée la structure de l'entérotoxine d'*E. coli* pentamérique. (B) Vue de dessous avec l'anneau formé par le domaine N0 en turquoise et l'exoprotéine en violet : l'exoprotéine est assez petite pour pouvoir passer par le pore formé par la sécrétine. (Korotkov *et al.*, 2009)

domaine N0 et celui du récepteur dépendant de TonB (TonB présente aussi des similarités avec OutC, voir aussi III.B.3.3). Alors que les deux séquences de GspD et TonB ne présentent que 14% d'identité sur les 65 résidus de N0, les deux domaines structurés se superposent avec un RMSD à 2,3 Å. Les domaines N1 et N2 présentent un repliement similaire et se superposent presque parfaitement (RMSD à 1,6 Å). Ils partagent 25% d'identité de séquence et sont composés de 2 ou 3 hélices α flanquées de 3 brins formant un feuillet β . Dans le cristal, les sous-domaines N0 et N1 interagissent étroitement. L'interface d'interaction est de 1180 Å et fait intervenir les brins β 3 de N0 et β 6 de N1, un pont salin et un groupement de résidus hydrophobes conservés (Korotkov *et al.*, 2009).

Formation du pore de la membrane externe par les multimères de GspD

La formation d'homomultimères de sécrétines a été mise en évidence par cross-linking, sédimentation sur gel ou filtration sur gel chez plusieurs homologues de la famille des sécrétines dont PulD, XpsD et pIV (Kazmierczak *et al.*, 1994 ; Chen *et al.*, 1996 ; Hardie *et al.*, 1996). Il a également été montré par gel semi-dénaturant qu'OutD forme des multimères (Shevchik *et al.*, 1997). D'ailleurs, la sécrétine pIV des phages filamenteux forme des multimères mixtes avec OutD, la sécrétine du T2SS d'*E. chrysanthemi*, probablement par le domaine C-terminal, montrant sa capacité à multimériser (Kazmierczak *et al.*, 1994). Mais PulD et pIV forment des complexes très stables non-dissociés à la chaleur ou au SDS, ce qui n'est pas le cas d'OutD (Shevchik *et al.* 1997). Un multimère très stable de XcpQ (GspD de *P. aeruginosa*) a été purifié. En microscopie électronique, XcpQ forme un anneau creux et la cavité centrale serait de 95Å (Bitter *et al.*, 1998). Par les expériences de mutagenèse, il a été déterminé que le domaine membranaire C de XcpQ est suffisant pour former ces multimères (Bitter *et al.*, 1998). Mais chez *K. oxytoca*, la formation des multimères de PulD requiert une autre région que le domaine C (Guilvout *et al.*, 1999). Cette région est tout ou partie du domaine N de PulD, qui peut efficacement être remplacé par le domaine N d'OutD. Le complexe formé par PulD est de 800 kDa et contient 12 monomères (Nouwen *et al.*, 1999). Ce complexe a pu aussi être formé *in vitro* en présence de liposomes (Guilvout *et al.*, 2008). Les monomères de PulD dépourvus de la séquence signal ont été synthétisés par traduction *in vitro*. Ces expériences, également effectuées avec OutD, renforcent les résultats obtenus dans d'autres études : ces deux sécrétines ne requièrent apparemment aucun facteur pour leur multimérisation, ce qui n'est pas le cas de PilQ, la sécrétine du système de biogénèse des pili de type IV (Guilvout *et al.*, 2008). En effet, d'une part Omp85 (ou YaeT) est absolument requis pour l'insertion de la sécrétine PilQ dans la membrane externe contrairement aux sécrétines du

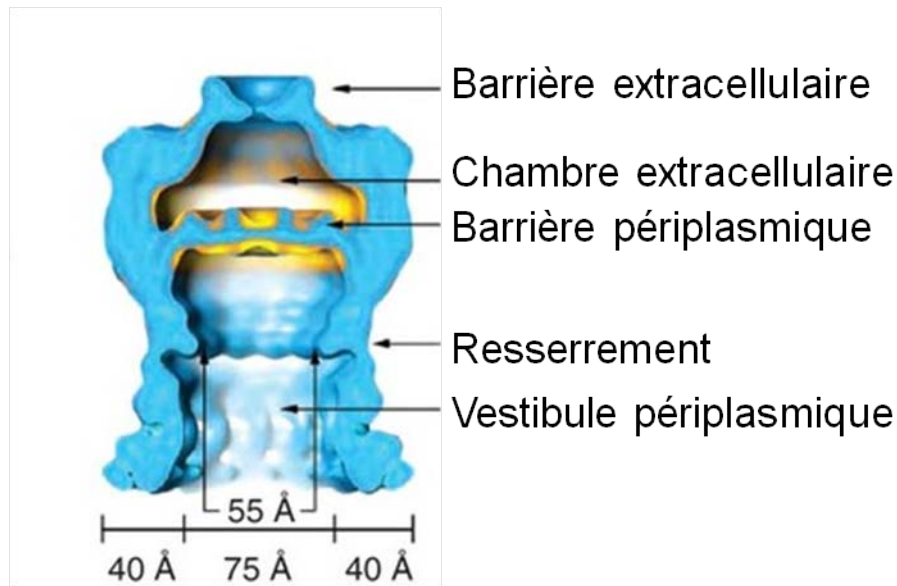


FIGURE 16 : Structure de la sécrétine EspD de *V. cholerae* dans un état « fermé ». La sécrétine serait composée de deux compartiments séparés l'un de l'autre par la barrière périplasmique et du milieu extérieur par la barrière extracellulaire. (Reichow *et al.*, 2010)

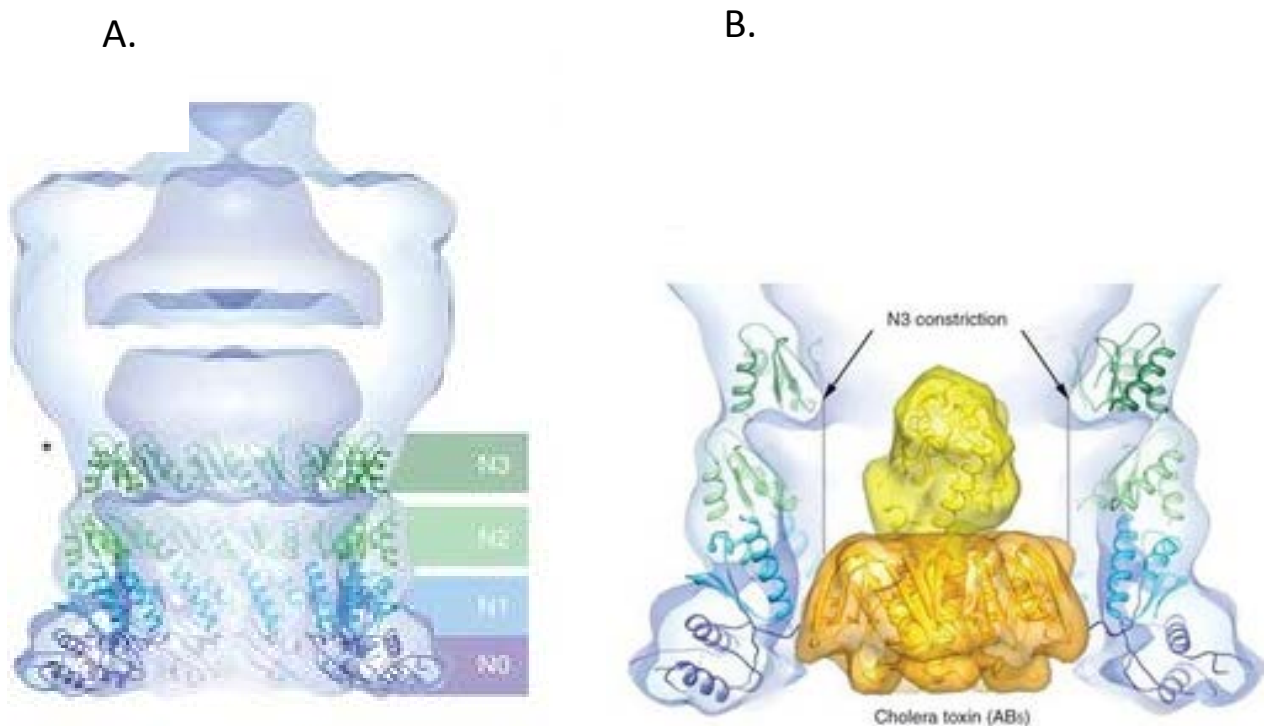


FIGURE 17 : Regroupement des structures tridimensionnelles des domaines N0, N1, N2 et la prédiction de N3 de GspD d'*E. coli* et le modèle 3D de la sécrétine dans son état « fermé ». (A) Vue d'ensemble. (B) Insertion dans ce modèle de la structure de la toxine cholérique dodécamérique, sécrétée par le T2SS Eps de *V. cholerae*. (Reichow *et al.*, 2010)

T2SS (Voulhoux *et al.*, 2003), d'autre part, les pilotines des sécrétines des pili de type IV sont nécessaires à la multimérisation de PilQ (Koo *et al.*, 2008).

Par électrophysiologie (reconstitution de la membrane par les bicouches lipidiques), il a été observé une conductance à travers le pore formé par les multimères de XcpQ (Brok *et al.*, 1999) et PulD (Nouwen *et al.*, 1999). Tout d'abord, d'après les images obtenues par microscopie électronique, il a été proposé que le pore serait fermé par une partie du domaine N (Nouwen *et al.*, 2000). La structure tridimensionnelle du complexe formé par PulD a été résolue par cryo-microscopie électronique à une résolution de 12 Å (Chami *et al.*, 2005). Un modèle 3D de ce complexe a été généré : le contour extérieur du dodécamère prend la forme d'une tasse avec sa soucoupe à l'envers. Deux anneaux séparés par un disque forment une large chambre (Figure 14). Le domaine C forme l'anneau supérieur (la soucoupe) ainsi que le disque bouchant le pore tandis que le domaine N forme l'anneau inférieur. Dans cette étude, il est apparu que le pore est fermé non pas par une partie du domaine N mais par le domaine C. Ceci explique pourquoi la conductance électrique du multimère de la sécrétine insérée dans une bicouche lipidique n'augmente pas après élimination du domaine N par protéolyse (Brok *et al.*, 1999). Le modèle le plus probable serait que l'anneau supérieur sortirait de la membrane externe, expliquant ainsi le faible pourcentage de brins β dans le domaine C et laissant l'espace nécessaire dans le périplasme au passage des exoprotéines, puis les exoprotéines entreraient dans la première chambre formée par le domaine N et leur présence ou l'extension du pseudopilus pourrait ouvrir le pore et permettre leur passage (Chami *et al.*, 2005).

Récemment, Korotkov et associés ont déterminé la structure du domaine N-terminal de la sécrétine GspG de *V. cholerae* à haute résolution. Ces résultats ont permis de proposer un modèle d'arrangement des multimères de GspD à partir des structures des domaines N0, N1 et N2. En se basant sur les études de microscopie électronique de PulD, une symétrie de 12 a été choisie. Les domaines N0 et N1 et le domaine N2 peuvent former une structure cylindrique mais indépendamment car la position du linker ne permet pas de les assembler (Figure 15). Ceci peut être un artefact dû à la présence des nanobody dans la structure cristallographique. Un espace dans N0 pouvant interagir avec un brin β reste disponible dans ce modèle (Korotkov *et al.*, 2009). Une récente étude de cryomicroscopie électronique sur GspD chez *V. cholerae* a permis de déterminer la longueur (du périplasme au milieu extracellulaire : 200 Å) et le diamètre (155 Å) du dodécamère formé par cette sécrétine (Reichow *et al.*, 2010). Ces dimensions sont équivalentes à celles déterminées pour la sécrétine PulD (Chami *et al.*, 2005). La longueur de la région périplasmique correspond à 62% de la longueur totale, soit 125 Å. La

sécrétine serait composée d'un vestibule périplasmique de 75 Å de diamètre et dont les côtés seraient d'une épaisseur de 40 Å suivie de la barrière périplasmique plus étroite (55 Å) et la chambre extracellulaire (100 Å) qui serait elle aussi fermée par la barrière extracellulaire de seulement 10 Å. Un resserrement apparaît juste avant la barrière périplasmique (Figure 16) (Reichow *et al.*, 2010). Cette construction ressemble beaucoup à la sécrétine des T3SS, avec l'aiguille en moins et un vestibule qui n'atteint pas la membrane interne (Marlovits *et al.*, 2004). Ainsi, la sécrétine peut être dans un état « fermé ». Un modèle, regroupant la structure cristallographique des domaines N0, N1, N2 et la prédiction de N3 de GspD (Korotkov *et al.*, 2009) et le modèle 3D du dodécamère formé par la sécrétine, a été proposé et est présenté dans la figure 17 (Reichow *et al.*, 2010). La protéine sécrétée, l'hétérohexamère de la toxine cholérique a été placée dans le vestibule périplasmique.

III.B.1.2) La pilotine GspS

Le facteur d'assemblage des protéines de la membrane externe, YaeT ou Omp85, est essentiel pour l'insertion et la multimérisation de nombreuses protéines de la membrane externe y compris la sécrétine PilQ des pili de type IV (Voulhoux *et al.*, 2003) mais n'aurait aucun rôle sur l'assemblage de PulD, la sécrétine du T2SS de *K. oxytoca* (Collin *et al.*, 2007). Il semble que les sécrétines de certains T2SS aient leur propre chaperonne. Dans *E. chrysanthemi*, *K. oxytoca* et *E. coli*, il existe une telle protéine GspS dont le gène correspondant se trouve dans un des opérons codant pour les composants du T2SS (Figure 13).

PulS et OutS sont deux lipoprotéines nécessaires pour la stabilisation et l'insertion dans la membrane externe des sécrétines PulD et OutD respectivement (Hardie *et al.*, 1996 ; Shevchik and Condemine, 1998). En l'absence de PulS, PulD est insérée dans la membrane interne dans laquelle elle forme un dodécamère (Guilvout *et al.*, 2006). La microscopie électronique indique que les complexes semblent être correctement formés. GspS pourrait donc empêcher la multimérisation de la sécrétine dans la membrane interne et surtout sa dégradation dans le périplasme.

OutS et PulS interagissent toutes deux avec l'extrémité C-terminale des sécrétines (Daeﬂer *et al.*, 1997a ; Shevchik and Condemine, 1998). Après protéolyse ménagée de la sécrétine, PulS est incapable de se fixer à PulD : le domaine C-terminal de PulD ne possède plus cette petite région appelée domaine S (Nouwen *et al.*, 2000). Cette extrémité d'une soixantaine de résidus

est peu conservée. En périphérie de la structure de PulD définie par cryo-microscopie électronique, de petites masses sont présentes à l'interface entre le périplasme et la membrane externe. Elles font partie des régions dégradées par la protéolyse et leur masse correspondrait à celle du domaine S (Figure 14) (Chami *et al.*, 2005).

Si GspS n'est pas retrouvé dans tous les T2SS, d'autres protéines avec des fonctions similaires à celles de PulS et OutS ont été identifiées. La sécrétine MxiD du T3SS de *Shigella flexneri* multimérise et ne s'insère dans la membrane externe qu'en présence de sa protéine pilote essentielle MxiM. MxiM est une lipoprotéine ancrée à la membrane externe par son côté N-terminal lipidique. La structure cristallographique de cette protéine a montré un repliement en pseudo tonneau β avec une cavité pouvant lier certains lipides (Lario *et al.*, 2005). D'après les expériences d'ITC (isothermal titration calorimetry), MxiM pourra se lier aux lipides et à la sécrétine (Lario *et al.*, 2005). Ces données suggèrent que GspS pourrait également interagir avec les lipides de la membrane. La présence essentielle d'une séquence signal de type lipoprotéine dans OutS va dans ce sens (Shevchik and Condemine, 1998). Dans les systèmes dans lesquels GspS n'est pas présente, la sécrétine pourrait s'associer elle-même à la membrane après avoir été conduite jusqu'à la membrane externe par le système Lol. Dans ce sens, les sécrétines HxcQ chez *P. aeruginosa* et XpsD chez *X. campestris* sont elles-mêmes des lipoprotéines (Ball *et al.*, 2002 ; Hu *et al.*, 1995).

III. B. 2) Le pseudopilus

III.B.2.1) Précurseurs de pseudopilines et prépiline peptidase

Les pseudopilines GspG, GspH, GspI, GspJ et GspK (nommées d'après leur homologie avec les pilines des pilus de type IV T4P) sont impliquées dans la formation d'un pseudopilus court (qui ne dépasserait pas le périplasme). Elles sont composées i) d'une longue hélice $\alpha 1$ N-terminale (dont la première partie est hydrophobe et ressemble à un peptide signal classique), ii) d'une région globulaire composée de l'extrémité de l'hélice $\alpha 1$ et d'un feuillet β de 3 ou 4 brins β , et enfin iii) d'une boucle $\alpha\beta$ qui relie l'hélice $\alpha 1$ au premier brin β du feuillet. Les pseudopilines sont synthétisées sous forme de précurseurs (Pugsley and Dupuy, 1992). A leur extrémité N-terminale, un peptide signal de 6 ou 7 résidus similaire à celui des pilines de type IV va être clivé par une prépiline peptidase. Le peptide signal est chargé positivement et assure une insertion correcte des pseudopilines dans la membrane interne d'après la règle des résidus

chargés positivement à l'intérieur « positive-inside » (von Heijne, 1989). Ce peptide signal est situé juste avant la séquence conservée G|FTXXE (dans laquelle X représente un résidu hydrophobe, généralement une leucine ou une isoleucine). La coupure du peptide signal se fait après la glycine par une prépiline peptidase GspO. Pugsley et Dupuy ont montré que ce clivage pouvait être post-traductionnel. Après son clivage, les pseudopilines restent insérées dans la membrane interne par la séquence signal hydrophobe mais deviennent compétents pour l'assemblage dans un pilus (Francetic *et al.*, 2007 ; Arts *et al.*, 2007). La séquence signal très hydrophobe des prépilines permet donc à la fois l'exportation à travers la membrane interne par les systèmes SRP et Sec puis l'ancrage dans cette membrane et enfin l'assemblage des pseudopilines en pilus. La région hydrophobe s'insère dans la membrane interne, plaçant ainsi la région variable C-terminale dans le périplasme. Cette topologie est indispensable pour la reconnaissance et la maturation des prépilines (Strom and Lory, 1987). Ce sont des monomères de PulG qui sont retrouvés dans la membrane interne. Chez *K. oxytoca*, la prépiline peptidase PulO clive le peptide signal et ajoute un groupement méthyl en N-terminal de la pseudopiline PulG. La topologie d'OutO (GspO chez *Erwinia carotovora*) a été déterminée par l'utilisation de la β -lactamase BlaM. Huit TMS traversent la membrane interne et les TMS 1 et 2 sont séparés par une grande boucle cytoplasmique (Reeves *et al.*, 1994). Au moins certaines prépiline peptidases semblent interchangeable : PulG peut être maturée efficacement dans *E. coli* par la peptidase PppA d'*E. coli* (Francetic *et al.*, 1998). PppA complémente également un mutant *pulO* de *K. oxytoca*. En revanche, une autre prépiline peptidase XcpA n'est pas capable de cliver le peptide signal de PulG (Pugsley and Dupuy, 1992). Chez *P. aeruginosa* et *A. hydrophila*, l'inactivation des prépilines peptidases PilD et TapD du système T4P empêche la formation des T4P mais aussi la sécrétion de l'élastase et de l'aérolysine respectivement, par le T2SS. PilD/XcpA et TapD/ExeO assurent donc la fonction de peptidase dans les deux systèmes (Nunn and Lory, 1991).

III. B. 2.2) La pseudopiline majeure

GspG est la pseudopiline majeure : le ratio de GspG:GspH:GspI:GspJ a été estimé à 16:1:1:4 (Nunn *et al.*, 1993). Elle s'assemble pour créer une structure multifibrillaire (Sauvonnet *et al.*, 2000). La similarité de GspG avec la piline majeure de type IV a laissé supposer que, comme dans ce système, les protomères de GspG s'assemblaient par interaction des TMS (Craig *et al.*, 2006). Le pseudopilus traverserait les deux membranes, car GspG est

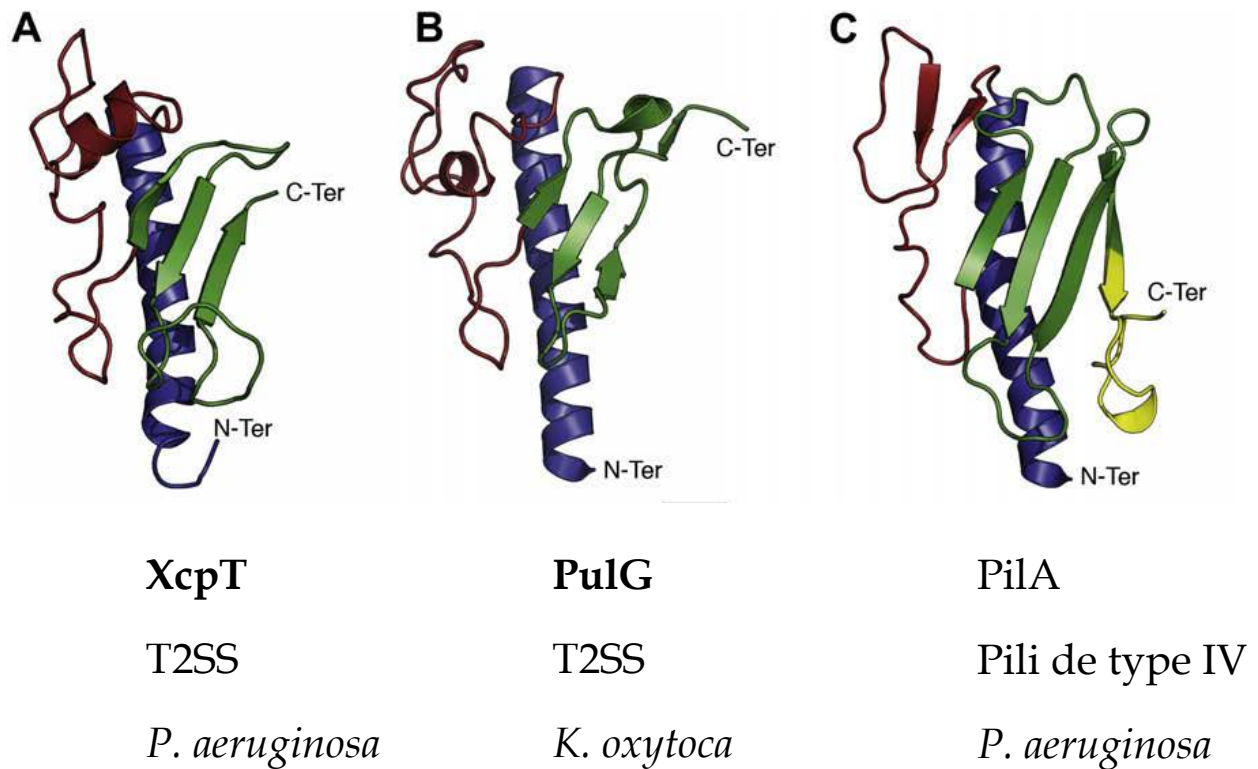


FIGURE 18 : Structures de différentes (pseudo)pilines majeures. (A) structure du domaine soluble de XcpT, résolue par RMN. (B) structure du domaine soluble de PulG, résolue par cristallographie. (C) structure du domaine soluble de la piline majeure PilA des pili de type IV, de *P. aeruginosa* PAK. Les structures sont présentées selon la même orientation. La partie soluble de l'hélice α est représentée en bleu, le domaine variable en vert, la boucle $\alpha\beta$ en rouge et le domaine D, présent uniquement dans les pilines en jaune. (Alphonse *et al.*, 2010)

retrouvé dans les fractions de membrane cytoplasmique et externe (Hu *et al.*, 2002). La surexpression de GspG provoque l'apparition de longs pili (hyperpseudopili), considérés comme l'élongation incontrôlée du pseudopilus et présentant de grandes similarités avec les pili de type IV (Vignon *et al.*, 2003 ; Köhler *et al.*, 2004). Le rendement de sécrétion est diminué en présence d'hyperpseudopilus. Il apparaît donc que l'obstruction du pore de la sécrétine par l'hyperpseudopilus n'est pas un phénomène physiologique et que probablement le pseudopilus ne dépasse jamais la membrane externe (Durand *et al.*, 2003). Le corps du pseudopilus est formé de monomères assemblés de GspG (Durand *et al.*, 2005). GspH, GspI, GspJ et GspK sont ainsi considérées comme les pseudopilines mineures. Aucune d'entre elles n'est capable, une fois surexprimée, de former un hyperpseudopilus comme GspG (Durand *et al.*, 2005). Chez *X. campestris*, XpsG interagirait avec la sécrétine XpsD et XpsN (GspC), comme l'ont montré les expériences de cross-linking (Lee *et al.*, 2005) mais la sécrétine n'est pas requise pour la formation du pseudopilus (Vignon *et al.*, 2003). C'est donc au moment de la translocation des exoprotéines qu'il aurait contact entre le pseudopilus et la sécrétine. La région variable hydrophile de GspG ne possède pas le domaine « D » des pilines de type IV contenant deux cystéines hautement conservées. Or ce domaine D est très probablement impliqué dans l'attachement des pili de type IV à une surface extracellulaire. Ceci suggère que le pseudopilus a un rôle de piston uniquement dans le T2SS (Alphonse *et al.*, 2010). Les structures des domaines solubles de PulG et de XcpT (GspG) ont été résolues respectivement par RMN et cristallographie aux rayons X (Köhler *et al.*, 2004 ; Alphonse *et al.*, 2010). Les deux protéines PulG et XcpT partagent 52% de similarité de séquence mais quelques différences sont notées : la plus importante est la présence de trois brins β pour XcpT contre quatre pour PulG (Figure 18). La région variable entre l'hélice α et les éléments du feuillet β est appelée boucle $\alpha\beta$. Les comparaisons de séquence des pseudopilines majeures ont permis de mettre à jour une séquence consensus. La séquence LP{1}DPWG{2}Y très conservée parmi les bactéries possédant le T2SS a été trouvée dans la région C-terminale de cette boucle $\alpha\beta$ des pseudopilines majeures mais ni dans les pilines de type IV, ni dans les pseudopilines mineures (Alphonse *et al.*, 2010). Justement, cette région conservée contient deux aspartates (et 4 résidus apportant un groupement carboxyl) qui engendrent un site de fixation au calcium, comme l'ont présenté Korotkov et collègues dans EpsG chez *V. cholerae* (Korotkov *et al.*, 2009). Ce site est essentiel pour la fonction de la protéine (la mutation des deux aspartates en alanines entraîne un arrêt de la sécrétion) mais son rôle précis reste à définir.

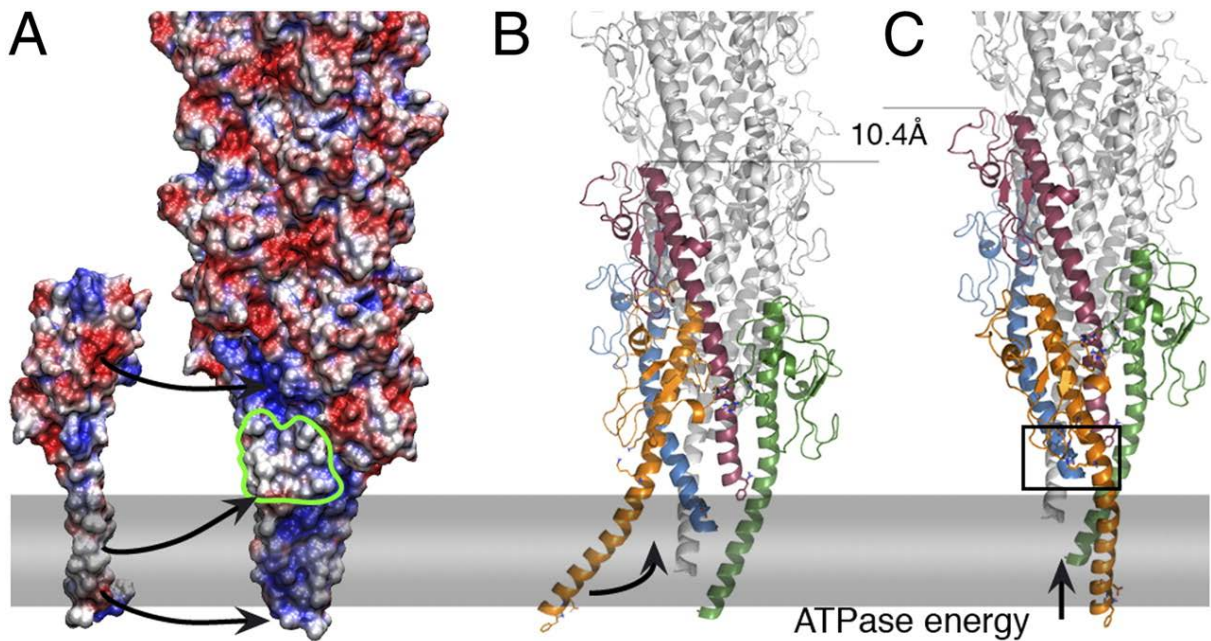


FIGURE 19 : Modèle d'assemblage du pseudopilus de *K. oxytoca*. (A) Enveloppe électrostatique du pseudopilus et d'un monomère de PulG (à gauche) . Les flèches indiquent les interactions ioniques permettant l'accrochage du monomère P avec P+3 et P+4 et la région permettant les interactions hydrophobes est surlignée en vert. (B) et (C) Incorporation d'un nouveau protomère P (en orange), résultant en l'extraction du protomère P+1 de la membrane (en vert). L'incorporation d'un protomère augmente la taille du pilus de 10, 4 Å. (Campos *et al.*, 2010)

Très récemment, le regroupement des données structurales disponibles sur PulG et ses homologues a permis de créer le modèle le plus probable d'assemblage du pseudopilus. La structure de la région soluble de PulG et les données acquises par STEM (scanning transmission electron microscopy) (Köhler *et al.*, 2004) ainsi que la structure du TMS de PilA, piline majeure du T4P (Craig *et al.*, 2006) et les données sur les 20 résidus en C-terminal de GspG, contenant un site de fixation au calcium (Korotkov *et al.*, 2009) ont été utilisés pour tester un millier de possibilités d'assemblage des protomères de PulG (Campos *et al.*, 2010). Le groupe principal, loin devant les autres groupes, a été considéré comme le groupe de modèles le plus probable et donc correct. Les interactions entre protomères dans ce modèle ont été vérifiées expérimentalement par cross-linking oxydatif ou inversion de charges, ce qui a abouti à un ensemble de modèles de pseudopilus au sens giratoire droit, très semblable au modèle des pilines de type IV. Chaque tour d'hélice contient 4,25 sous-unités et le diamètre extérieur est de 65 Å. Chaque protomère P interagit avec P+1, P+3, P+4 et P-1, P-3 et P-4, par interactions électrostatiques et hydrophobes. Le coude formé par la proline P22 dans l'hélice α est essentiel à la fonction du pilus. Un mutant *pulG* P22A est moins pilié et moins efficace dans la sécrétion. Enfin, dans ce modèle, l'insertion d'un nouveau protomère PulG augmente la taille du pseudopilus de 10,4 Å (Figure 19) (Campos *et al.*, 2010).

III.B.2.3) Les pseudopilines mineures

Il avait été suggéré que les pseudopilines mineures serviraient de base au pilus ou qu'elles seraient des initiateurs/régulateurs de la biogenèse du pilus ou encore des adaptateurs entre les pseudopilines et les autres composants (Kuo *et al.*, 2005). En fait, GspI serait la seule pseudopiline nécessaire à l'initiation de l'élongation du pseudopilus (Durand *et al.*, 2005). GspK semble avoir un rôle crucial dans le contrôle du pseudopilus bien que non indispensable. En effet, le nombre et la longueur des pseudopili augmentent considérablement dans un mutant *xcpX* (*gspK*) et XcpT (GspG) devient sensible aux protéases en la présence de XcpX (GspK) (Durand *et al.*, 2005). GspK interviendrait donc pour stopper l'élongation. OutJ interagit avec la sécrétine OutD et avec OutL en double-hybride levure (Douet *et al.* 2004). Chez *X. campestris*, la surexpression de GspJ et GspH empêche la formation de l'hyperpseudopilus observée après surexpression de GspG seul (Kuo *et al.*, 2005). GspJ et GspH auraient aussi un effet négatif sur l'élongation du pseudopilus. Pour que le processus de sécrétion puisse être recommencé, il est nécessaire qu'il y ait dégradation ou rétractation du pseudopilus. GspK,

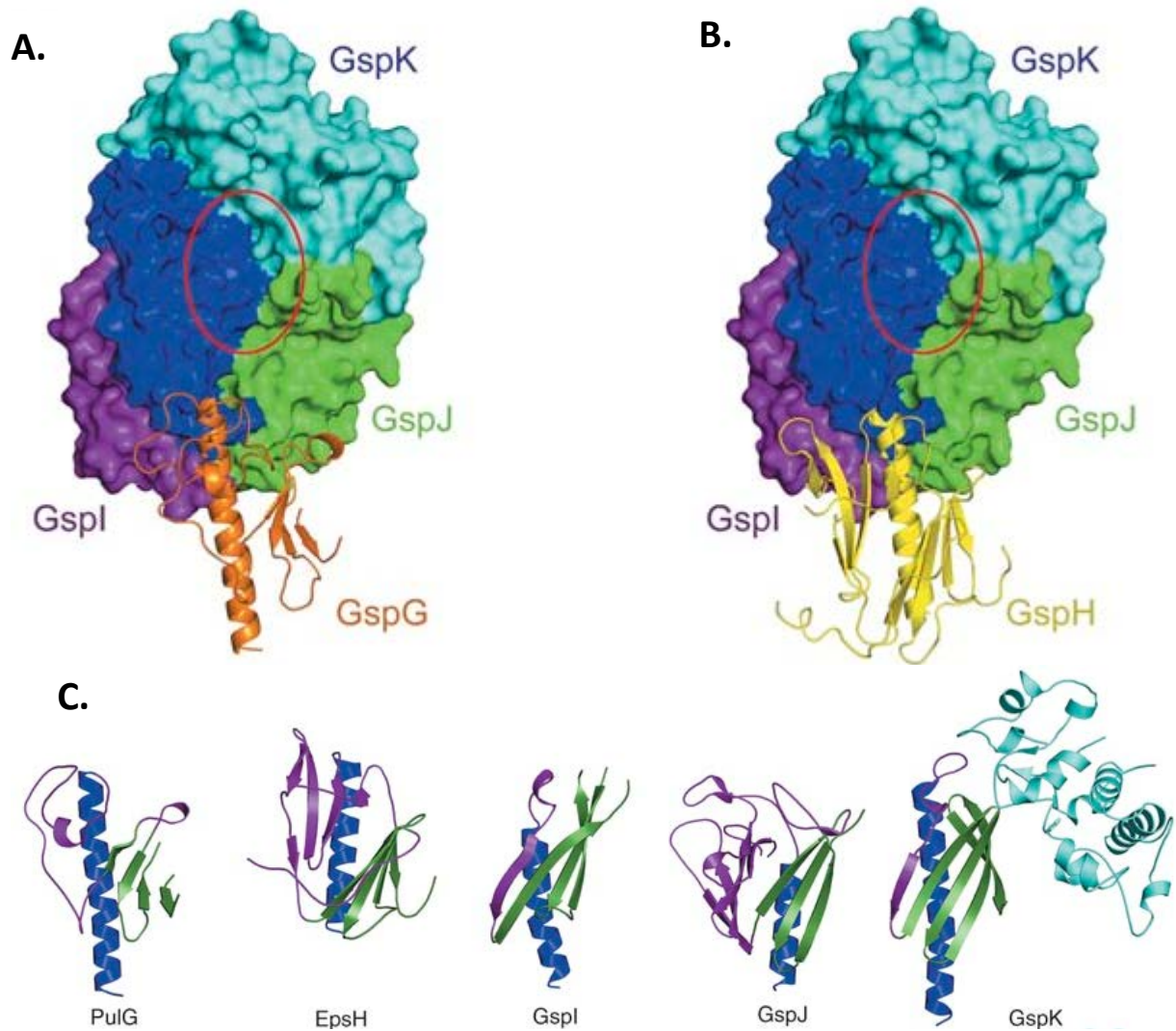


FIGURE 20 : Modèle d'organisation des pseudopilines mineures GspI, GspJ et GspK selon la structure cristallographique hétérotrimérique de ces protéines. (A) Représentation du complexe GspI-J-K dans lequel GspI est en violet, GspJ en vert et GspK en bleu, avec le domaine α en bleu clair et dans lequel GspG, à partir de la structure de PulG, a été ajouté par le bas (en orange). (B) Le même modèle avec une insertion d'une unité de GspH (en jaune). (C) Structure de la pseudopiline majeure PulG, et des pseudopilines mineures EpsH, GspI, GspJ et GspK. (Korotkov and Hol, 2008)

GspJ et GspH pourraient en être la cause (Vignon *et al.*, 2003). Enfin, GspH possède la plus large région variable. La protéine entière, mais pas son domaine soluble, interagit avec la pseudopiline majoritaire GspG (Kuo *et al.*, 2005). Le TMS de GspH est nécessaire à cette interaction.

Deux structures du complexe GspI/GspJ ont été obtenues par cristallographie (Yanez *et al.*, 2008 ; Lam *et al.*, 2009). Les deux structures adoptent une forme hélicoïdale à droite mais diffèrent sur l'angle adopté par les deux protéines en interaction. Ceci peut refléter la flexibilité des interactions et pourrait avoir une signification physiologique. La structure du domaine soluble d'EpsH de *V. cholerae* a révélé une crevasse dans le domaine variable, dont les résidus sont très conservés parmi les homologues d'EpsH (Yanez *et al.*, 2008). Dans un essai de modélisation qui conviendrait le mieux avec la structure cristallographique de PulG (Köhler *et al.*, 2004), EpsH se trouverait sur le haut du pseudopilus et la crevasse serait accessible à d'autres interactions (Yanez *et al.*, 2008). La structure cristallographique, résolue par rayons X, du complexe hétérotrimérique GspI-GspJ-GspK a montré que ces trois pseudopilines mineures adoptent une forme canonique composée d'une hélice α entourée de brins β (Korotkov and Hol, 2008). En ne prenant pas en compte les domaines variables des pseudopilines qui sont, comme leur nom l'indique, très différents, les hélices α des trois protéines dans le complexe adoptent une structure hélicoïdale au sens giratoire droit. Une sous-unité de GspG ou de GpsH (mais pas de GspJ ou GspI) peut s'intégrer au complexe par le bas de celle-ci, mais pas par le haut (Figure 20). L'ensemble de ces données poussent à la conclusion que ce trimère composé de GpsI-J-K serait le « chapeau » du pilus dont l'extension se ferait par l'ajout de GspG par le bas. Cette structure cristallographique a également permis de mettre en évidence dans GspK un domaine de 185 résidus formé de 11 hélices α très courtes. Ce domaine, appelé domaine α , est unique parmi les pseudopilines et forme une « poche » sur le dessus du complexe dans laquelle GspG ne peut pas s'emboîter (Figure 19, cercle rouge). Elle pourrait être un site d'interaction avec les exoprotéines ou les autres composants de la machinerie (Korotlov and Hol, 2008).

Récemment, par résonance plasmonique de surface (BIAcore) et par chromatographie d'affinité, il a été montré que le domaine soluble de XcpT (GspG) ne se liait à aucun domaine soluble des quatre pseudopilines mineures, ni à lui-même (Douzi *et al.*, 2009). Des interactions importantes ont dû être manquées du fait de l'absence de la région hydrophobe. Or, la formation du corps du pseudopilus se ferait par interaction des segments hydrophobes. Néanmoins, il a pu être montré par ces techniques que XcpV-W-X (GspI-J-K) forme un complexe ternaire dans lequel XcpV sert de lien entre XcpW et XcpX grâce à deux sites

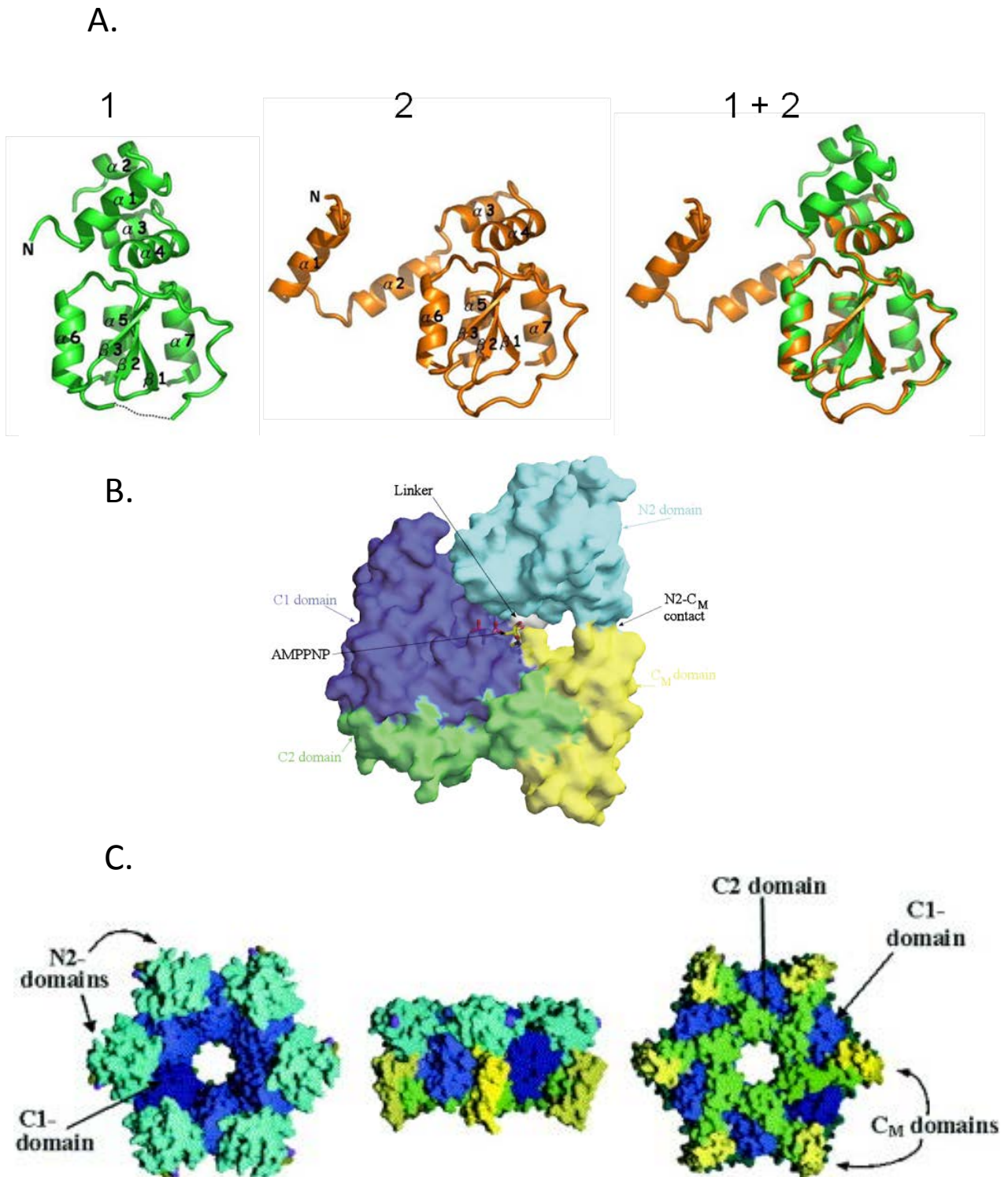


FIGURE 21 : Structure tridimensionnelle de GspE. (A) Structure de la région N-terminale (résidus 1-152) de XpsE de *X. campestris* dans les deux formes présentes dans les cristaux 1 et 2 et la superposition des deux structures 1+2 (Shiue *et al.*, 2007). (B) Structure d'EpsE tronquée d'une partie du domaine N-terminal (résidus 91-503) de *V. cholerae* (Robien *et al.*, 2003) (C) Modèle hexamérique en anneau d'EpsE. Vue de dessus qui serait en contact avec la face interne de la membrane interne, de côté et de dessous du modèle. (Robien *et al.*, 2003)

d'interaction différents. Au final, ce complexe est probablement quaternaire car XcpU (GspH) interagit uniquement mais directement avec XcpW (GspJ). Cette interaction est plus forte lorsque XcpW est déjà lié à XcpX et XcpV (Douzi *et al.*, 2009). Ainsi, GspH viendrait se fixer en dernier sur la base du « chapeau » du pseudopilus et ferait le lien entre ce chapeau et le corps du pseudopilus, formé par GspG. Notons que les régions solubles des pseudopilines OutH et OutJ forment des homodimères en double-hybride levure (Douet *et al.*, 2004). A l'heure actuelle, le degré de multimérisation *in vivo* de chaque pseudopilines mineures n'est pas connu.

Les travaux très récents sur GspD valideraient ce modèle de chapeau : par résonance plasmonique de surface, une interaction entre la région périplasmique de GspD d'*E. coli* et le complexe trimérique GspK-GspI-GspJ vient d'être montrée (Reichow *et al.*, 2010).

III.B.3) Les protéines associées ou intégrales de la membrane interne

III.B.3.1) L'ATPase GspE : fournisseur d'énergie

GspE est l'unique composant du T2SS à posséder un motif de fixation à l'ATP, composé des boîtes Walker A et Walker B, et des boîtes Asp et His, dont la première est indispensable au fonctionnement de GspE (Turner *et al.*, 1993). Cette protéine fait partie de la superfamille des NTPases de sécrétion GspE/VirB11 qui comprend les ATPases requises pour les systèmes de sécrétion de type II et IV, ainsi que pour la biogénèse des pili de type IV (Planet *et al.*, 2001). GspE est capable de s'auto-phosphoryler (Sandkvist *et al.*, 1995). Son activité ATPase, bien que faible, a été démontrée chez *V. cholerae* et *X. campestris* pv. *campestris* (Camberg et Sandkvist, 2005 ; Shiue *et al.*, 2006). Elle est donc considérée comme le moteur énergétique du système. GspE est une protéine cytoplasmique associée à la membrane cytoplasmique grâce à l'interaction de son domaine N-terminal (GspE_N) avec le domaine N-terminal cytoplasmique de GspL (GspL_N) (Py *et al.* 1999). Le motif de fixation à l'ATP est dans le domaine C-terminal de GspE (GspE_C). Le processus de sécrétion est interrompu dans les mutants *gspE* complémentés par GspEΔN (Ball *et al.*, 1999 ; Possot *et al.*, 2000 ; Chen *et al.*, 2005). Ce dérivé de GspE ne peut plus interagir avec GspL_N en pull-down.

Structure et multimérisation de GspE

La structure 3D du domaine N-terminal de XpsE a révélé deux types de conformation (Chen *et al.*, 2005). Les hélices α1 et α2 sont à des places très différentes dans les deux types de

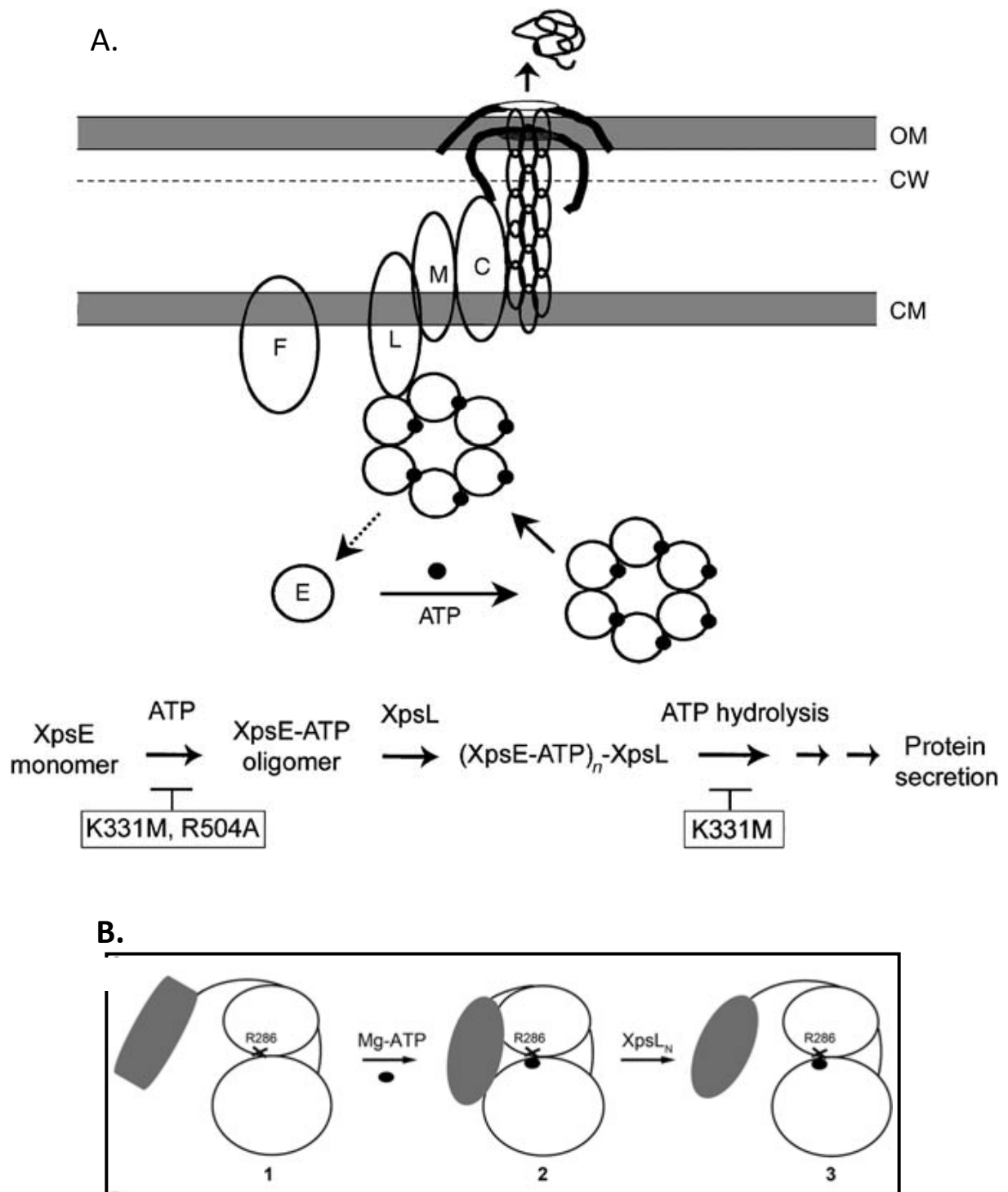


FIGURE 22 : Modèles du déroulement des interactions de XpsE avec l'ATP, lui-même et EpsL. (A) XpsE doit être hexamérique et avoir fixé l'ATP pour son interaction avec XpsL (Shiue *et al.*, 2006). **(B)** Changement conformationnel provoqué par la fixation d'ATP ou de XpsL. 1 et 2 : le domaine N, en gris, interagit avec le domaine C ayant fixé l'ATP, en clair, ce qui induit son changement conformationnel. 3 : l'interaction de XpsL avec le domaine N de XpsE provoque la séparation des domaines N et C de XpsE et XpsL se fixe sur le domaine C (Shiue *et al.*, 2007).

cristaux (Figure 21.A). Les auteurs proposent que les deux conformations soient présentes *in vivo* et soient la réponse à différents stimuli. Ceci conforte les résultats de protéolyse ménagée de Py et associés : en présence d'OutL, OutE subit un changement conformationnel (Py *et al.*, 1999). Ce changement conformationnel n'est d'ailleurs possible que si le motif de la boîte Walker A est intact. Dans la structure cristallographique d'EpsE Δ 90, les domaines EpsE_N et EpsE_C forment une large interface (Figure 21.B) (Robien *et al.*, 2003). Les expériences de pull-down ont montré que les deux domaines de XpsE, XpsE_N (résidus 1-154) et XpsE_C (résidus 153-567) interagissaient l'un avec l'autre en présence d'AMP-PNP (dérivé de l'ATP non-hydrolysable) (Shiue *et al.*, 2007). Le domaine XpsE_N agit comme un répresseur de l'activité ATPase du domaine XpsE_C. Lorsque l'interaction des deux domaines est bloquée, notamment par une mutation du résidu R286 qui semble essentiel, l'activité ATPase est constamment élevée. Néanmoins, l'absence d'interaction entre les deux domaines n'empêche pas l'oligomérisation de GspE. La répression due à l'interaction des deux domaines de GspE est levée par interaction de XpsL avec XpsE_N (Figure 22.B).

Dans *X. campestris*, il a été montré que XpsE est multimérique (jusqu'au dodécamère) et probablement hexamérique lorsqu'elle s'associe à XpsL (Shiue *et al.*, 2006). En effet, plusieurs de ses homologues, l'hélicase T7, RecA d'*E. coli*, GspE d'*Archaeoglobus fulgidus* ou encore l'ATPase ClpA, forment des anneaux hexamériques (Sawaya *et al.*, 1999 ; Yu and Egelman, 1997 ; Yamagata and Tainer, 2007 ; Guo *et al.*, 2002). Un modèle hexamérique d'EpsE a été généré par Robien et collaborateurs et n'a pas été remis en cause depuis lors (Figure 21.C) (Robien *et al.*, 2003).

Stimulation de l'activité ATPase

L'activité ATPase est stimulée par la présence du domaine cytoplasmique de GspL, par interaction directe de ces deux protéines. Le domaine N de GspE est composé de deux sous-domaines, N1 et N2, et le domaine C est composé des sous-domaines C1, CM et C2. La boîte Walker A est située dans le sous-domaine C1 du domaine C de GspE (GspE_C). Il a été montré que GspE_C peut également interagir avec GspL_N mais avec une très faible affinité par rapport à GspE_N (Shiue *et al.*, 2007). De plus, chez *X. campestris*, le double mutant *xpsE* K331M R504A dont la capacité à fixer l'ATP est diminuée 20 fois perd également sa capacité à interagir avec XpsL et à s'associer à la membrane. Le résidu K331 se trouve dans le motif Walker A. Le simple mutant *xpsE* K331M est incapable d'hydrolyser l'ATP mais il est encore capable de fixer l'ATP et de s'associer à la membrane (Figure 22.A) (Shiue *et al.*, 2006). Il est intéressant

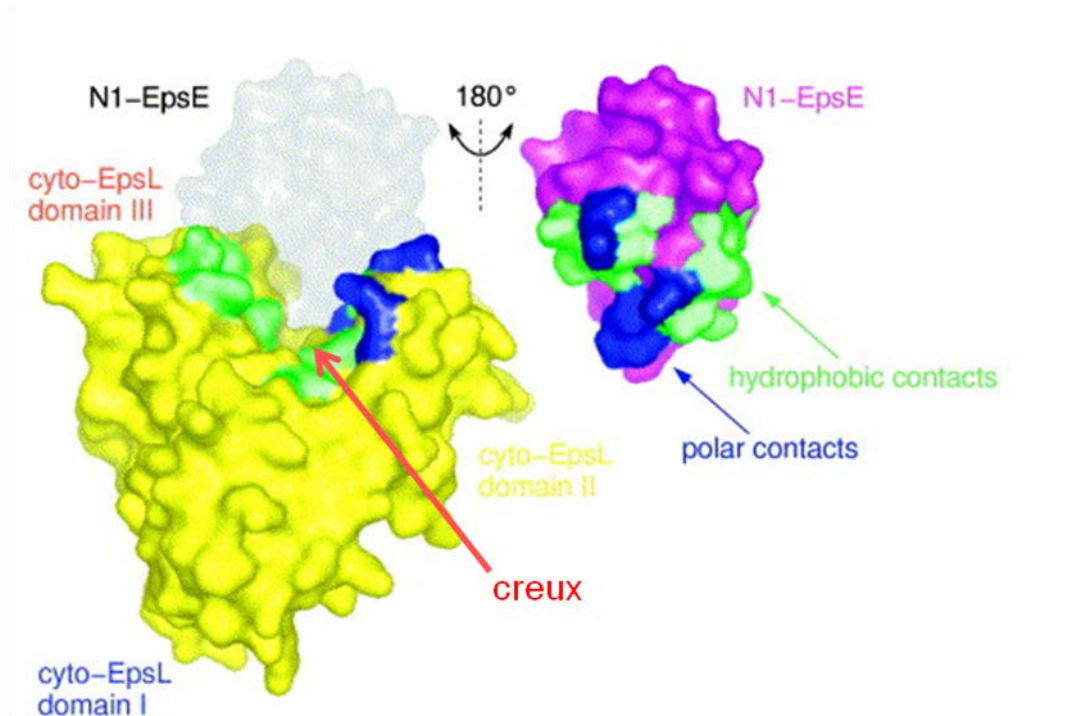


FIGURE 23 : Interactions entre le domaine N1 d'EspE et la région cytoplasmique d'EspL (cyto-EpsL). Dans le complexe, EspE est représenté en gris translucide (et vient s'insérer dans le creux formé par les domaines II et III de cyto-EpsL) et la face arrière est présentée à droite en violet, avec les patches impliqués dans les interactions hydrophobes (en vert) et polaires (en bleu). Seul le domaine II de cyto-EpsL établit des contacts polaires avec le domaine N1 d'EspE. Le creux formé par les domaines II et III de cyto-EpsL (flèche rouge) n'est que partiellement comblé par l'interaction avec N1-EpsE. (Abendroth *et al.*, 2005).

de noter que dans la structure tridimensionnelle d'EpsE, un site de fixation au métal, probablement le zinc, formé par 4 cystéines a été mis en évidence dans le deuxième sous-domaine d'EpsE_C (Robien *et al.*, 2003). La mutation de trois de ces cystéines dans *K. oxytoca* inhibe la sécrétion de pullulanase (Possot and Pugsley, 1997). La structure cristallographique du complexe EpsE_N/EpsL_N a également été résolue. Dans les cristaux, les deux protéines tronquées forment un hétéro-tétramère (2x2) (Abendroth *et al.*, 2005).

Camberg et collaborateurs ont démontré que l'activité ATPase est augmentée 30 fois si les phospholipides (phosphatidylglycerol et cardiolipine) sont ajoutés au complexe EpsE/EpsL_N (Camberg *et al.*, 2007). EpsL_N correspond aux résidus 1 à 253. EpsE seul ne peut pas interagir avec les phospholipides ; il faut donc que le complexe EpsE/EpsL_N soit préalablement formé. Les auteurs ont démontré qu'une courte séquence de résidus d'OutL situés juste à l'interface de la région cytoplasmique et de la membrane cytoplasmique (résidus 243 à 253) est essentielle pour que le système de sécrétion soit fonctionnel. Une délétion de cette région de GspL ou la substitution de ces résidus par une alanine empêche la fixation du complexe EpsE/EpsL_N aux phospholipides et provoque l'arrêt de l'activité ATPase de EpsE. Pourtant EpsL₁₋₂₄₂ interagit toujours avec EpsE. Les mutants *epsL* manquant les résidus 243-253 présentent donc un défaut d'interaction avec les phospholipides. Enfin, l'ATP doit être fixé à EpsE/EpsL_N avant l'interaction avec les phospholipides pour que l'activité d'hydrolyse atteigne son maximum (Camberg *et al.*, 2007). Il faut aussi noter que la fixation d'EpsL_N sur EpsE et l'activation de cette ATPase par les phospholipides sont corrélées avec l'oligomérisation de ce complexe. (Shiue *et al.*, 2006). L'ensemble de ces résultats montrent que l'activité ATPase de GspE nécessite préalablement la fixation de l'ATP à GspE puis l'interaction de GspE avec GspL.

Le modèle issu de ces résultats serait que l'ATP se fixe à GspE_C hexamérique. Puis les deux domaines de GspE, GspE_C et GspE_N, interagissent, ce qui bloque l'activité ATPase. La répression est levée par l'interaction de GspL_N avec GspE_N, ce qui induit probablement le changement conformationnel de GspE_N et affaiblit l'interaction entre les deux domaines de GspE. GspL_N interagirait ensuite avec GspE_C, stimulant l'activité ATPase (Figure 22 A et B). Les résidus de GspL_N les plus proches de la membrane interagiraient avec les phospholipides de la membrane ce qui permet l'association de GspE à la membrane et la forte augmentation de son activité d'hydrolyse.

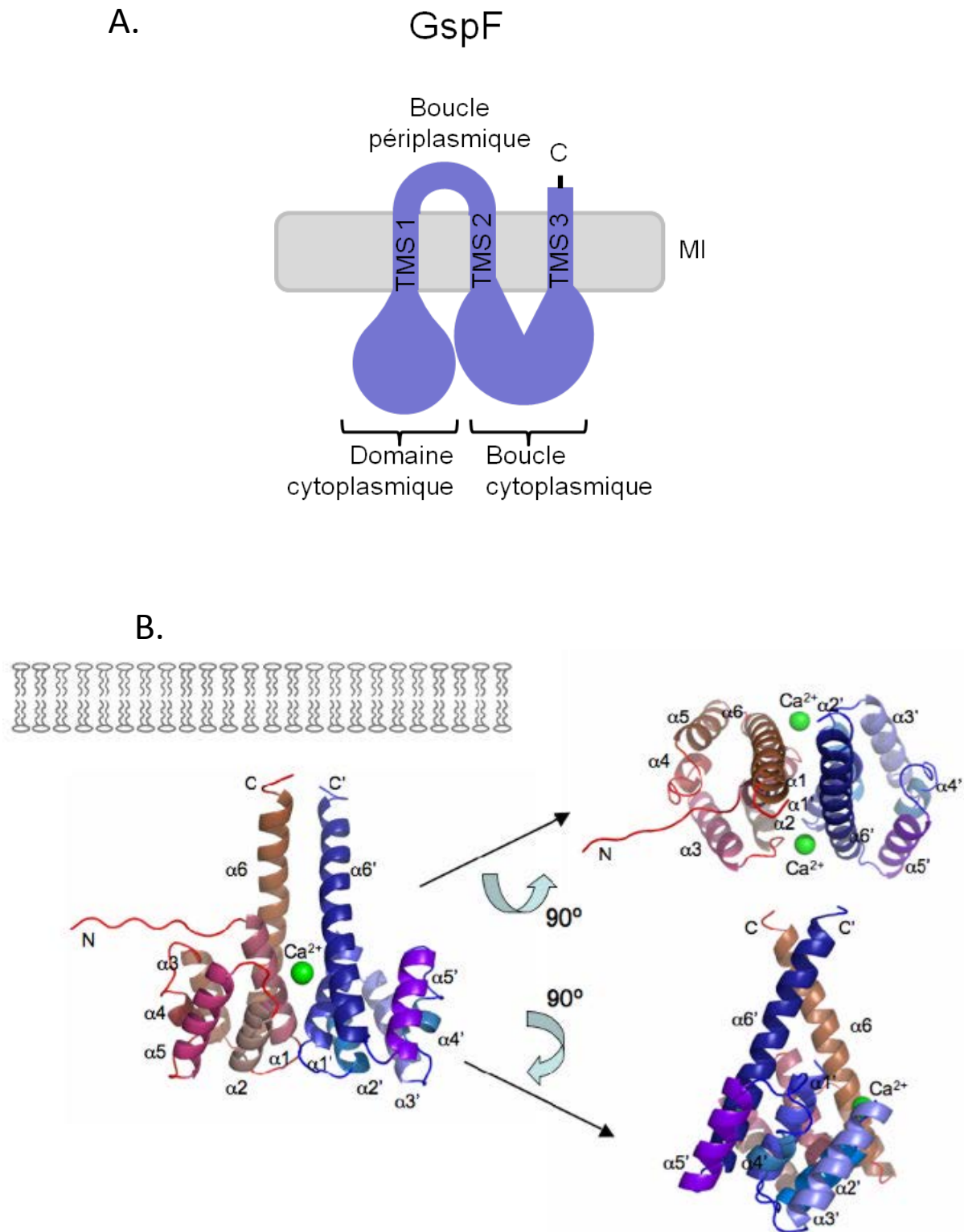


FIGURE 24 : Topologie de GspF et structure cristallographique du dimère du domaine cytoplasmique de GspF de *V. cholerae*. (A) Représentation schématique de la topologie de GspF. (B) Chaque monomère est constitué de 6 hélices α . L'hélice $\alpha 6$ sort du corps du domaine vers la membrane interne. Les billes vertes représentent les ions calcium. (Abendroth *et al.*, 2009)

La plateforme de la membrane interne

III.B.3.2) GspF

GspF est une protéine intégrale de la membrane interne. Un domaine cytoplasmique, une très petite boucle périplasmique et une large boucle cytoplasmique, séparés les uns des autres par trois segments transmembranaires, sont prédits par les programmes bioinformatiques (Figure 24.A). Cette topologie a été vérifiée par fusion des différentes régions de *gspF* au gène rapporteur *phoA* codant pour la phosphatase alcaline ou au gène rapporteur *blaM* codant pour une β -lactamase (Arts *et al.*, 2007 ; Thomas *et al.*, 1997). Par la technique du double-hybride levure, il a été montré que le domaine cytoplasmique en N-terminal d'OutF, mais pas la boucle cytoplasmique située entre les TMS 2 et 3, interagit avec OutE mais aussi, plus faiblement, avec le domaine cytoplasmique d'OutL (Py *et al.*, 2001). XcpS (GspF) n'est plus sensible à la dégradation quand elle est co-exprimée avec les deux protéines XcpR et XcpY (GspE et GspL) simultanément, mais pas avec l'une de ces protéines seule, ce qui indiquerait la formation d'un complexe entre GspE, GspL et GspF. Une quantité encore plus grande de XcpS (GspF) apparaît lorsqu'elle est co-exprimée avec les composants XcpRTUVWXYZ (GspEGHIJKLM). Les auteurs supposent donc que d'autres protéines du système entrent en compte dans la stabilisation de XcpS, probablement par une interaction (Arts *et al.*, 2007). Dans les expériences de co-immunoprécipitation, la présence d'OutL est nécessaire pour la formation d'un complexe OutE/OutF (Py *et al.*, 2001). Or, dans la structure tridimensionnelle du tétramère de la région cytoplasmique d'EspL et du domaine N1 d'EpsE, le creux formé par les domaines II et III de la région cytoplasmique d'EspL n'est pas entièrement comblé par EpsE et suggère donc une interaction supplémentaire (Figure 23). Le partenaire le plus probable serait EpsF (Abendroth *et al.*, 2005). Allant à l'encontre des résultats de Py et collègues sur l'implication du domaine cytoplasmique d'OutF dans les interactions avec OutE et OutL, Arts *et al.* (2007) ont montré que la boucle cytoplasmique de XcpS (GspF) était nécessaire à la stabilisation de XcpR et XcpY (GspE et GspL). Cette apparente contradiction serait peut-être due à la nature transitoire des interactions. Le gène *xcpS* de *P. putida* ne peut pas compléter un mutant *xcpS* de *P. aeruginosa* (Arts *et al.*, 2007). Les échanges des domaines entre ces deux protéines homologues ont montré que seuls les deux premiers segments transmembranaires de GspF de *P. aeruginosa* pouvaient être substitués sans altérer le fonctionnement du système de sécrétion. Les protéines hybrides avec les autres domaines (cytoplasmiques, périplasmique et

troisième TMS) concurrencent les protéines natives car, en leur présence, la sécrétion dans une souche sauvage de *P. aeruginosa* est bloquée. Il semble donc que certaines interactions de XcpS (GspF) avec les autres composants Xcp du T2SS aient toujours lieu puisque les protéines hybrides sont stables mais d'autres interactions doivent être interrompues d'où l'arrêt de la sécrétion. GspF aurait de multiples partenaires parmi les composants du T2SS. La formation d'un complexe GspE-GspL-GspF-GspM, formant dans la membrane interne une sorte de plateforme (Py *et al.*, 2001), apparaît comme réellement plausible. Enfin, OutF a été co-immunoprécipitée avec i) SecA, la protéine cytoplasmique moteur du système Sec ii) Tsp et DegQ, deux protéases à sérine iii) TogA, une ATPase d'ABC transporteurs de l'importation des oligogalacturonides iv) AcsD impliquée dans la biosynthèse du sidérophore achromobactine (Douet *et al.*, 2009). Une mutation dans ce dernier système diminue la virulence de la bactérie *E. chrysanthemi*. De manière très surprenante, une mutation dans le gène *outF* a fait diminuer la production d'achromobactine mais a augmenté celle d'un autre sidérophore : la chrysobactine. OutF participerait donc au métabolisme du fer. Par double-hybride levure, les auteurs ont montré qu'AcsD interagissait avec OutF mais aussi avec le domaine cytoplasmique d'OutL et OutE. L'ensemble de ces données suggèrent qu'OutF et d'autres composants du T2SS seraient impliqués dans d'autres processus cellulaires (Douet *et al.*, 2009).

Récemment, la résolution de la structure tridimensionnelle du domaine N-terminal cytoplasmique d'EspF a permis de décrire un repliement insoupçonné (Abendroth *et al.*, 2009). En effet, cette région forme une double couche de trois hélices α antiparallèles. Dans les cristaux, le domaine N-terminal d'EspF forme un dimère compact dans lequel deux sites de fixation au calcium sont parfaitement l'un en face de l'autre (Figure 24.B). Les cristaux n'ont pu être obtenus qu'en présence d'ions calcium. *In vivo*, un effet dominant négatif (diminution de la sécrétion) est observé en présence de ce seul domaine cytoplasmique, indiquant que ce domaine concurrence EpsF sauvage. Un dimère du domaine cytoplasmique N-terminal d'EpsF a également été observé par cross-linking *in vivo* (Abendroth *et al.*, 2009). Il semble donc que GspF formerait un dimère *in vivo*.

III.B.3.3) GspC

GspC est une protéine bitopique de la membrane interne, composée d'une très courte région cytoplasmique, un TMS et une large région périplasmique (Thomas *et al.*, 1997). Comme nous allons le voir, son rôle bien qu'encore obscur est essentiel au sein du T2SS.

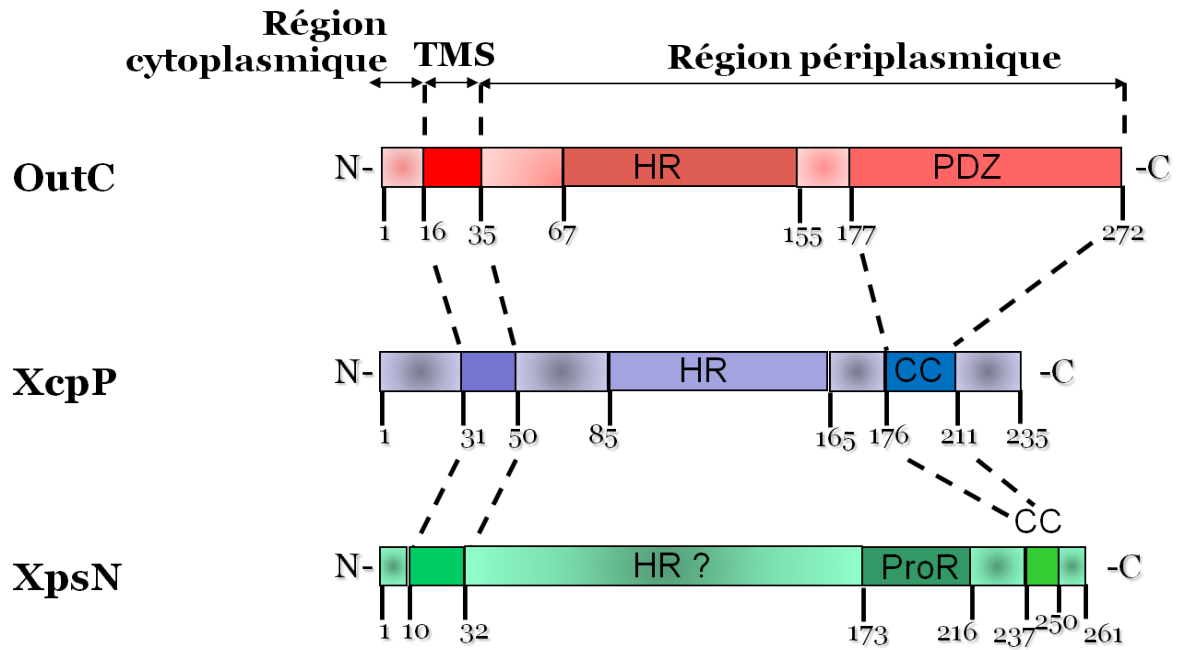


FIGURE 25 : Représentation schématique des protéines OutC, XcpP, XpsN, représentants de la famille GspC chez les bactéries *E. chrysanthemi*, *P. aeruginosa* et *X. campestris*. HR : domaine HR (homology region) ; PDZ : domaine PDZ ; CC : domaine coiled-coil ; ProR : région riche en proline (proline-rich region). (d'après Robert *et al.*, 2005 et Lee *et al.*, 2004).

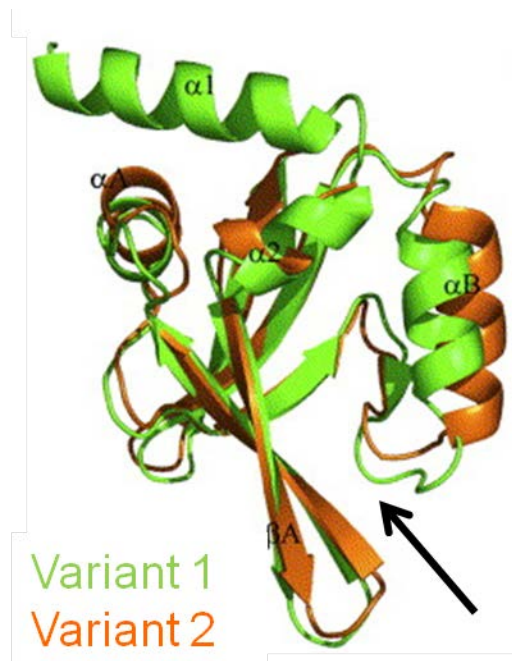


FIGURE 26 : Structure cristallographique du domaine PDZ d'EpsC. Les deux variants trouvés dans les cristaux ont été superposés. La rainure hydrophobe suggérée comme site d'interaction est indiquée par une flèche. (d'après Korotkov *et al.*, 2006).

Domaine C-terminal de la région périplasmique de GspC

La région périplasmique de la plupart des GspC contient une région conservée, appelée domaine HR (homology region) et un domaine PDZ près du C-terminus (Figure 25). Les domaines PDZ ont été nommés d'après les 3 premières protéines connues qui le possédaient (PSD-95, Disc-large, ZO-1) et sont impliqués dans des interactions protéine-protéine (Pallen and Ponting, 1997). Les domaines PDZ sont de forme globulaire et sont longs d'une centaine de résidus. Ils contiennent un motif Gly-Leu-Gly-Phe dans les protéines d'eucaryotes (Harris and Lim, 2001) mais ce motif n'est pas présent dans la séquence des membres de la famille GspC (Korotkov *et al.*, 2006). Tous les membres de la famille GspC ne possèdent pas un domaine PDZ. La protéine XcpP (GspC chez *P. aeruginosa* et chez *P. alcaligenes*) possède un domaine coiled-coil. La protéine HxcP (GspC chez *P. aeruginosa*) du T2SS dit secondaire ne contient ni domaine PDZ ni domaine coiled-coil (Peabody *et al.*, 2003). Chez *Xanthomonas campestris*, XpsN possède une région riche en proline et un très court domaine coiled-coil (Figure 25) (Lee *et al.*, 2004). Notons que cette protéine XpsN a été intégrée dans la famille des GspC, malgré la faible similarité de séquence avec les autres GspC, parce qu'elle assure au sein du T2SS des fonctions similaires à celles des autres GspC (Lee *et al.*, 2004). Les domaines coiled-coil sont également impliqués dans les interactions protéine-protéine. Le domaine coiled-coil (CC) de XcpP n'est pas indispensable au fonctionnement du système car le mutant XcpP Δ CC reste fonctionnel (Bleves *et al.*, 1999). De plus, ce domaine a pu être remplacé avec succès par le domaine PDZ d'OutC (Gérard-Vincent *et al.*, 2002). Il semble donc raisonnable de penser que les domaines coiled-coil ont la même fonction au sein du T2SS. Il a été supposé que les domaines PDZ ou coiled-coil étaient impliqués dans une homodimérisation car des multimères XcpP contenant un domaine PDZ à la place du domaine coiled-coil ont été observés, alors qu'aucun multimère n'apparaît lorsque le domaine coiled-coil est délété (Gérard-Vincent *et al.*, 2002). Cependant, aucune dimérisation entre deux de ces domaines n'a été observée à ce jour (Douet *et al.*, 2004 ; Login and Shevchik, 2006). Or, le domaine coiled-coil ne semble pas être indispensable au processus de sécrétion (Bleves *et al.* 1999). Chez *E. chrysanthemi*, un mutant OutC Δ PDZ permet aussi la sécrétion de certaines exoprotéines et n'est donc pas indispensable à la fonctionnalité du système (Bouley *et al.*, 2001). Il est donc peu probable que les domaines C-terminaux soient impliqués dans la multimérisation des GspC. Le domaine PDZ d'OutC est en revanche impliqué dans la reconnaissance de certaines exoprotéines (Bouley *et al.*, 2001). Cet aspect sera développé plus tard. La structure du domaine PDZ d'EpsC a été résolue. Deux dérivés d'EpsC de taille différente ont été étudiés

(Korotkov *et al.*, 2006). Seuls des monomères sont présents dans les mailles des cristaux. Le domaine PDZ d'EpsC montre un repliement général similaire à ceux des autres domaines PDZ bactériens : 6 brins β entrecoupés par 2 hélices α . Une rainure hydrophobe est formée entre une hélice et deux brins du PDZ (Figure 26). Dans le deuxième dérivé qui est plus long de 18 résidus, le déplacement de l'hélice α B ouvre cette rainure. Ce site de fixation putatif est plus large que dans les autres domaines PDZ connus et pourrait interagir avec un substrat plus large que les courts peptides linéaires reconnus par les autres domaines PDZ, par exemple avec une hélice α d'une autre protéine. Ce type d'interaction par les domaines PDZ n'a pas été observé auparavant. Ce site de fixation pourrait servir à l'interaction entre GspC et les protéines sécrétées ou un composant du T2SS.

Multimérisation de GspC ?

Un complexe de 110 kDA, dépendant de la présence de la sécrétine PulD et réagissant uniquement avec les anticorps anti-PulC a été détecté après cross-linking de cellules exprimant le système Pul de *K. oxytoca* (Possot *et al.*, 1999). Dans la structure tridimensionnelle, le domaine PDZ d'EpsC apparaît en monomère (Korotkov *et al.*, 2006). *In vivo*, dans les expériences de double-hybride, la région périplasmique d'OutC isolée ne dimérise pas (Douet *et al.*, 2004, Login and Shevchik, 2006). En revanche, il a été montré par des expériences de pull-down, double-hybride bactérien et cross-linking *in vitro* que le TMS d'OutC est responsable de la dimérisation de cette protéine (Login and Shevchik, 2006). Le TMS d'OutC ne présente ni motif GXXXG, ni motif leucine zipper, généralement impliqués dans les interactions de TMS mais contient des résidus polaires qui peuvent former des liaisons hydrogènes. Trois résidus chargés positivement, R15 et R16, et R36 bordent les extrémités N-terminale et C-terminale du TMS respectivement. Le résidu Q29 forme une liaison hydrogène qui serait la principale force d'interaction du TMS tandis que R15 et R36 stabiliseraient l'interaction au niveau des deux extrémités des TMS. Les résidus R15, Q29 et R36 sont localisés sur la même face de l'hélice transmembranaire. Un triple mutant R15V, Q29L, R36A dans le TMS d'OutC présente un défaut de sécrétion. Or, ce mutant est incapable de dimériser. Le TMS d'OutC n'a donc pas seulement un rôle d'ancrage mais aussi de formation d'un dimère, essentiel durant le processus de sécrétion (Login and Shevchik, 2006). Ces résultats corroborent l'étude faite sur un autre membre de la famille GspC : XcpP de *P. aeruginosa*. En effet, le remplacement du TMS de XcpP par celui de la protéine TetA permet à la protéine d'être ancrée à la membrane interne mais arrête la sécrétion (Bleves *et al.*, 1999). Cependant, le

remplacement du TMS de XcpP par celui d'OutC n'abolit pas entièrement la sécrétion (Gérard-Vincent *et al.*, 2002). Le TMS des GspC aurait peut-être des caractéristiques sans rapport avec la spécificité du système mais qui seraient indispensables pour le processus de sécrétion, et qui seraient peut-être d'être le moteur de la dimérisation. En totale contradiction avec cette hypothèse, les résultats acquis dans le système Pul de *K. oxytoca* suggèrent que le TMS n'a qu'un rôle d'ancrage à la membrane : la région périplasmique de PulC fusionnée à la séquence signal de MalE complémente un mutant non fonctionnel *pulC* (Possot *et al.*, 1999). Enfin, une récente étude du laboratoire émet l'hypothèse que les multimères d'OutC seraient au nombre de 12, comme OutD, puisque, dans une expérience de pull-down, les régions périplasmiques d'OutC et OutD sont éluées selon le même ratio équimolaire (Login *et al.*, 2010). Néanmoins, cette suggestion reste à vérifier.

Interaction de GspC avec deux autres composants de la membrane interne GspL et GspM

GspC, GspL et GspM sont les trois protéines bitopiques de la membrane cytoplasmique. Elles sont présentes dans tous les T2SS. Il a été montré que XpsN (GspC) forme un complexe ternaire avec XpsL et XpsM, duquel il se dissocierait en premier (Tsai *et al.*, 2002). Cette interaction permettrait une plus forte stabilisation de XpsL et XpsM. Les 46 résidus N-terminaux de XpsN, dont une quinzaine forment le segment transmembranaire (TMS), sont suffisants pour former ce complexe (Lee *et al.*, 2004). Ceci est cohérent avec les expériences de double-hybride qui montrent que la région périplasmique d'OutC isolée n'interagit ni avec celle d'OutL ni celle d'OutM (Douet *et al.*, 2004). XpsN tronquée en C-terminal qui possède les 97 résidus N-terminaux (XpsN97) provoque un effet dominant négatif sur la sécrétion, que ne provoque pas le dérivé XpsN46 ne possédant que les 46 résidus N-terminaux. La région comprise entre les résidus 46 et 97, qui consiste en une hélice α , serait donc impliquée dans une interaction avec un autre composant du T2SS (Lee *et al.*, 2004). Lee et associés ont montré que la substitution de trois résidus chargés sur la même face de l'hélice (comprise entre les résidus 46 et 97) par une alanine fait perdre sa fonctionnalité à la protéine. De plus, ce mutant est entièrement dégradé en présence des autres composants du système de sécrétion, mais apparaît en quantité égale à la protéine sauvage quand il est exprimé seul. Ainsi, la stabilité de XpsN (GspC) serait favorisée par l'absence des autres composants (Lee *et al.*, 2004). Il a été montré que les 35 résidus de la région périplasmique suivant le TMS de XcpP (GspC) sont également indispensables au fonctionnement correct de la protéine. Une substitution de cette région avec celle d'OutC bloque la sécrétion et ne permet plus la stabilisation de XcpY (GspL) (Gérard-

Vincent *et al.*, 2002). Néanmoins, la substitution du TMS ne permet plus non plus cette stabilisation. Il a donc été supposé que l'altération de cette région de 35 résidus faisant suite au TMS pourrait affaiblir l'interaction de celui-ci avec les autres composants du T2SS. Finalement, lorsque cette même région qui suit le TMS de XcpP de *P. aeruginosa* a été remplacée par celle de *P. alcaligenes*, la sécrétion dans *P. aeruginosa* a été restaurée à 100% (Robert *et al.*, 2005). Cette région de 35 résidus n'est donc pas responsable de la spécificité du système et serait alors impliquée dans une interaction avec un composant du T2SS.

Interaction de GspC avec GspD

Plusieurs études ont laissé supposer une interaction entre la protéine de la membrane interne GspC et la sécrétine GspD localisée dans la membrane externe. Pour rechercher la région de XcpP (GspC) impliquée dans cette interaction, le domaine coiled-coil de XcpP a été remplacé par le domaine PDZ d'OutC. Cet échange ne bloque pas la sécrétion d'élastase, lipase et phospholipases C (Gérard-Vincent *et al.*, 2002). Les auteurs ont émis l'hypothèse que la région C-terminale remplacée par celle d'OutC ne pourrait plus interagir avec la sécrétine, donc ne plus « fermer l'accès » des exoprotéines à la sécrétine. La protéine XcpP tronquée sans domaine coiled-coil ni PDZ n'altère pas la fonctionnalité du système (Bleves *et al.*, 1999), ce qui pourrait être également dû à une « ouverture » de l'accès à la sécrétine. Lors d'expériences de fractionnement cellulaire, PulC de *K. oxytoca* a été retrouvée partiellement dans la fraction de la membrane externe en absence ou en présence de PulD (Possot *et al.*, 1999). Dans les expériences de cross-linking, ces deux protéines PulC et PulD n'ont pas formé de complexe. Par contre, un complexe de 110 kDa de PulC (3 protomères) est apparu en présence de PulD (Possot *et al.*, 1999).

Une interaction directe entre XpsN (GspC) et la sécrétine XpsD a été décelée par immunoprécipitation, chromatographie d'affinité (pull-down) et cross-linking (Lee *et al.*, 2000 ; Lee *et al.*, 2005). La formation de ce complexe implique la région C-terminale conservée de XpsD (résidus 650 à 759). Les membres de la famille GspC contiennent également au début de la région périplasmique une séquence conservée, nommée pour cela domaine HR (Homology Region) (Gérard-Vincent *et al.*, 2002). Une interaction entre le domaine HR d'EpsC et le domaine périplasmique N-terminal d'EpsD a été décelée par copurification (Korotkov *et al.*, 2006). Pourtant, en double-hybride levure, aucune interaction n'a été détectée entre les régions périplasmiques de leurs homologues OutC et OutD (Douet *et al.*, 2004). Très récemment, une étude menée au laboratoire a permis de collecter plus de détails sur

cette interaction (Login *et al.*, 2010). Par RMN, une interaction entre le domaine N-terminal périplasmique d'OutD et la région périplasmique d'OutC ne contenant pas le PDZ a été mise à jour (Figure 25). Ensuite, les régions périplasmiques de ces deux protéines ont été co-purifiées en pull-down. Plus précisément, les expériences de pull-down ont montré une interaction : 1) entre le TMS d'OutC ou plus probablement sa région périplasmique adjacente et le domaine N0 de la région N-terminale d'OutD et 2) entre une très courte région (résidus 139 à 158), appelée OutCsip (secretin interacting peptide) du domaine HR (résidus 40 à 172) et le domaine N0 et les domaines N2-N3' d'OutD indépendamment (Login *et al.*, 2010). OutCsip est indispensable à la fonctionnalité d'OutC car la sécrétion des pectinases est intégralement restaurée par un dérivé OutC1-159 (contenant Csip) mais pas par le dérivé OutC1-141 ni par le mutant OutC V143S. Les deux sites d'OutD ont un mode de fixation à OutCsip différent : le domaine N0 peut toujours interagir avec 15 résidus uniquement (résidus 144 à 158), contrairement à la région N2-N3' d'OutD. De plus, dans les expériences de pull-down, OutC portant la substitution V143S dans la région OutCsip peut interagir avec le domaine N0 d'OutD mais plus avec la région N2-N3'. Les deux domaines d'OutD impliqués interagiraient donc soit avec deux sites chevauchants dans OutCsip, soit avec le même site de deux manières différentes. Par un test tri-partenaire, il a été montré qu'il y a compétition entre ces deux régions d'OutD pour l'interaction avec OutCsip. L'interaction d'OutCsip au domaine N0 augmenterait l'affinité d'OutCsip pour les domaines N2-N3'. Les auteurs proposent un modèle dynamique dans lequel ces interactions entre les domaines périplasmiques d'OutD et d'OutC alternent pendant le processus de sécrétion (Login *et al.*, 2010). Dans la structure cristallographique du domaine périplasmique de GspD d'*E. coli*, le domaine N0 présente une homologie avec le domaine de signalisation du récepteur membranaire FpvA. Ce domaine de FpvA interagit avec la protéine TonB par un mécanisme appelé β -strand complementation (interaction de brins β) (Brillet *et al.*, 2007). La position du brin β 2 dans le sous-domaine N0 de GspD est similaire à celle du domaine de signalisation de FpvA (Korotkov *et al.*, 2009). Or, la prédiction de structure du domaine HR de GspC pointerait vers une prédominance de brins β (Korotkov *et al.*, 2006). Ceci concorde bien avec l'interaction décrite ci-dessus entre OutCsip (qui possède 2 brins β) et le domaine N0 d'OutD.

Tous ces éléments ont permis à Bleves et ses collaborateurs de proposer un modèle qui compare entre le fonctionnement de GspC et celui de TonB (Bleves *et al.*, 1999). TonB est une protéine bitopique de la membrane interne dont la région périplasmique traverse le périplasme et interagit avec le récepteur FhuA. La force protomotrice induit au moins un changement

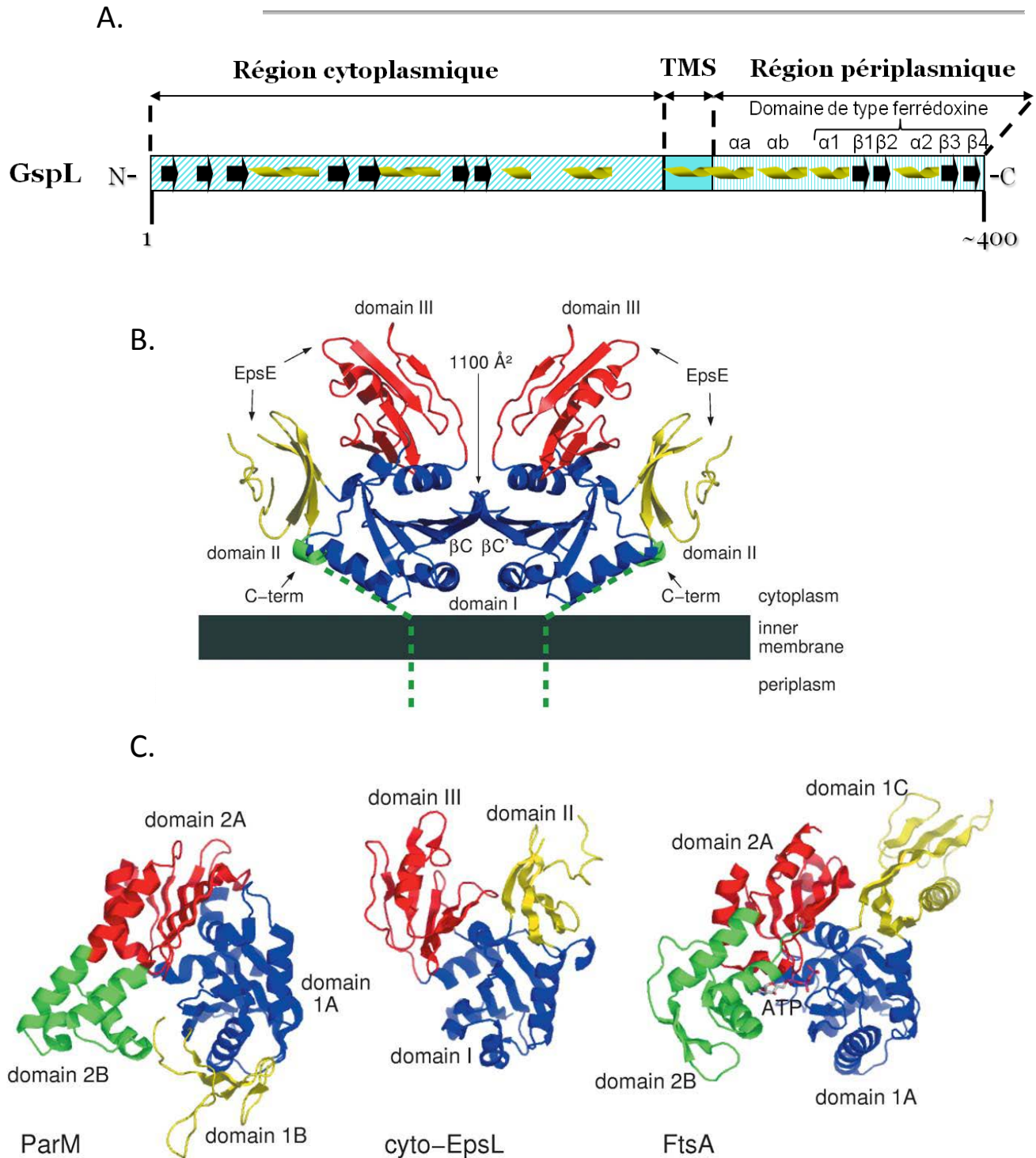


FIGURE 27 : Structure cristallographique du domaine cytoplasmique d'EpsL de *V. cholerae*. (A) Organisation générale de GspL. (B) Structure du dimère. L'interface se fait grâce à l'interaction des brins βC . Les pointillés verts représentent la continuation de l'hélice α qui va s'insérer dans la membrane interne. (C) Le domaine cytoplasmique d'EpsL est composé de trois sous-domaines I, II et III. Les domaines I et III (bleu et rouge) présentent une grande similarité de structure avec les domaines 2A et 1A des protéines de liaison à l'ATP de type actines comme ParM, présentée à gauche, tandis que le domaine II (jaune) présente une similarité de structure avec le domaine 1C de l'actine FtsA. (Abendroth *et al.*, 2004)

conformationnel de TonB, ce qui met TonB dans sa forme activée (Larsen *et al.*, 1999). L'énergie transduite par TonB du cytoplasme jusqu'au récepteur va permettre le transport actif des sidérophores complexés avec Fe^{3+} (Ferguson *et al.*, 1998). TonB est composé de trois domaines : le segment transmembranaire (résidus 1 à 33) qui interagit avec ExbB et ExbD, un domaine C-terminal qui interagit avec les récepteurs (résidus 155 à 239), et un domaine intermédiaire (résidus 34 à 154) qui contient une répétition des motifs Proline-Glutamate et Proline-Lysine (Köhler *et al.*, 2010). FhuA forme un tonneau de type porine dans la membrane externe (Pawelek *et al.*, 2006) et interagit avec TonB grâce à une courte région N-terminale appelée boîte Ton. L'interaction implique plusieurs brins β de chaque partenaire (Pawelek *et al.*, 2006). L'importance du TMS de TonB, l'interaction avec deux protéines de la membrane interne et l'interaction avec une protéine de la membrane externe sont des caractéristiques que possède également GspC. Ainsi, GspC pourrait être impliqué dans la transduction d'énergie.

III.B.3.4) *GspL* et *GspM*

Les protéines de la membrane interne *GspL* et *GspM* sont composées d'un domaine cytoplasmique qui est large chez *GspL*, d'un segment transmembranaire et d'un domaine périplasmique (Bleves *et al.*, 1996 ; Py *et al.*, 1999). Les rôles de ces deux protéines restent obscurs. Les structures des régions périplasmiques de *GspM* et *GspL* et de la région cytoplasmique ont été résolues. Combinées aux études génétiques et biochimiques, elles ont apporté de nombreuses informations.

Homodimérisation de GspL

Tout d'abord, la protéine *GspL* entière serait capable de former au moins un homodimère, comme l'ont suggéré les expériences de filtration sur gel avec *EpsL* (Sandkvist *et al.*, 1999). Une dimérisation de la région cytoplasmique d'*OutL* a été détectée *in vivo* par la technique du double-hybride levure (Py *et al.*, 1999) et la structure cristallographique du dimère de la région cytoplasmique d'*EpsL* a été résolue (Abendroth *et al.*, 2004). La région cytoplasmique d'*EpsL* dans le cristal est composée de trois sous-domaines I, II et III (Figure 27.A). Le dimère présente une interface de $1100 \text{ \AA}^2$ et l'interaction se ferait par les brins βC du domaine I (Figure 27.B). Les domaines I et III présentent une étonnante homologie de structure avec les domaines 1A et 2A des protéines de liaison à l'ATP de type actines, tel que *ParM* (Figure 27.C)

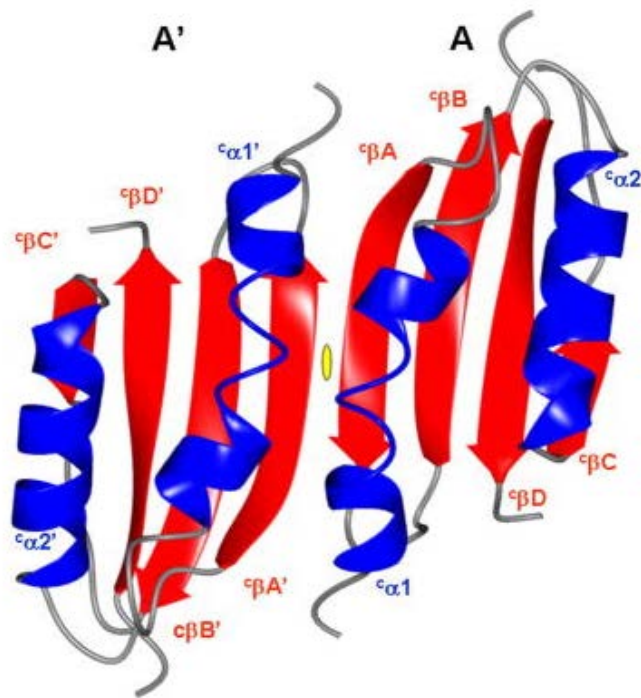
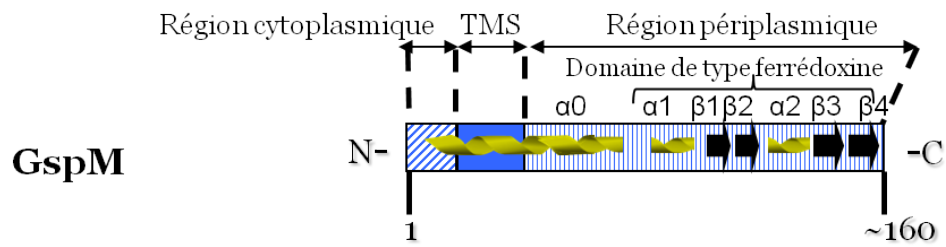


FIGURE 28 : Structure cristallographique de la région périplasmique d'EspL. L'interaction entre deux protomères se fait grâce aux interactions entre les hélices $\alpha 1$ et les brins βA . Cette conformation forme un large feuillet β composé de 8 brins β . (Abendroth *et al.*, 2009)

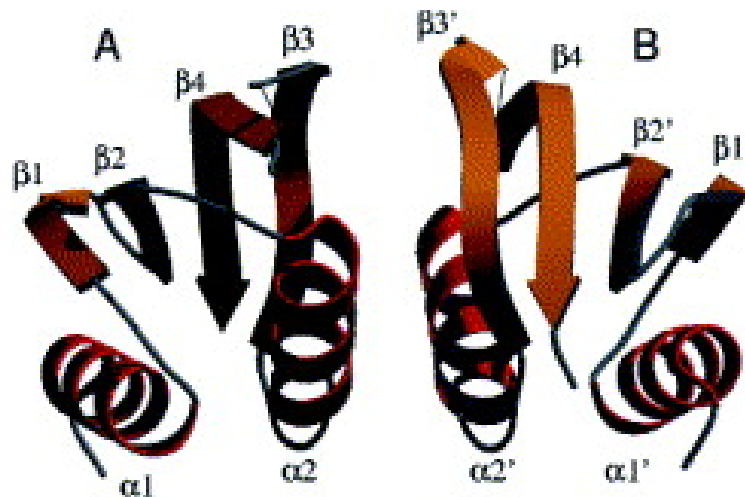
(Abendroth *et al.*, 2004). Les domaines 2A et 2B manquant chez EpsL permettent la formation des filaments d'actine. Effectivement, aucune polymérisation n'a été observée chez aucun des membres de la famille GspL. Le domaine II d'EpsL présente une homologie de structure avec un domaine de l'actine FtsA (Figure 27.C). Tous les homologues structuraux de type actine possède un site de liaison pour le phosphate de l'ATP et une poche bien conservée pour l'adénosine. EpsL ne possède pas cette poche, il est donc très peu probable qu'elle ait la capacité de lier l'ATP (Abendroth *et al.*, 2004). En revanche, GspL interagit directement avec l'ATPase GspE et stimule fortement son activité ATPase (voir aussi le chapitre sur l'ATPase III.B.3.1). La région N-terminale cytoplasmique de GspL interagit avec la région N-terminale de GspE (Py *et al.*, 1999). La structure tridimensionnelle d'un hétéro-tétramère formé par ces deux domaines protéiques a montré que le dimère d'EpsLcyto en complexe avec EpsE_N est très semblable au dimère seul. Un monomère d'EpsE_N se lie à chaque côté du dimère d'EpsLcyto et la surface d'interaction entre les deux protéines est de 1700 Å² et composée de résidus, hydrophobes ou chargés, très conservés (Figure 23) (Abendroth *et al.*, 2005). Py et collaborateurs ont démontré par protéolyse ménagée que l'interaction entre OutL et OutE provoquait un changement conformationnel sur OutE mais aussi sur OutL (Py *et al.*, 1999). Ce changement touche les régions cytoplasmique et périplasmique d'OutL. L'interaction de ces deux protéines GspL et GspE pourrait donc influencer voire provoquer d'autres interactions dans le périplasme.

La région périplasmique de GspL est aussi capable de dimériser. En effet, les expériences de double-hybride levure ont montré une homodimérisation des régions périplasmiques d'OutL *in vivo* (Py *et al.*, 1999 ; Py *et al.*, 2001 ; Douet *et al.*, 2004). Récemment, la structure 3D de la région périplasmique d'EpsL a également été résolue. C'est un dimère de la région périplasmique qui est retrouvé dans les mailles de cristaux (Abendroth *et al.*, 2009). Chaque protomère est composé de deux hélices α et quatre brins β dans l'ordre $\alpha 1$ - βA - βB - $\alpha 2$ - βC - βD (Figure 27.A). Les deux sous-unités $\alpha\beta\beta$ sont un variant atypique du motif « ferrédoxine » $\beta\alpha\beta$. Les séquences des deux sous-unités sont très dissimilaires entre elles (un résidu identique sur 37 résidus) mais le repliement est similaire (RMSD à 1,8 Å entre les deux sous-unités). Les structures secondaires $\alpha\beta\beta\alpha\beta\beta$ sont appelées domaine de type ferrédoxine. Les deux brins βA des protomères sont anti-parallèles. Il y a donc un alignement des 8 brins β , formant un grand feuillet β (Figure 28). La surface d'interaction, largement hydrophobe, entre les deux protomères est de 1440 Å². Huit résidus sont impliqués dans l'interaction, dont 5 appartenant au brin βA et 3 à l'hélice $\alpha 1$ (Figure 28). Ces résidus sont bien conservés dans la famille des

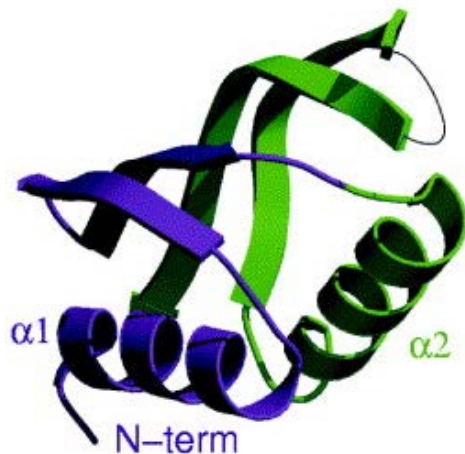
A.



B.



C.



D.



FIGURE 29 : Structure cristallographique du domaine périplasmique d'EpsM de *V. cholerae*. (A) Organisation générale de GspM. (B) Structure du dimère. La région périplasmique d'EpsM est composée de 4 brins β anti-parallèles formant un feuillet et deux hélices. Les hélices $\alpha 2$ sont responsables de l'interaction entre les deux protomères. (C) Le monomère est une répétition du sous-domaine $\alpha\beta\beta$, qui est une permutation cyclique du domaine de type ferrédoxine. (D) Superposition des deux sous-domaines dans la même orientation que le sous-domaine en vert dans (B) : les deux sous-domaines sont très similaires. (Abendroth *et al.*, 2004a)

GspL, ce qui suggère une conservation de ce type de dimère parmi les homologues d'EpsL (Abendroth *et al.*, 2009).

Homodimérisation de GspM

Dans les expériences de filtration sur gel, EpsM apparaît comme un homodimère (Sandkvist *et al.* 1999). En double-hybride levure, la région périplasmique d'OutM isolée a été capable de conduire l'homodimérisation (Py *et al.*, 2001 ; Douet *et al.*, 2004). Plus précisément, la région C-terminale d'OutM comprise entre les résidus 84 et 162 est impliquée dans l'homodimérisation. La structure 3D de la partie C-terminale de la région périplasmique d'EpsM de *V. cholerae* (résidus 65 à 165) a été résolue par cristallographie aux rayons X (Abendroth *et al.*, 2004a). Cette région est composée des structures secondaires hélice α , brin β , brin β répétées deux fois, qui constituent un domaine de type ferrédoxine (Figure 29.A). L'enchaînement $\alpha\beta\beta$ est une permutation cyclique du motif ferrédoxine $\beta\alpha\beta$, comme dans EpsL. D'après les analyses de séquences, ces structures secondaires ainsi que l'hélice α qui est la continuation de l'hélice transmembranaire seraient bien conservées parmi tous les homologues d'EpsM. Les dimères des domaines de type ferrédoxine d'EpsM se trouvent dans les mailles de cristaux. Chaque monomère est constitué de quatre brins β entourés par deux hélices α (Figure 29.B). L'interface d'interaction qui correspond à 900 Å² est formée par 7 résidus faisant partie de l'hélice α_2 (résidus 123, 126, 127, 133, 134 et 147). Les résidus formant l'interface du dimère sont très conservés parmi les homologues d'EpsM. L'homologue structural le plus proche de la région périplasmique d'EpsL est la région périplasmique d'EpsM avec une RMSD de 2,1 Å, alors que les deux régions ne partagent que 18% d'identité (Abendroth *et al.*, 2009). Pourtant, la structure cristallographique des deux régions montre que les dimères présentent des arrangements très différents. En effet, alors que les hélices α_2 créent l'interface du dimère d'EpsM, les hélices α_1 et les brins β_A créent celle d'EpsL (Figures 28 et 29). Entre les brins β_3 des deux monomères d'EpsM, il y a un espace creux profond de 10 Å, dont le fond est très hydrophobe et très dense en électrons (Abendroth *et al.*, 2004). Les résidus hydrophobes qui forment ce creux sont conservés parmi tous les homologues d'EpsM. C'est pourquoi il correspond probablement au site de fixation d'une autre protéine, qui pourrait être GspL.

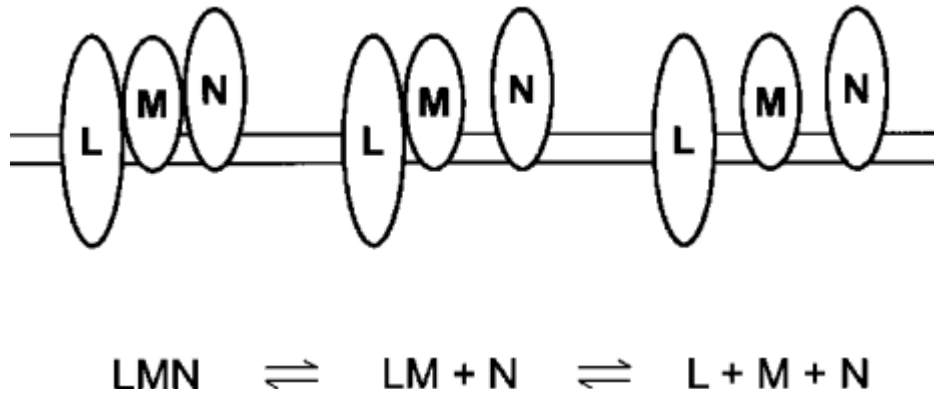


FIGURE 30 : Modèle d'association et de dissociation des trois composants de la plateforme de la membrane interne XpsL, XpsM et XpsN. Les trois protéines forment un complexe ternaire duquel XpsN (GspC) semble se détacher en premier. (Tsai *et al.*, 2002)

Interaction de GspL avec GspM

En effet, une protection mutuelle de GspL et GspM a été démontrée *in vivo*. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, les quantités de XcpZ (GspM) et XcpY (GspL) chutent réciproquement dans des mutants *xcpY* et *xcpZ*, ceci entraînant l'arrêt de la sécrétion (Michel *et al.*, 1998). Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré une interaction *in vitro* entre EpsL et EpsM (GspL et GspM de *Vibrio cholerae*) (Sandkvist *et al.*, 1999). La quantité d'EpsL immuno-précipitée seule puis en présence d'EpsM a doublé, démontrant non seulement une interaction mais aussi une stabilisation d'EpsL. De même, les deux protéines XpsL et XpsM (GspL et GspM de *Xanthomonas campestris*) sont réciproquement indispensables pour pouvoir les détecter en immunoprécipitation, montrant l'importance de cette interaction dans la stabilisation des protéines (Lee *et al.*, 2004). Un hétérodimère de PulM et PulL de *K. oxytoca* a pu être efficacement formé par cross-linking *in vivo* et détecté par co-immunoprécipitation (Possot *et al.*, 2000). Les interactions potentielles de GspL et GspM avec GspC ont été discutées précédemment (Chapitre III.B.3.3). Dans un mutant *xpsN* (*gspC* de *X. campestris*), XpsL et XpsM sont indétectables (Lee *et al.*, 2000). XpsN protègeraient XpsL et XpsM se protégeraient de la protéolyse. Lors d'expériences de co-purification, XpsL et XpsN sont co-élués avec XpsM. XpsN se détache en premier de ce complexe mais peut se réassocier. Un modèle d'association et dissociation du complexe XpsL-XpsM-XpsN a été proposé (Figure 30) (Tsai *et al.*, 2002).

Quelles sont les régions impliquées dans l'interaction GspL/GspM ? Dans les expériences de double-hybride levure, Py et associés ont détecté une forte interaction entre les régions périplasmiques d'OutL et OutM (Py *et al.*, 2001). La région C-terminale d'OutM comprise entre les résidus 84 et 162, comprenant le domaine de type ferrédoxine, est responsable de l'interaction avec OutL_{péri}. La mutagenèse de XcpZ (GspM) par l'insertion de peptides a exposé trois régions nécessaires pour l'interaction avec XcpY (GspL) : deux se trouvent dans la région périplasmique et une dans le TMS (Robert *et al.*, 2002). Johnson et associés ont montré que les interactions EpsM-EpsM et EpsL-EpsM intervenaient par deux régions différentes de la partie périplasmique d'EpsM. En utilisant des dérivés tronqués d'EpsM, ils ont montré qu'une partie de la région périplasmique (résidus 100 à 135 qui correspondent aux brins $\beta 1$, $\beta 2$ et l'hélice $\alpha 2$) était nécessaire à la dimérisation d'EpsM et qu'une autre partie (résidus 84 à 99 formant l'hélice $\alpha 1$) était indispensable pour l'interaction avec EpsL (Johnson *et al.*, 2007). Ces résultats corroborent ceux de la structure

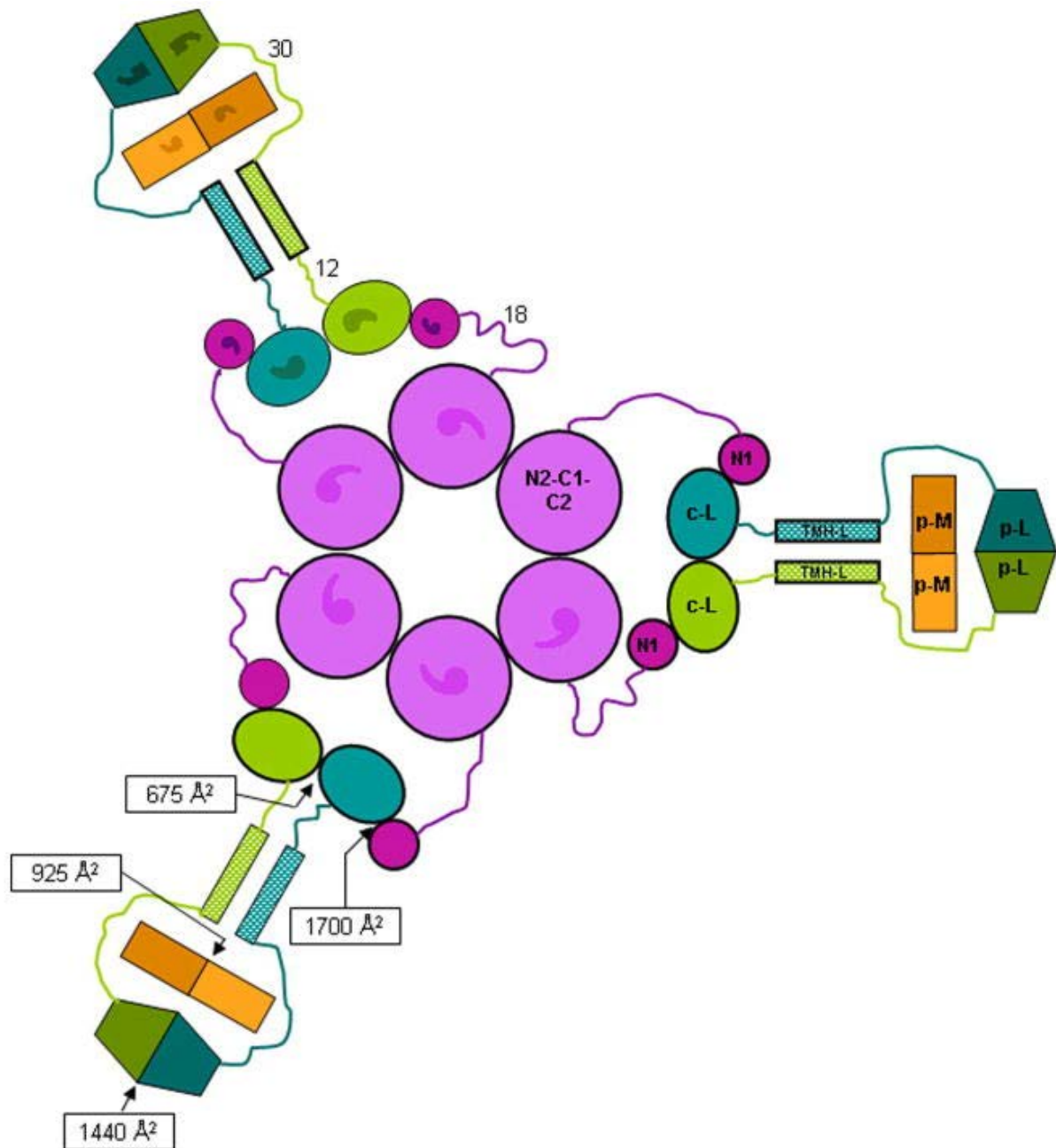


FIGURE 31 : Représentation schématique d'une possible architecture des composants GspE, GspL et GspM selon les structures cristallographiques disponibles des différents composants. GspL est représenté en vert, GspE en violet et GspM en orange. Vue de haut avec le cytoplasme au centre et le périplasme sur le pourtour. (Abendroth *et al.*, 2009).

cristallographique dans laquelle l'interface du dimère d'EpsM est formée par l'hélice $\alpha 2$ du domaine de type ferrédoxine (Abendroth *et al.*, 2004). Il est donc tout-à-fait possible que l'hélice $\alpha 1$ interagisse avec GspL tandis que l'hélice $\alpha 2$ permet la dimérisation de GspM. Les auteurs affirment aussi qu'un mutant *epsM* n'est pas complémenté par un dérivé d'OutM délété des 14 résidus C-terminaux (GFP-EpsM $\Delta 14$), alors que la dimérisation de cette protéine mutée et son interaction avec EpsL ne sont pas affectées. Ceci laisse penser que les 14 derniers acides aminés formeraient un site d'interaction additionnel pour l'interaction avec un autre composant du T2SS. Cette région correspond au brin $\beta 4$ du domaine de type ferrédoxine d'EpsM. Ainsi, des sites d'interaction pourraient être formés ou inclure les brins $\beta 3$, l'hélice $\alpha 1$, l'hélice $\alpha 2$ et le brin $\beta 4$. Comme il a été montré une interaction entre les régions périplasmiques de GspL et GspM, et la formation d'un complexe tripartenaire avec GspC, les deux protéines GspL et GspC pourraient interagir avec GspM par l'un de ces sites. Une interaction entre la région périplasmique d'OutL et la pseudopiline mineure OutJ a été détectée dans les expériences de double-hybride levure (Douet *et al.*, 2004). Bien qu'aucune interaction n'ait été détectée entre GspMpéri et une pseudopiline par cette technique, il est possible que GpsM, ou GspM et GspL ensemble interagissent avec un composant du pilus.

Certaines études précédentes ont laissé supposer que les TMS des composants du T2SS pourraient également intervenir dans le fonctionnement du système. Un peptide inséré dans le TMS de XcpZ (GspM) a aboli la capacité de cette protéine à stabiliser XcpY (GspL) (Robert *et al.*, 2002). La construction des protéines hybrides entre EspL (GspL chez *V. cholerae*) et ExeL (GspL chez *Aeromonas hydrophila*) a montré que le segment transmembranaire d'EspL est également indispensable pour sa co-immunoprécipitation avec EpsM (Sandkvist *et al.*, 2000). Récemment, une homodimérisation du TMS d'EpsM a été montrée par la technique *in vivo* TOXCAT (Sal-Man *et al.*, 2007). Cette technique (Russ and Engelman, 1998) permet de visualiser une interaction entre deux TMS grâce à la fusion en N-terminal de ce segment de la protéine ToxR. La dimérisation de ToxR, dépendante de l'interaction des TMS, va résulter en l'activation du gène *cat* et une résistance au chloramphénicol sera acquise. Un motif de résidus aromatiques WxxW est présent dans le TMS d'EpsM. Les substitutions de ces deux tryptophanes en alanine ont complètement aboli la dimérisation des TMS (Sal-Man *et al.*, 2007). Néanmoins, l'effet de cette absence de dimérisation par les TMS d'EpsM sur le processus de sécrétion n'a pas été étudié.

Avec les données structurales acquises sur les composants EpsL, EpsM et EpsE du T2SS, un modèle de l'architecture possible du complexe L/M/E a été proposé (Figure 31) (Abendroth *et al.*, 2009). Par ailleurs, il est intéressant de mentionner qu'une étude structurale récente des régions périplasmiques des PilO et PilN, les orthologues de GspM et GspL Δ cyt (GspL sans la région cytoplasmique) des pili de type IV a démontré leur repliement en domaine de type ferrédoxine. Cependant, l'interface formée par PilO (orthologue de GspM) est plus large que celle formée par EpsM et est formée essentiellement par le brin β 3 et l'hélice α 2. Les auteurs ont modélisé la même interface pour le dimère d'EpsM et pour l'hétérodimère PilO/PilN (GspM/GspL_{péri}) (Sampaleanu *et al.*, 2009).

Quoiqu'il en soit, GspL semble interagir dans le périplasme avec GspM, et avec la pseudopiline GspJ, et dans le cytoplasme avec GspE et GspF. Les composants du T2SS ancrés ou associés à la membrane interne semblent donc être interconnectés.

III.B.4) Les protéines accessoires GspN, GspA et GspB

Ces trois protéines n'ont pas été retrouvées dans tous les T2SS. GspN est une protéine bitopique de la membrane interne qui est présente dans *K. oxytoca*, *E. carotovora*, *A. hydrophila* et *V. cholerae* (Howard *et al.*, 1993 ; Pugsley and Reyss, 1990 ; Reeves *et al.*, 1993 ; Sandkvist *et al.*, 1997). PulN n'est pas essentiel au T2SS de *K. oxytoca*. En effet, la sécrétion de la pullulanase reste effective à 80% dans un mutant *pulN* (Possot *et al.*, 2000). A l'heure actuelle, aucune autre donnée ne permet de comprendre le rôle de cette protéine.

GspA et GspB ont été retrouvées chez *V. cholerae*, *A. hydrophila* et *E. coli* ; et seulement GspB chez *E. chrysanthemi* et *K. oxytoca*. Le rôle de ces deux protéines GspA et GspB semble diverger selon les organismes. PulB n'est pas nécessaire à la sécrétion de la pullulanase chez *K. oxytoca*, tandis que la sécrétion de pectinases est diminuée de 30% dans un mutant *outB* d'*E. chrysanthemi* (D'enfert and Pugsley, 1989 ; Condemine *et al.*, 1992). ExeA et ExeB, chez *A. hydrophila*, sont des protéines de la membrane interne qui possèdent une large région périplasmique et une large région cytoplasmique pour ExeA. ExeB est instable sans ExeA, elles formeraient donc un complexe *in vivo* (Howard *et al.*, 1996). De plus, le domaine cytoplasmique N-terminal d'ExeA possède un site de liaison à l'ATP, essentiel pour le fonctionnement de la machinerie. Une activité ATPase de ce site a été mise en évidence mais

ExeA n'appartient à aucune des familles d'ATPases connues (Schoenhofen *et al.*, 2005). ExeB présente quelques similarités de structure avec TonB, qui a un rôle dans la transduction d'énergie pour le transport actif du fer (Howard *et al.*, 1996) (voir aussi le chapitre III.B.3.3, GspC et GspD). Les gènes *exeA* et *exeB* sont organisés en opéron et l'insertion d'un transposon dans *exeA*, inactivant aussi *exeB* entraîne l'arrêt de la sécrétion. La sécrétion est restaurée par surproduction de la sécrétine ExeD (Ast *et al.*, 2002). Un phénomène similaire avait été également montré chez *E. chrysanthemi*, où le défaut de la sécrétion suite à une mutation du gène *outB* a été compensé par la surproduction d'OutD (Condemine and Shevchik, 2000). De plus, un complexe entre OutB et OutD a été formé par cross-linking. Les études effectuées chez *A. hydrophila* ont démontré que le complexe ExeA/ExeB conduit la sécrétine ExeD à la membrane externe, mais pour le moment, aucune preuve de formation d'un complexe entre les trois protéines n'a été présentée. En l'absence d'ExeA et ExeB, ExeD s'insère dans un état monomérique dans la membrane interne (Ast *et al.*, 2002). D'autre part, la présence des gènes *gspAB* augmente fortement l'expression de GspG quand les trois gènes sont co-exprimés dans *E. coli* (Francetic *et al.*, 2000).

La région périplasmique d'ExeA contient un domaine de liaison au peptidoglycane qui est essentiel pour l'assemblage de la sécrétine (Howard *et al.*, 2006). Récemment, par co-sédimentation, électrophorèse sur gel natif, filtration sur gel et cross-linking *in vitro*, une interaction entre ce site et le peptidoglycane a été démontrée (Li and Howard, 2010). Le composant précis du peptidoglycane qui interagit avec ExeA n'a pas encore été identifié. Cette interaction est forte car préservée même après traitement du peptidoglycane au SDS. En revanche, ExeA n'interagit pas avec un mucopeptide commercial, laissant supposer que l'interaction avec le peptidoglycane interviendrait sur une large portion du « squelette » créé par le peptidoglycane ou sur une structure précise, peut-être au moment de sa biosynthèse (Li and Howard, 2010). En présence de peptidoglycane, ExeA forme des multimères, dont la majorité semble être de 12 unités. ExeA peut également former des multimères sous l'action d'une température élevée. Une mutation dans le site de liaison au peptidoglycane bloque cette multimérisation. Les auteurs proposent deux hypothèses selon lesquelles l'interaction peptidoglycane/ ExeA abaisserait les contraintes énergétiques ou provoquerait un changement conformationnel dans ExeA facilitant sa multimérisation. Cependant, ils n'excluent pas que deux types de multimères puissent être formés. Etant donné la présence de deux structures circulaires dans le T2SS (GspD et GspE), il semble plausible qu'ExeA, en interaction avec ExeB qui permettrait une transduction d'énergie, forme une structure circulaire allant de la

membrane interne à la membrane externe et créant un passage à travers le peptidoglycane. Cette structure, agissant comme un échafaudage, permettrait la mise en place de la sécrétine dans la membrane externe (Li and Howard, 2010). GspAB pourraient remplacer la pilotine GspS, absente chez *A. hydrophila* et *V. cholerae* (Ast *et al.*, 2002). Pourtant, OutB n'est pas moins indispensable qu'OutS chez *E. chrysanthemi* (Condemine and Shevchik, 2000). La question reste entière pour les organismes ne possédant aucune de ces trois protéines (à notre connaissance), comme *P. aeruginosa* et *X. campestris*.

III.C) La spécificité des systèmes

III.C.1) Les exoprotéines

Les exoprotéines sécrétées par le T2SS sont tout d'abord exportées à travers la membrane interne par le système Sec (Pugsley *et al.*, 1991 ; He *et al.*, 1991) ou pour quelques exoprotéines par le système Tat (Voulhoux *et al.*, 2001 ; Ferrandez and Condemine, 2008). Un peptide signal située en N-terminal des exoprotéines est reconnue par le système Sec ou par le système Tat et clivée à leur arrivée dans le périplasma. Une fois repliées correctement grâce aux chaperonnes périplasmiques, elles pourront être sécrétées par le système de sécrétion (Hirst and Holmgren, 1987). Une question essentielle est de comprendre comment le T2SS distingue les exoprotéines des protéines périplasmiques. Les différents T2SS ne sécrètent qu'un petit nombre d'exoprotéines spécifiques. Par exemple, le T2SS de *K. oxytoca* et d'*E. coli* (ETEC) permet la sécrétion d'une seule exoprotéine, la pullulanase et la toxine LT (heat-labile ou sensible à la chaleur) respectivement. Le système Xcp de *P. aeruginosa* ou le système Out d'*E. chrysanthemi* sont des T2SS qui sécrètent plus d'une dizaine d'exoprotéines (la phosphatase alcaline, des élastases, l'exotoxine A, des phospholipases C, des lipases pour *P. aeruginosa* et une douzaine de pectinases et une cellulase pour *E. chrysanthemi*) (Cianciotto, 2005). Cela implique donc qu'il y ait un « mot de passe » provenant des exoprotéines. Au sein d'un même sécrétome, les exoprotéines ne présentent pas de motif conservé dans la séquence protéique qui pourrait être reconnu par l'un des composants du système de sécrétion.

La formation des ponts disulfure serait un prérequis indispensable pour le processus de sécrétion d'au moins la pullulanase de *K. oxytoca* et des pectates lyases et la cellulase Cel5 d'*E. chrysanthemi* (Pugsley, 1992 ; Shevchik *et al.*, 1995). De plus, l'oligomérisation de certaines exoprotéines, comme la toxine cholérique de *V. cholerae* ou la toxine LT d'*E. coli*, est

préalable à la sécrétion (Hisrt and Holgrem, 1987). Le T2SS permettrait donc la translocation des exoprotéines repliées dans leur conformation tertiaire et quaternaire. Cette considération a poussé à la conclusion que la reconnaissance pourrait se faire grâce à un motif de sécrétion de nature structurale, créé par le repliement. Plusieurs études confirmeraient cette hypothèse. La cellulase Cel5 d'*E. chrysanthemi* est composée du domaine catalytique (CD), d'une région linker (LR) et d'un domaine C-terminal de fixation à la cellulose (CBD). Pour savoir quel domaine était impliqué dans la reconnaissance par le T2SS, plusieurs dérivés ont été testés. Il s'est avéré que les trois domaines étaient nécessaires pour la sécrétion (Py *et al.*, 1993). Le résidu aromatique W43, du CBD, est indispensable pour la sécrétion : la mutation W43A n'a pas d'incidence sur la structure du CBD mais a empêché Cel5 d'être sécrétée. Les mutations dans les résidus proches comme W18A, Q22A, T44A n'affectent pas la sécrétion de la cellulase (Chapon *et al.*, 2000). Dans une autre étude, un résidu tryptophane également, s'est révélé nécessaire à la reconnaissance de l'exoprotéine : l'aérolysine d'*Aeromonas salmonicida* n'est plus sécrétée après la substitution de ce tryptophane (W227) par une leucine ou phénylalanine (Wong and Buckley, 1991). La protéine mutée est exportée par le système Sec et forme des multimères semblables à la protéine sauvage mais elle n'est plus sécrétée et son activité enzymatique est quasi-nulle, suggérant une modification de la structure de la protéine. De même, le résidu S31 de la sous-unité B de la Shiga toxine d'*E. coli* entérohémorragique est indispensable à la sécrétion (Shimizu *et al.*, 2007). Il semble donc qu'une mutation ponctuelle dans une exoprotéine, qui induirait un changement conformationnel, puisse entièrement bloquer sa sécrétion. Ceci va dans le sens d'un motif tridimensionnel. Néanmoins, les changements conformationnels de la shiga toxine suite à la substitution de S31 n'ont pas été démontrés et l'arrêt de la sécrétion suite à une substitution pourrait être dû à une absence d'interaction avec un composant de la machinerie.

L'holotoxine d'*E. coli* est composé de 5 dimères eux-mêmes composés des unités A et B. L'insertion de 7 résidus au C-terminus de l'unité B a généré une protéine incapable de former un dimère avec l'unité A, de former le pentamère final et d'être sécrétée par le T2SS Gsp (Sandkvist *et al.*, 1987). L'interaction entre les unités A et B ne peut plus avoir lieu et cette structure incorrecte n'est pas reconnue par le T2SS. Chez *P. aeruginosa*, l'exotoxine A est composée de deux régions nécessaire à la sécrétion : l'une à son N-terminus et l'autre à son C-terminus (McVay and Hamood, 1995). Dans le but de déterminer le site de reconnaissance dans la pectate lyase PelC d'*E. chrysanthemi*, des protéines hybrides avec la pectate lyase Pel1 d'*E. carotovora* ont été construites (Lindeberg *et al.*, 1998). Ces deux protéines partagent 71%

d'identité mais malgré cela, Pel1 n'est pas sécrétée par le T2SS d'*E. chrysanthemi*. Sur 14 pectate lyases hybrides, 3 ont pu être sécrétées efficacement. Les trois régions impliquées dans la reconnaissance seraient les boucles au C-terminus de PelC, une région dans la partie centrale de la protéine, partiellement recouverte par les boucles C-terminales et la région contenant le site actif de la protéine (Lindeberg *et al.*, 1998).

Chez *K. oxytoca*, en revanche, les changements structuraux de la pullulanase ne semblent pas avoir d'incidence sur la sécrétion. En effet, Sauvonnnet et collaborateurs ont procédé à l'insertion de linkers de 6 à 12 paires de base sur toute la longueur du gène *pulA* codant pour la pullulanase (Sauvonnnet *et al.*, 1995). Parmi 23 insertions, 15 ont provoqué l'arrêt de l'activité enzymatique de cette protéine mais aucun n'a bloqué la sécrétion. La fusion de différentes protéines rapporteurs au N-terminus ou C-terminus de PulA a stoppé la sécrétion, sauf la fusion de BlaM au C-terminus de PulA, même lorsque que les 256 derniers résidus de PulA ont été délétés (Sauvonnnet and Pugsley, 1996). Deux régions de PulA peuvent, ensemble, permettre la sécrétion de la protéine rapporteur BlaM. Ces régions A (résidus 1 à 78) et B (résidus 734 à 815) sont longues d'environ 80 résidus. Néanmoins, la délétion d'une de ces deux régions dans PulA n'affecte pas la sécrétion (Sauvonnnet and Pugsley, 1996) et les délétions des régions A et B dans PulA dépourvue de sa lipidation n'affecte pas sa sécrétion (Francetic and Pugsey, 2005). Une troisième région (résidus 234 à 324) est impliquée dans le processus de sécrétion, appelée région C. La délétion de cette région n'affecte pas la stabilité de la protéine mais bloque sa sécrétion. PulA fusionnée en N-terminal au peptide signal de PelB et en C-terminal à la protéine rapporteur NucB peut être sécrétée uniquement si la fusion PulA/NucB se trouve en aval de la région C (Francetic and Pugsley, 2005). Il y aurait donc trois régions de PulA reconnues par le T2SS mais la reconnaissance ne nécessiterait pas un positionnement immuable des résidus impliqués.

Le seul point commun visible entre les différentes exoprotéines sécrétées par les T2SS est la présence d'une quantité importante de brins β (Lu and Lory, 1996) ce qui n'est pas spécifique aux exoprotéines ! L'ensemble de ces résultats font ressortir une variabilité forte des motifs de reconnaissance des exoprotéines par le T2SS. Chaque espèce aurait donc développé son/ses propres motifs de sécrétion, qui peuvent dans certains cas être reconnus par le T2SS d'une autre espèce.

III.C.2) GspC et GspD : gardiens de la spécificité ?

Plusieurs études ont laissé supposer un rôle important à la spécificité de sécrétion de ces deux protéines. Tout d'abord, les deux gènes *outD* et *outC* sont toujours organisés en opéron (Figure 13) (Filloux, 2004). XcpP et XcpD de *P. aeruginosa* peuvent être remplacés par leurs homologues de *P. alcaligenes* et restaurer la sécrétion, mais uniquement lorsqu'ils sont en pair (de Groot *et al.*, 2001). En revanche, les homologues OutC et OutD d'*E. chrysanthemi* ne restaurent pas la sécrétion chez *P. aeruginosa* (Gérard-Vincent *et al.*, 2002). Chez *P. aeruginosa*, un couple GspC/GspD supplémentaire, appelé XphA/XqhA a été mis en évidence (Michel *et al.*, 2007). Ces protéines orphelines peuvent remplacer la sécrétine XcpQ et XcpP : un mutant *xcpQ xcpP* est complété par XphA/XqhA et les exoprotéines sont sécrétées à l'exception de l'aminopeptidase PaAP. L'opéron *xphA-xqhA* serait exprimé lors des premiers stades de développement de la bactérie et ce couple de GspCD orphelines pourrait être impliqué dans la sécrétion d'exoprotéines pendant la phase exponentielle de croissance et améliorer l'implantation des bactéries dans l'hôte (Michel *et al.*, 2007).

Dans les T2SS Out d'*E. chrysanthemi* et *E. carotovora*, bien que les composants des machineries soient homologues, les exoprotéines d'une espèce ne peuvent pas être sécrétées par le système de l'autre espèce. Des analyses plus poussées ont montré que seuls les gènes *outC* et *outD* ne peuvent pas être remplacées par leurs homologues (Lindeberg *et al.*, 1996). De même, dans *K. oxytoca*, seuls PulD et PulC ne peuvent pas être efficacement remplacés par leur proche homologue d'*E. chrysanthemi* ou *E. carotovora*, et sont donc considérées comme les « gardiens » de la spécificité du système (Possot *et al.*, 2000).

Grâce à ces études, GspC et GspD ont été désignées comme les facteurs de reconnaissance des exoprotéines. En plus de leur fonctionnement par paire, GspC et GspD interagiraient avec au moins certaines exoprotéines. Le domaine N-terminal de la sécrétine OutD interagit *in vivo* et *in vitro* avec la pectate lyase PelB d'*E. chrysanthemi* mais pas avec PelC d'*E. carotovora* (Shevchik *et al.*, 1997). Les régions de GspC impliquées dans l'interaction avec une exoprotéine semblent varier même au sein du même organisme. Ainsi, lorsque le domaine PDZ d'OutC est délété, trois exoprotéines (PelI, PemA et CelZ) sont sécrétées normalement mais la sécrétion d'autres exoprotéines (PelB, PelC, PelD, PelE, PelL) est abolie. Ce même profil est observé avec un mutant *outC* d'*E. chrysanthemi* complété par OutC d'*E. carotovora*. Le remplacement du PDZ d'*E. carotovora* par celui d'*E.*

chrysanthemi restaure la sécrétion de l'intégralité des pectinases d'*E. chrysanthemi*. Ces résultats introduisent de nouvelles questions sur les interactions qui pourraient intervenir entre le PDZ et les exoprotéines. De plus, l'échange entre les deux sécrétines de ces espèces provoque la sécrétion des exoprotéines d'*E. carotovora* ainsi que les exoprotéines PelI et PemaA d'*E. chrysanthemi* par *E. chrysanthemi*. Le domaine N-terminal de GspD serait responsable de la spécificité de la sécrétion : PelC et CelZ ne sont plus sécrétées en présence du domaine N-terminal d'OutD d'*E. carotovora* (Bouley *et al.*, 2001). Chez *E. chrysanthemi*, trois catégories d'exoprotéines se dessinent : 1) les exoprotéines majoritaires dont la sécrétion dépend du domaine PDZ d'OutC et de la région N-terminale d'OutD, 2) CelZ qui est indépendant du PDZ mais dépendant du domaine N-terminal d'OutD et 3) PemaA et PelI qui sont indépendantes du PDZ et peuvent être sécrétées en présence de l'une ou l'autre sécrétine (Bouley *et al.*, 2001).

Après ces nombreux travaux, Robert et collaborateurs (Robert *et al.*, 2005) ont montré par substitution des différents domaines de XcpP (GspC) de *P. aeruginosa* avec ceux de *P. alcaligenes* qu'aucun domaine de XcpP n'est directement impliqué dans la spécificité. En accord avec ces résultats, HxcP (GspC du T2SS dit secondaire de *P. aeruginosa*) ne contient ni PDZ ni domaine coiled-coil (Peabody *et al.*, 2003). Dans deux études antérieures, de nombreuses parties des domaines N- et C-terminaux de PulD ont été échangées avec celles de la sécrétine pIV des phages filamenteux et celles d'OutD. Aucun domaine précis de PulD n'était impliqué dans la spécificité (Daefler *et al.*, 1997 ; Guilvout *et al.*, 1999). En revanche, une étude très récente est cohérente les résultats obtenus chez *E. chrysanthemi* (Shevchik *et al.*, 1997) en démontrant par résonance plasmonique de surface une interaction spécifique entre l'exoprotéine LT et la partie N-terminale de la sécrétine GspD d'*E. coli* (Reichow *et al.*, 2010). De plus, la structure de l'exoprotéine de *V. cholerae* peut être insérée dans le vestibule périplasmique formé par la partie N-terminale d'EspD (Figure 17). Elle est bloquée par le resserrement de l'anneau formé par le domaine N3 d'EspD. Cet anneau devra subir des changements conformationnels conséquents pour libérer le passage (Reichow *et al.*, 2010). Or, une étude du laboratoire a montré qu'OutC pouvait interagir avec une région comprenant les domaines N2-N3 d'OutD (Login *et al.*, 2010). GspC pourrait donc avoir un rôle dans l'élargissement du pore de la sécrétine GspD. Reichow et associés ont également suggéré que les exoprotéines pourraient se fixer sur le chapeau du pseudopilus formé par GspKII, puisque ce chapeau et l'exoprotéine interagissent avec la région périplasmique de GspD, mais aucune interaction entre les pseudopilines mineures et une exoprotéine n'a été montrée jusqu'à

maintenant, peut-être à cause de l'absence des autres composants du système ou d'une interaction de faible affinité (Reichow *et al.*, 2010).

L'ensemble de ces résultats montrent que la spécificité du système de sécrétion de type II est un phénomène complexe. Chaque organisme semble avoir adopté une stratégie de reconnaissance des exoprotéines propre. Ainsi, le même système de sécrétion pourrait faire intervenir un ou plusieurs motifs structuraux sur chaque exoprotéine et l'un ou l'autre ou les deux des « gardiens » de la machinerie, GspD et GspC. Ce postulat amène à devoir chercher parmi de très nombreuses combinaisons et apparaît comme le seul point de fonctionnement majeur qui différencie les systèmes entre eux.

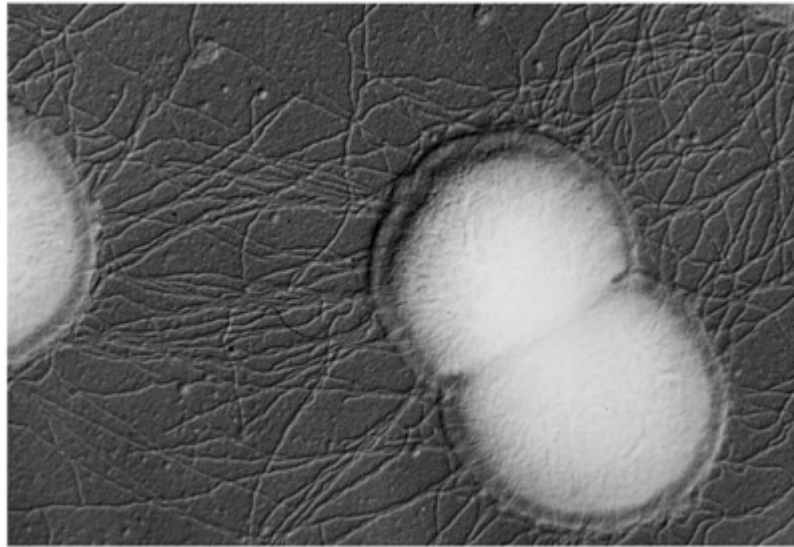


FIGURE 32 : Pili de type IV (a) de la bactérie *Neisseria gonorrhoeae*. Interactions entre plusieurs pili pour former des microcolonies (d'après Craig *et al.*, 2004)

TABLEAU 1 : Nomenclature des composants des systèmes de biogénèse des pili de type IVa chez les bactéries *P. aeruginosa* et *Neisseria* sp.

Bactérie	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Neisseria</i> sp.
Piline majeure	PilA	PilE
Pilines mineures	PilV, PilW, PilX, PilE, FimU, FimT	PilH, PilI, PilJ, PilK, PilX
Sécrétine	PilQ	PilQ
Pilotine	PilF	PilW
ATPase d'élongation	PilB	PilF
ATPase de rétraction	PilT, PilU	PilT
Protéine intégrale de la MI	PilC	PilG
Lipoprotéine de la MI	PilP	PilP
Protéines bitopiques de la MI	PilN, PilO	PilN, PilO
Protéine cytoplasmique	PilM	PilM

IV. Parallèle avec les systèmes de biogénèse des pili de type IV

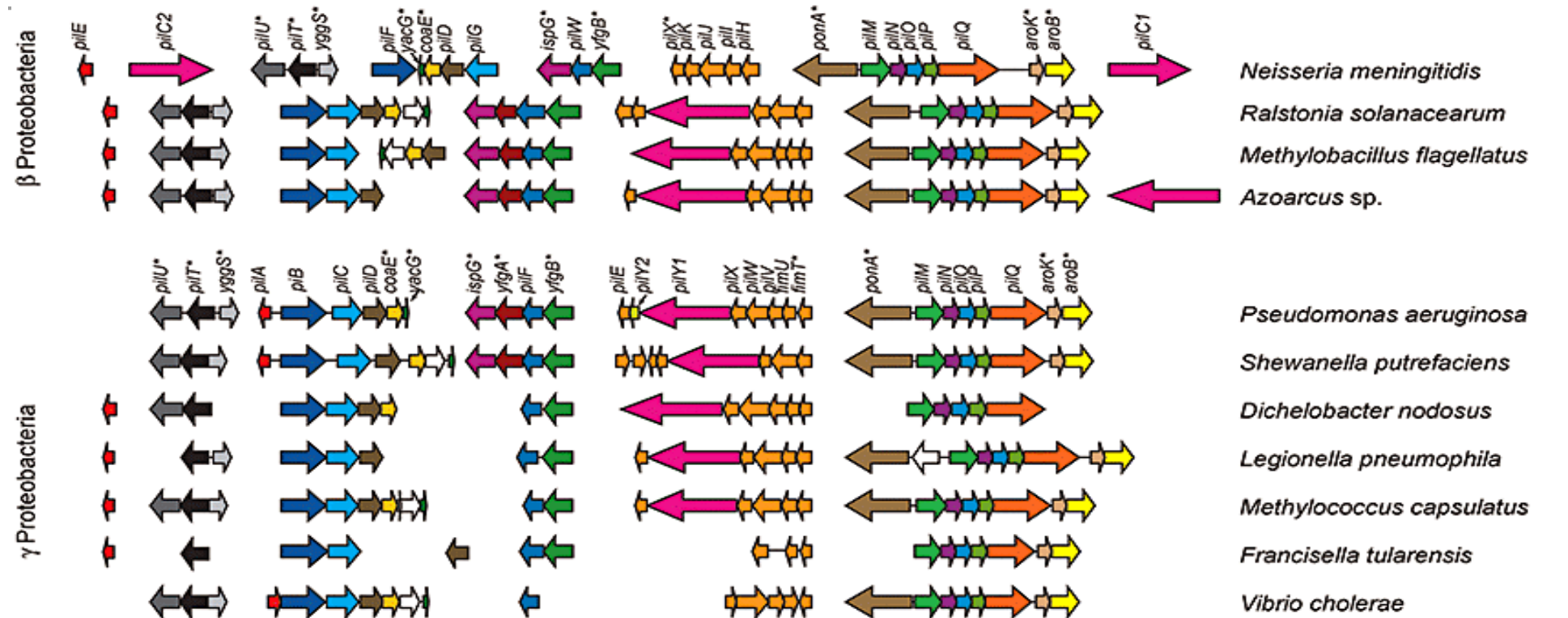
Les études simultanées des pili de type IV et des systèmes de sécrétion a permis dans le passé de mieux comprendre le fonctionnement et l'assemblage de ces deux machineries complexes. Les informations collectées sur le composant d'un système sont souvent applicables à l'homologue structural de l'autre système. En tout cas, elles permettent parfois de formuler une hypothèse de départ. C'est pourquoi nous présentons ici une brève présentation des dernières avancées sur les pili de type IV.

IV.A) Fonctions des pili de type IV

Les bactéries possèdent plusieurs types de structures extracellulaires, différenciées par les caractéristiques morphologiques et depuis quelques années par leurs machineries d'assemblage. Les pili (ou fimbriae) de type IV sont les pili les plus répandus chez les bactéries, avec une prédominance chez les protéobactéries (Mattick, 2002). Ce sont les seules structures extracellulaires à être présentes chez les bactéries à Gram négatif et positif. Les pili de type IV (T4P) sont très fins (50 à 60 Å de diamètre), longs et flexibles et peuvent interagir pour former des sortes de cordons (Figure 32) (Pelicic, 2008). Tous les T4P partagent de nombreuses similitudes structurellement et dans leur séquence. Leur rôle est multiple. Ils participent à l'adhérence, comme par exemple chez *P. aeruginosa* pour laquelle ils sont le principal facteur d'adhérence aux muqueuses (Doig *et al.*, 1988) ou chez *Neisseria* sp. en permettant l'adhérence aux cellules épithéliales humaines (Rytönen *et al.*, 2001). Il semble que les bactéries pathogènes tendent d'échapper au système immunitaire de leur hôte par la diversité des antigènes, des modifications post-traductionnelles et même la sécrétion de S-piline, une forme soluble déletée de la région transmembranaire de la piline, composant majeur du pilus (Long *et al.*, 1998). Les pili de type IV sont aussi impliqués dans la formation de microcolonies de bactéries à Gram négatif : les pili forment des agrégats, résultant en « l'autoagglutination » des bactéries (Kirm *et al.*, 2000). Chez *N. gonorrhoeae*, il a été montré que la présence des pili de type IV augmentait de 1000 fois l'efficacité de la transformation. L'ADN serait fixé sur le pilus et amené à l'espace intracellulaire grâce au processus de rétraction du pilus (Aas *et al.*, 2002). Selon le même principe, les pili de type IV de *P. aeruginosa* et *V. cholerae* pourrait servir à la transduction des phages PO4 et CTXφ respectivement (Waldor and Mekalanos, 1996). D'autres

Type IVa pili

Proteobacteria



Type IVb pili

Bundle-forming pilus



EPEC

FIGURE 33 : Organisation des gènes codant pour les T4P chez quelques espèces. Les gènes codant pour des protéines de fonctions similaires sont représentés par les mêmes couleurs (Pelicic, 2008)

rôles pourraient exister, comme l'induction de l'apoptose des cellules épithéliales (Gill *et al.*, 2003). Enfin, les pili de type IV sont responsables de la mobilité de type twitching. Les bactéries à Gram négatif utilisent ces mouvements sur les surfaces semi-solides comme le sont les muqueuses (Bradley, 1980). Le pilus s'attache à la surface puis se rétracte dans la cellule avec une force allant jusqu'à 100pN, provoquant l'avancée de la cellule (Maier *et al.*, 2002). Ce processus nécessite une ATPase de rétraction (PilT) : les sous-unités de pilines sont désassemblées et se dispersent dans les membranes interne et externe, jusqu'à leur réassemblage (Skerker and Berg, 2001 ; Kaiser, 2000).

L'organisation cellulaire du système de biogénèse des pili de type IV a été très peu étudié chez les bactéries à Gram + mais quelques informations sont disponibles sur le fonctionnement des T4P chez les bactéries à Gram –, spécialement sur le pilus et la sécrétine chez *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria*, *Escherichia coli* et *Vibrio cholerae*. Les machineries d'assemblage sont composées de 10 à 18 gènes, qui peuvent être dépendants de systèmes de régulation complexes (Figure 33). Les pili sont majoritairement composés de la piline, dont les caractéristiques seront précisées plus tard. Selon la longueur du peptide signal qu'elle possède en N-terminal et la longueur de la protéine mature, on distingue deux types de T4P : le T4Pa et le T4Pb, qui peuvent d'ailleurs coexister dans la même bactérie (Kachlany *et al.*, 2001). Au fur et à mesure des travaux parallèles sur ces deux systèmes, des différences notables sont apparues, consolidant cette classification. Dans la plupart des cas, les pilines de T4Pa ont un peptide signal court et la protéine mature est plus courte que celle des T4Pb (environ 150 résidus contre 190). Dans les T4Pa, les gènes de biosynthèse sont toujours dispersés sur le chromosome mais toujours flanqués des mêmes gènes de ménage. Un noyau de protéines est essentiel à la formation du pilus, notamment l'opéron des gènes *pilMNOPQ*. Au contraire, les gènes codant la machinerie d'assemblage du pilus de type IVb sont moins nombreux et toujours groupés. De plus, la comparaison des deux types a mis en évidence que le noyau de gènes essentiels dans le T4Pa ne correspond pas aux gènes essentiels à la formation des T4Pb et *vice versa* (Pelicic, 2008). Les T4Pa et T4Pb semblent donc phylogénétiquement éloignés. Le but de ce chapitre est d'établir un parallèle entre les systèmes de sécrétion de type II et les systèmes de biogénèse des pili de type IV. L'accent sera mis sur les T4Pa, qui sont les plus proches phylogénétiquement du T2SS. Les deux organismes dans lesquels le T4Pa est le plus étudié sont *P. aeruginosa* et *Neisseria meningitidis*. L'analogie entre les T4P et les T2SS a été suggérée sur la base de la similarité entre la piline PilV de *P. aeruginosa* et les composants du pilus des T2SS, appelés par la suite pseudopilines (Alm and Mattick, 1995). Les auteurs d'une

étude phylogénétique, sur la base des protéines homologues GspE/PilB et GspF/PilC, proposent que les systèmes de sécrétion de type II et pili de type IV soient issus d'un système ancestral (Peabody *et al.*, 2003).

Faute d'une nomenclature commune, les protéines homologues des T4P des différentes espèces peuvent avoir un nom différent selon la bactérie considérée. Par exemple, l'homologue de GspF correspond à PilC chez *P. aeruginosa* et à PilG chez *N. meningitidis*. Certains composants des T4P ont le même nom dans toutes les espèces, comme la sécrétine PilQ, mais deux protéines ayant le même nom peuvent être totalement différentes. Par exemple, PilW est la pilotine chez *N. meningitidis* mais PilW correspond à une piline mineure chez *P. aeruginosa*.

IV. B) Architecture de la machinerie de biogénèse des T4Pa

IV.B.1) Le pilus

Le pilus est majoritairement composé de la piline PilA ou PilE (chez *P. aeruginosa* et *Neisseria* sp. respectivement). PilV, PilW, PilX, PilE, FimT et FimU sont des pilines mineures de *P. aeruginosa* et PilH, PilI, PilJ, PilK, PilX sont les pilines mineures de *N. meningitidis*. Le rôle des pilines mineures est obscur. Chez *P. aeruginosa*, PilX et/ou FimU contrôlraient l'assemblage et l'apparition du pilus à la surface, mais pas sa terminaison et toutes les pilines mineures seraient incorporées au pilus (Giltner *et al.*, 2010). L'augmentation ou la diminution de la quantité des pilines mineures quand l'une d'elles est mutée montrent l'interdépendance des pilines et suggèrent, avec d'autres indications, que les pilines mineures forment un complexe (Giltner *et al.*, 2010). FimT est la seule piline non essentielle aux fonctions du pilus (Giltner *et al.*, 2010). Dans cette très récente étude, plusieurs sets de pilines mineures ont été retrouvés en plusieurs points du pilus. Les auteurs proposent qu'un complexe formé par les pilines mineures promeuve l'initiation du pilus, formant un chapeau comme sur le pseudopilus des T2SS, mais ce complexe serait également incorporé tout au long du filament (Giltner *et al.*, 2010). Cette proposition n'a pas d'équivalent dans le T2SS. La courte longueur du pseudopilus pourrait ne pas nécessiter l'intégration de plusieurs de ces complexes. De plus, les pilines mineures sont plus nombreuses dans les pili de type IV que dans les T2SS et varient selon la bactérie. Dans *P. aeruginosa*, cinq allèles de PilA ont été trouvés et chacun de ces allèles fonctionneraient avec un set de pilines mineures spécifiques (Giltner *et al.*, 2010a). Contrairement aux pseudopilines du T2SS pour lesquelles seules les structures des régions C-

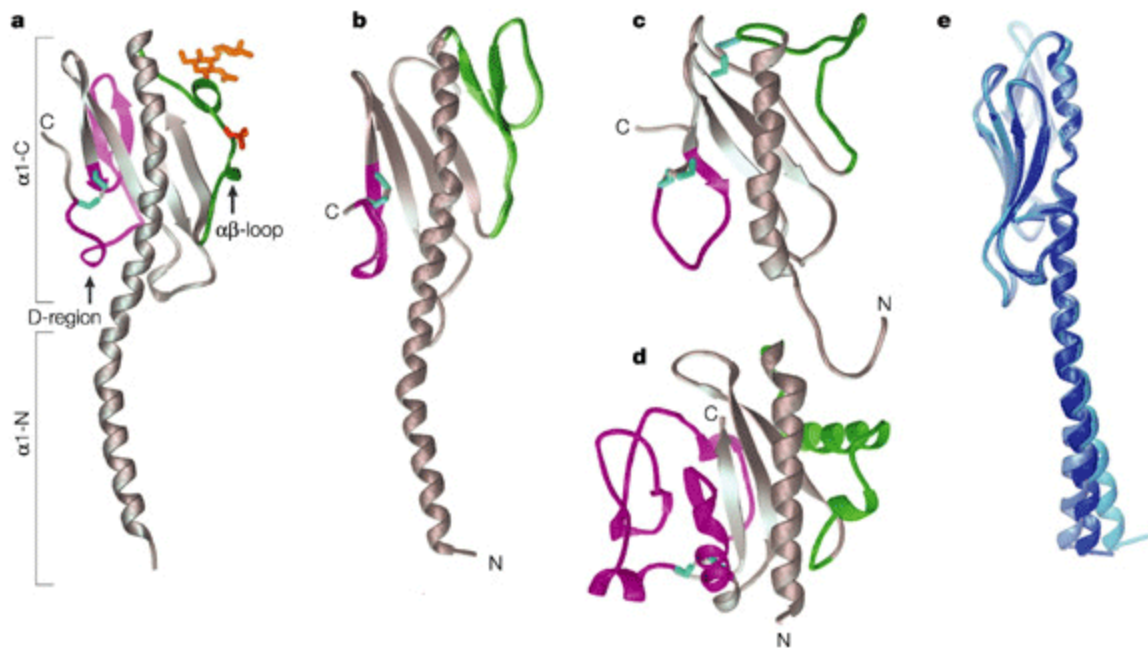


FIGURE 34 : Structures cristallographiques des pilines des T4P. (a) structure de la piline entière PilE de *N. gonorrhoeae*. (b) structure de la piline entière PilA de *P. aeruginosa* K. (c) structure du domaine soluble de PilA de la souche *P. aeruginosa* K122-4. (d) structure du domaine soluble de la piline majeure TcpA du T4Pb de *V. cholerae*. (e) Superposition de trois structures de PilA trouvées dans les mailles de cristaux, montrant la flexibilité de la piline (Craig *et al.*, 2004).

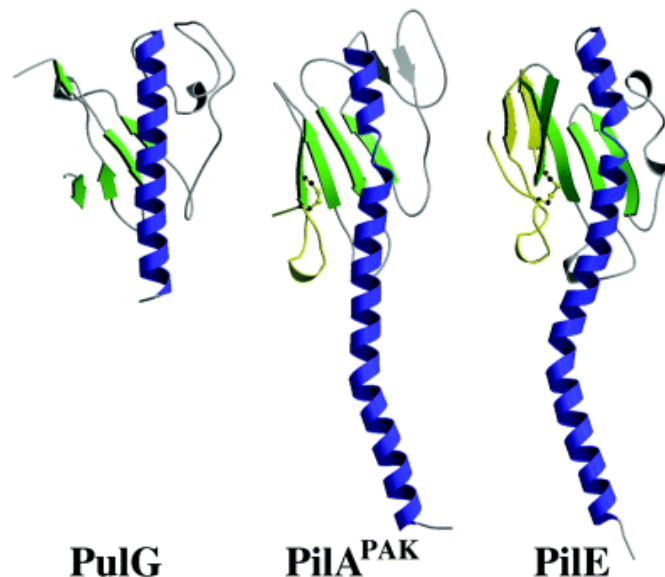


FIGURE 35 : Comparaison des structures cristallographiques du domaine soluble de PulG, pseudopiline majeure du T2SS chez *K. oxytoca*, PilA et PilE, pilines majeures des T4Pa de *P. aeruginosa* et *N. gonorrhoeae* (Kohler *et al.*, 2004).

terminales sont disponibles, les structures de deux pilines entières PilA de *P. aeruginosa* et PilE de *N. gonorrhoeae* ont été résolues. Les pili ont été purifiés directement à partir de l'hôte, désassemblés avec du détergent. Puis les monomères ainsi récupérés ont été cristallisés (Craig *et al.*, 2003 ; Parge *et al.*, 1995). Le mécanisme global d'assemblage des pili semblent être le même pour tous les T4Pa. En effet, *P. aeruginosa* et *N. gonorrhoeae* sont capables d'assembler les pilines de l'autre espèce en pilus (Winther-Larsen *et al.*, 2007).

Toutes les pilines sont exprimées sous la forme de précurseurs, les prépilines. PilD est la prépiline peptidase responsable du clivage et de la méthylation des prépilines. La dernière glycine du peptide signal, contenue dans la séquence conservée GF(M)XXXE, est le résidu indispensable au clivage mais le glutamate en 5^{ème} (ou parfois en 6^{ème}) position de la protéine mature est important pour l'assemblage qui va suivre (Strom and Lory, 1991). Il a été proposé que ce glutamate neutraliserait la charge positive de l'extrémité N-terminale (Craig *et al.*, 2004). Dans la prépiline peptidase, deux aspartates de la boucle cytoplasmique C-terminale sont importantes (LaPointe and Taylor, 2000). La séquence signal est la même dans les prépilines du T2SS et du T4P ; de plus, les prépiline peptidases TapD et PilD chez *A. hydrophila* et *P. aeruginosa* sont aussi appelées ExeO et XcpA respectivement puisqu'elles ont aussi la fonction de prépiline peptidase GspO dans les T2SS. Il est intéressant de remarquer que dans les organismes n'ayant pas de pili de type IV décrits, GspO fait partie de l'opéron comportant les gènes principaux du T2SS (Figure 13).

Les pilines sont composées d'une hélice $\alpha 1$ N-terminale, un domaine globulaire, une boucle $\alpha\beta$ et une région D (Figure 34). L'hélice $\alpha 1$, formée par une cinquantaine de résidus, mesure environ 85 Å. Les 20 premiers résidus forment une région hydrophobe (Alm and Mattick, 1997). Dans les deux structures des pilines entières PilA et PilE, deux coudes donnent à l'hélice $\alpha 1$ une forme de S : une glycine ou une proline en position 22 et une proline en position 42 (qui ne sont pas conservées dans les T4Pb). Il est intéressant de noter que le résidu P22 de la pseudopiline PulG est essentiel à la piliation (Campos *et al.*, 2010). Il semblerait donc que ce coude soit nécessaire à l'assemblage du pilus. Néanmoins, les deux coudes sont absents dans les pilines des T4Pb. Les derniers résidus C-terminaux hydrophobes de cette hélice α interagissent avec la région globulaire et la face hydrophile est exposée à la surface de la protéine tant que le pilus n'est pas formé (Craig *et al.*, 2004). La superposition de trois structures indépendantes de PilA fait remarquer la flexibilité de l'hélice $\alpha 1$: quand les extrémités C-terminales sont superposées, les extrémités N-terminales sont éloignées de 10 Å (Figure 34, e) (Craig *et al.*, 2003). La région N-terminale hydrophobe est probablement enfouie à l'intérieur du pili. Plusieurs expériences ont poussé à cette supposition : la délétion de ce

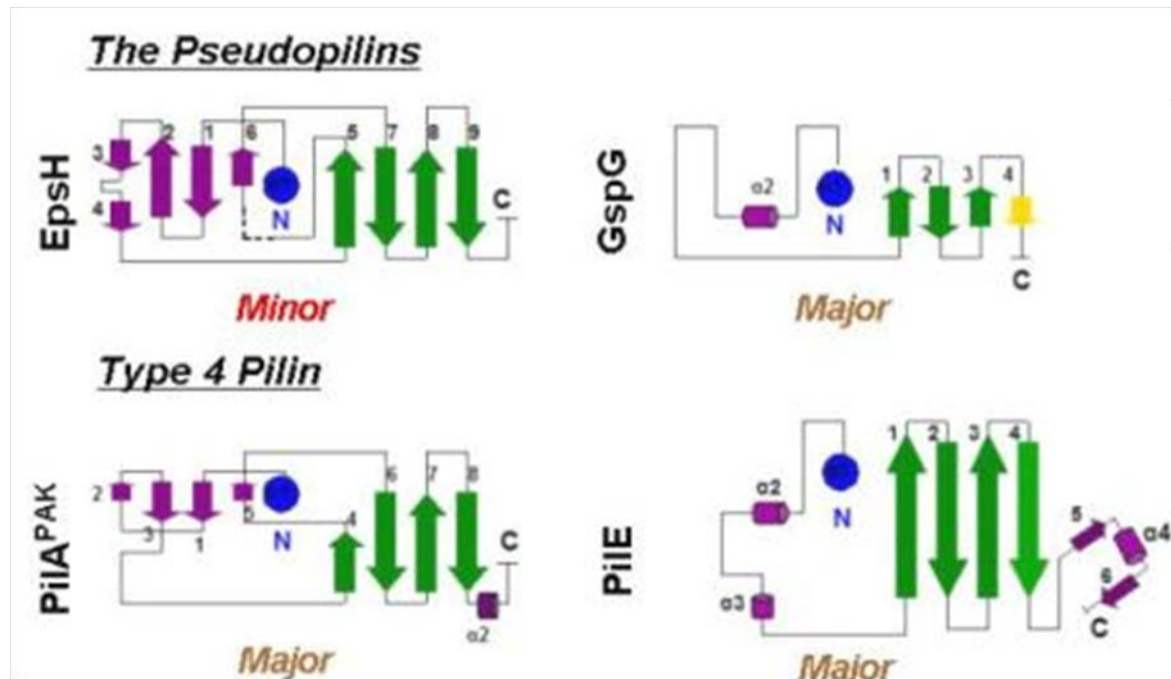


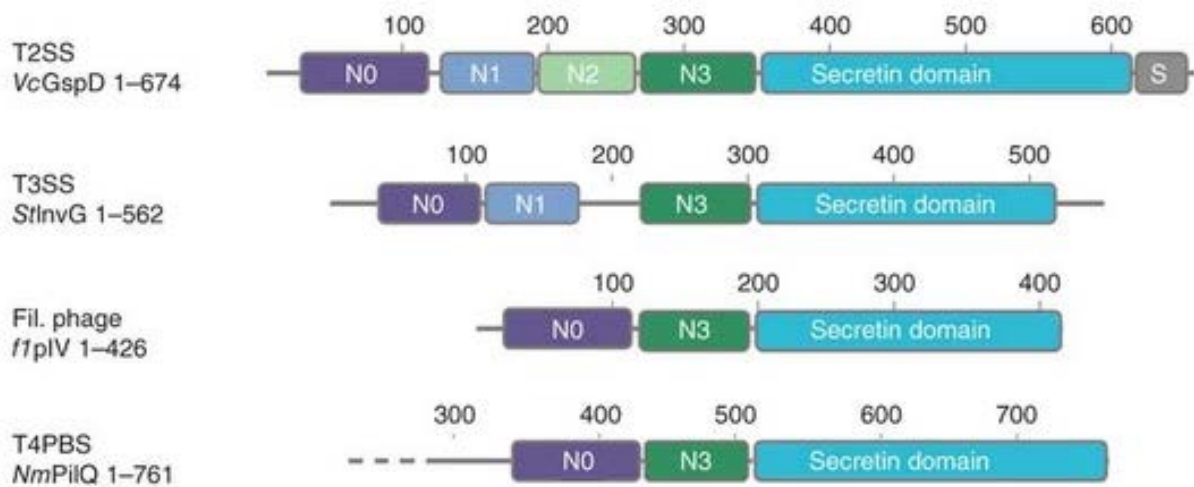
FIGURE 36 : Comparaison des diagrammes de topologie des pseudopilines EpsH et PulG (GspG) des T2SS avec ceux des pilines majeures PilA et PilE des T4Pa (d'après Yanez *et al.*, 2008). Le feuillet β est indiqué en vert avec la petite région D en violet qui la suit, et la région $\alpha\beta$ en violet

domaine ne fait pas perdre la capacité d'adhérence au domaine globulaire (Keizer *et al.*, 2001), l'utilisation de détergents est nécessaire à la dissociation du pilus (Craig *et al.*, 2003) et l'assemblage du pilus est affecté par des mutations ponctuelles dans cette région (Strom and Lory, 1991).

La région globulaire est composée de l'extrémité C-terminale de l'hélice α et de 4 brins β formant un feuillet antiparallèle. Malgré un brin β supplémentaire et une séquence très divergente, la région globulaire de TcpA, la piline majeure du T4Pb de *V. cholerae*, est structuralement très proche de PilA de *P. aeruginosa* (Craig *et al.*, 2004). Les pilines possèdent également deux régions dites variables, dépassant sur les côtés de la région globulaire. La boucle $\alpha\beta$ est placée entre l'hélice α_1 et le feuillet β (Craig *et al.*, 2003). Selon les pilines, elle est constituée de brins β dits feuillet mineur (comme dans PilA de *P. aeruginosa*) ou d'une ou deux hélices α (comme dans PilE de *N. gonorrhoeae*). La région D, pour « disulphide-bridged region », contient une cystéine conservée qui va former un pont disulfure avec une autre cystéine conservée du domaine globulaire (Hansen and Forest, 2006). Entre 12 et 29 résidus composent cette région dans les T4Pa (Craig *et al.*, 2004) qui est à l'opposé de la boucle $\alpha\beta$. Cette région serait enfouie à l'intérieur du pilus mais accessible par le haut du pilus, et l'hypothèse d'un rôle dans l'attachement cellulaire par cette région D a été émise. Elle est en tout cas requise pour la stabilité des protéines.

Les structures de plusieurs pseudopilines, notamment des domaines solubles de PulG, XcpT, EpsH, GspI, GspJ et GspK ont permis de voir que les domaines globulaires chez celles-ci sont plus petits que ceux des pilines mais sont structuralement très proches, à l'exception d'EpsH dont le domaine globulaire et la boucle $\alpha\beta$ sont plus larges que ceux des pseudopilines et des pilines. Il est très intéressant de noter que la structure d'EpsH présente plus de similarités avec celle de PilA qu'avec la pseudopiline majeure PulG (Figure 36) (Yanez *et al.*, 2008). La pseudopiline mineure GspK possède une large région, la région α , dans le domaine globulaire qui est absente dans les autres pseudopilines et pilines. La boucle $\alpha\beta$ est un feuillet β dans EpsH et PilA alors que celle de PulG est une petite hélice α . Contrairement aux pilines de T4P, les pseudopilines du T2SS ne possèdent pas la région D et il n'y a pas de pont disulfure formé dans le domaine globulaire à l'exception de PulK chez *P. aeruginosa* (Figure 35) (Hansen and Forest, 2006). Si la région D est réellement impliquée dans l'attachement des pili, son absence chez les pseudopilines est cohérente avec leur fonction. Les structures des domaines solubles des GspG d'*E. coli* et *Vibrio* sp. ont permis de montrer que la stabilité des pseudopilines est acquise

A.



B.

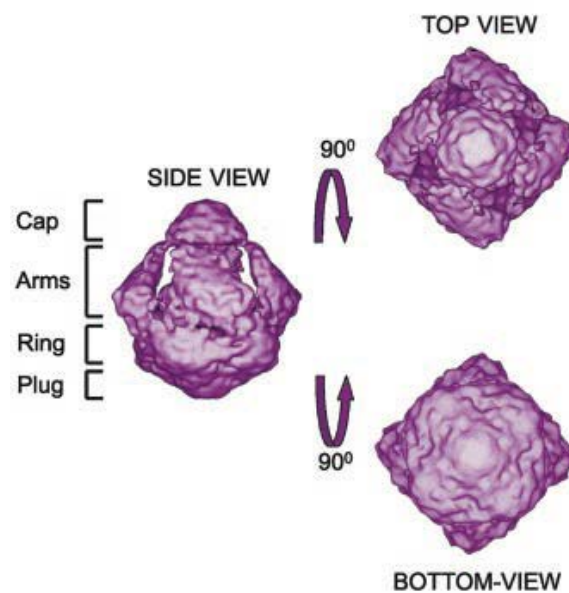


FIGURE 37 : Structure de la sécrétine PilQ des T4P. (A) Représentation schématique de quatre sécrétines GspD, InvG, pIV et PilQ de la superfamille des sécrétines. La sécrétine représentée pour les T2SS est celle de *Vibrio cholerae*, et pour le T4Pa celle de *Neisseria meningitidis*. La région N-terminale est composée des domaines N0 à N3 selon la sécrétine. Le domaine C-terminale est ici appelé « secretin domain ». (d'après Reichow *et al.*, 2010). (B) Structure de PilQ analysée par cryo-microscopie électronique à une résolution de 12 Å (Collins *et al.*, 2004).

grâce à la fixation d'un ion calcium dans le feuillet β de la région globulaire (Korotkov *et al.*, 2009). En effet, les substitutions des résidus aspartate du domaine de fixation de l'ion Ca^{2+} de ces pseudopilines majeures ont résulté en un arrêt de la sécrétion par le T2SS (Korotkov *et al.*, 2009). Un site de fixation au calcium est également présent dans GspK mais est localisé sur le haut de la protéine (Korotkov and Hol, 2008). Les pseudopilines pourraient donc être stabilisées de différentes manières par les ions calcium. De plus, le modèle d'assemblage du pseudopilus montre une organisation hélicoïdale à droite, comme les pili de type IV (Campos *et al.*, 2010). Le résidu glutamate en 5^{ème} position de la protéine mature des pilines est conservé dans les pseudopilines et serait impliqué dans les deux systèmes dans la formation d'interactions électrostatiques.

IV.B.2) La sécrétine et sa pilotine

Les sécrétines des T4P font parties de la superfamille des sécrétines à laquelle appartiennent les GspD des T2SS (Figure 37). Les sécrétines du T4P sont l'un des quatre constituants des T4P à présenter des homologies de séquence avec les composants du T2SS (Alm and Mattick, 1997). Elles sont composées d'un domaine C et d'un domaine N, lui-même composé des sous-domaines N0 et N3. Elles ne possèdent pas en revanche les domaines N1, N3 et S (domaine de fixation de la pilotine) des GspD (Figure 37). Comme pour les autres sécrétines, la région N-terminale de PilQ est située dans le périplasme (Frye *et al.*, 2006). Elle contient des répétitions d'un octapeptide PAKQQAAA unique dans la famille des sécrétines (Tonjum *et al.*, 1998).

PilQ forme un dodécamère symétrique, qui n'est pas sensible à la chaleur ni au SDS (Collins *et al.*, 2001). La structure quaternaire de la sécrétine PilQ a été résolue à une résolution de 12 Å par cryo-microscopie électronique (Collins *et al.*, 2004). Le pore formé par ce dodécamère est plus petit que ceux formés par les sécrétines du T2SS : tandis que le pore de XcpQ (GspD) fait 95 Å, celui de PilQ fait 53 Å. Une autre différence significative entre les GspD et PilQ semble être l'absence d'une chambre extracellulaire et une seule barrière dans PilQ. Ceci est étonnant car le domaine C de PilQ est aussi long que le domaine C de GspD, qui forme dans cette sécrétine la chambre extracellulaire. Un pilus périplasmique a été détecté dans un mutant *pilQ*, montrant que la sécrétine des pili de type 4 est la seule voie de sortie des pili (Carbonelle *et al.*, 2005). Une interaction entre un monomère de PilQ et des pili purifiés a été mise en évidence par chromatographie d'affinité (Collins *et al.*, 2005). La région N-terminale et

la région C-terminale de PilQ sont capables d'interagir avec les pili, mais pas la région centrale. En revanche, une seule extrémité du pilus semble interagir avec PilQ. Les images de microscopie électronique ont montré un changement conformationnel de l'hexamère de PilQ lié ou non au pili et le pore formé par l'hexamère est bouché par le pilus (Collins *et al.*, 2005). Les auteurs ont proposé que l'ancrage du pilus à la cellule soit renforcé par à cette interaction. La région N-terminale de PilQ interagit également fortement avec l'ADN simple brin (Assalkhou *et al.*, 2007). Ces résultats sont cohérents avec le fait que les pili de type IV sont impliqués dans la transformation de l'ADN.

Omp85 (ou YaeT) est absolument requis pour l'insertion de la sécrétine PilQ dans la membrane externe contrairement aux sécrétines du T2SS (Voulhoux *et al.*, 2003). Il existe des orthologues de la pilotine GspS dans les T4P : PilF chez *P. aeruginosa* et PilW chez *N. meningitidis*. Ce sont également des lipoprotéines de la membrane externe. Elles promeuvent l'insertion et la multimérisation de la sécrétine PilQ dans la membrane externe. En l'absence de PilF, PilQ n'a formé des multimères dans aucune membrane mais des monomères ont été retrouvés dans la membrane interne (Koo *et al.*, 2008). Au contraire, la délétion de *pilW* dans *N. meningitidis* résulte en l'insertion de monomères de PilQ dans la membrane externe (Carbonnelle *et al.*, 2005). Lorsque PilF perd sa capacité à s'associer à la membrane externe, par une délétion de la partie lipidique, les multimères de PilQ se forment dans les deux membranes (Koo *et al.*, 2008). Même si le rôle général de PilF, PilW et les GspS semble être identique, les deux cas de figure des T4P ne correspondent ni l'un ni l'autre avec l'effet de la mutation de *pulS* : la sécrétine forme dans ce cas des multimères mais dans la membrane interne ou est fortement dégradée. Les pilotines des T4P seraient mal nommées car elles n'auraient pas la fonction importante d'adressage à la membrane externe des pilotines de T4P (qui serait le rôle de YaeT) et pourraient ne pas interagir avec la sécrétine puisque le domaine S de fixation de la pilotine sur GspD n'est pas présent dans la sécrétine PilQ des T4P. Ces protéines pourraient jouer un rôle dans l'assemblage des multimères ou contribuer à leur stabilité.

IV.B.3) Les ATPases du système

Le T4Pa possède deux ou trois protéines contenant les boîtes Walker A et B, His et Asp : PilB, PilT et PilU (dans certains systèmes). Ces trois protéines sont des homologues de

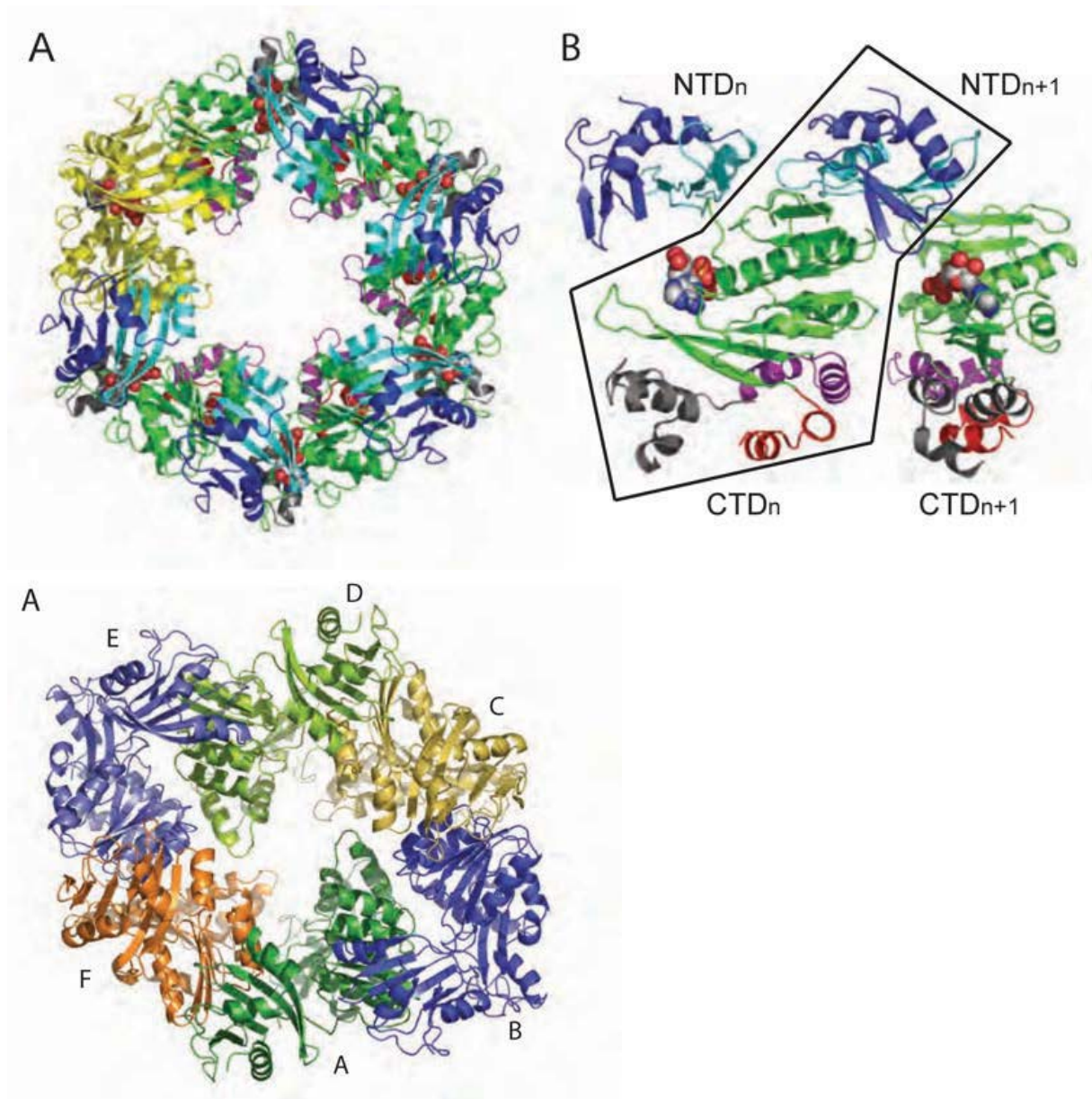
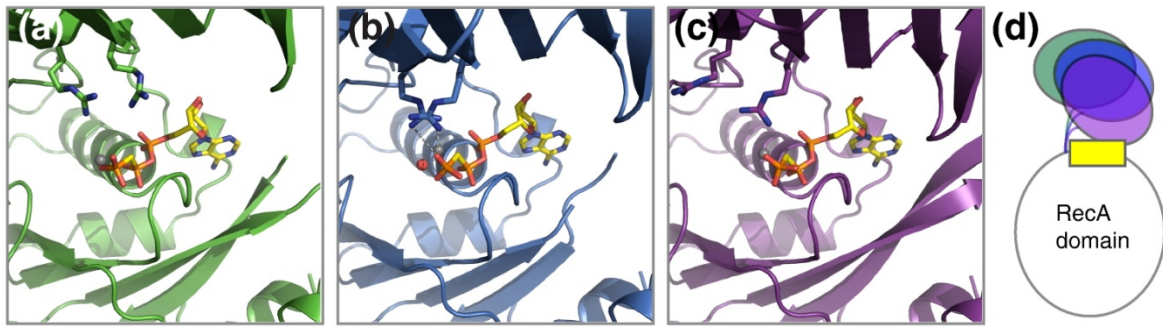


FIGURE 38 : Structures cristallographiques de l'hexamère de PilT. (A) structure symétrique de l'hexamère. (B) Les domaines C-terminaux (CTD) interagissent avec les domaines N-terminaux +1 (NTD). (C) Structure de l'hexamère asymétrique de PilT (Satyshur *et al.*, 2007).

l'ATPase GspE des T2SS. Néanmoins, quelques différences sont d'ores et déjà notables, pointant du doigt une divergence lointaine entre les T4P et T2SS. Une mutation de *pilB* résulte en l'absence de pili à la surface de la bactérie, tandis qu'une mutation de l'un des deux autres gènes *pilT* et *pilU* qui sont en opéron provoque une hyperpiliation et un blocage de la mobilité twitching (Planet *et al.*, 2001). PilB est donc considérée comme l'ATPase d'élongation du pilus et PilT et PilU comme les ATPases de rétractation. Une étude de la localisation de PilB et PilT de *Mixococcus xanthus* par fluorescence a montré le décalage temporel entre l'élongation et rétractation du pilus : PilB se trouve au pôle pilié et PilT au pôle opposé mais PilT vient s'accumuler au pôle pilié au cours du temps, permettant un décalage entre l'assemblage et le désassemblage du pilus (Bulyha *et al.*, 2009).

Dans *P. aeruginosa*, les trois protéines ont une faible activité ATPase (Chiang *et al.*, 2008). Cette activité est interrompue par une mutation ponctuelle dans les boîtes Walker A ou Walker B. Le résidu équivalent dans PilB au résidu K331 de XpsE dans les T2SS est également indispensable pour l'hydrolyse de l'ATP par PilB (Shiue *et al.*, 2006), indiquant une conservation dans la structure de ces protéines homologues. A l'inverse de XcpR (GspE) dans le T2SS, la présence de PilB, PilT ou PilU mutées dans la souche sauvage n'induit pas d'effet dominant négatif. La faible activité des ATPases du T4P *in vitro* est probablement due à l'absence de leurs partenaires. En effet, il a été montré que l'ATPase BfpD des T4Pb de la bactérie entéropathogénique *E. coli* interagit avec les protéines de la membrane interne BfpE (homologue de GspF) et BfpC, ce qui permet son accrochage à la membrane et une augmentation de son activité de 1200 fois (Crowther *et al.*, 2005). Les 6 protomères de BfpD lient une molécule d'ATP mais 3 seulement interagissent avec BfpE, ce qui concorde avec le modèle « three-start » de l'hélice du pilus. De plus, l'ATPase peut interagir avec deux régions de BfpE selon la phosphorylation du nucléotide (Crowther *et al.*, 2005). Dans les T2SS, l'interaction avec GspL semble être plus importante que GspF dans l'activation de l'ATPase (Ball *et al.*, 1999 ; Chen *et al.*, 2005). Cependant, une interaction de GspE avec GspF telle que celle décrite ci-dessus pourrait exister. Les ATPases PilB et PilT n'ont pas le motif tétracystéine de fixation au Zinc présent dans EpsE (T2SS) et BfpD (l'ATPase des T4Pb) (Chiang *et al.*, 2008 ; Robien *et al.*, 2003 ; Crowther *et al.*, 2005). Mais comme le rôle de ce site de fixation au métal dans les ATPases des T2SS et T4Pb n'est pas connu, il n'est pas encore possible de savoir en quoi le fonctionnement des ATPases des T4Pa est différent. Il a été montré que BfpD (l'ATPase des T4Pb) doit avoir formé des multimères pour que

(A)



(B)

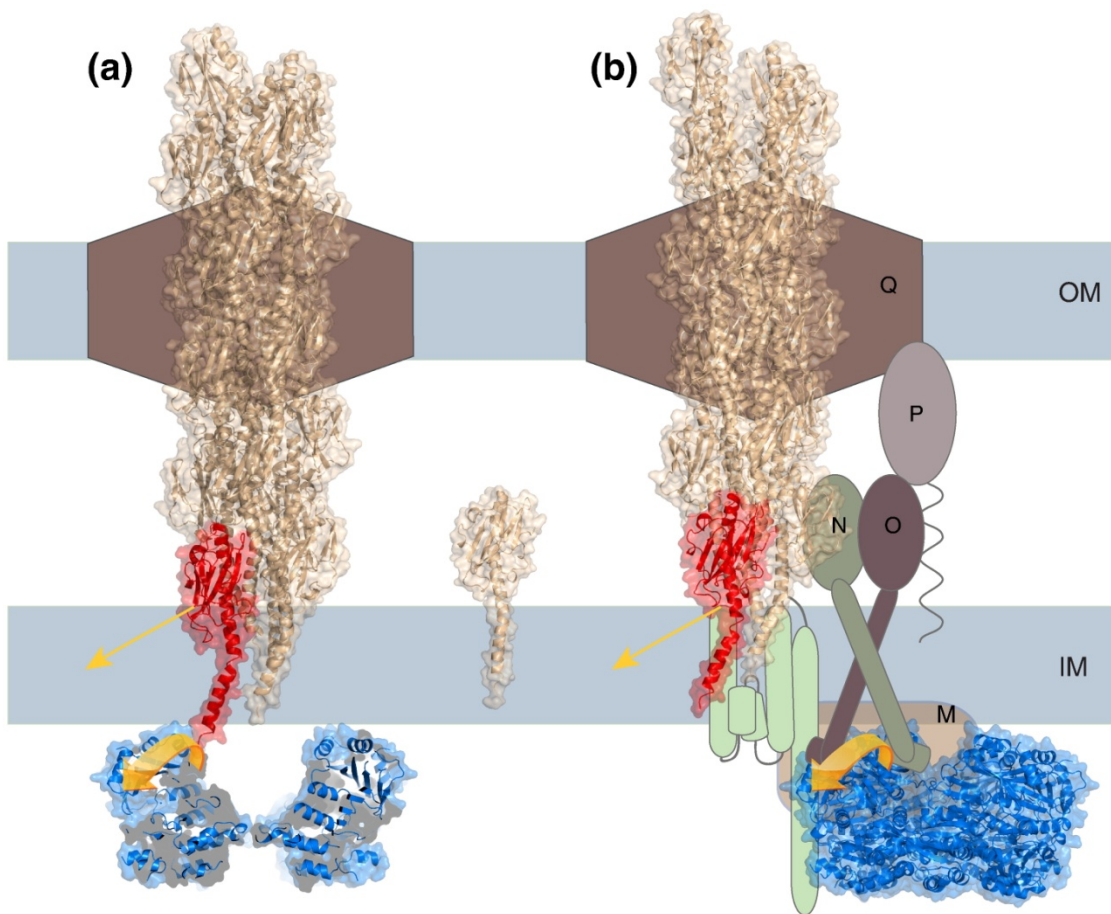


FIGURE 39 : Différents stades de l'ATPase PilT et modèles de fonctionnement. (A) Etats « prêt » (a), « actif » avec le rapprochement des arginines conservées (b), « relâché » (c) de PilT. (d) représentation schématique des changements conformationnels subit par PilT. (B) Modèles de fonctionnement de PilT : désassemblage direct des pilines par PilT (a) ou désassemblage par l'intermédiaire du complexe de membrane interne (b) (Misić *et al.*, 2010).

l'hydrolyse de l'ATP ait lieu (Crowther *et al.*, 2005). Ceci concorde avec le fonctionnement de XpsE, l'ATPase du T2SS de *X. campestris* (Shiue *et al.*, 2006).

PilT forme un anneau hexamérique et arbore une activité ATPase (bien que faible) *in vitro* (Forest *et al.*, 2004). PilT est composé de deux domaines N (N-terminal) et C (C-terminal). Le site de fixation de l'ATP se trouve entre ces deux domaines (Satyshur *et al.*, 2007 ; Misic *et al.*, 2010). La partie C-terminale de PilT composée de 70 derniers résidus contient une séquence conservée AIRNLIRE qui est nécessaire à la rétractation du pilus mais pas à l'activité ATPase (Aukema *et al.*, 2005). La structure de l'hexamère symétrique de PilT d'*Aquifex aeolicus* a révélé une interaction entre les domaines C et N+1 (Figure 38, A et B). Le site de fixation de l'ATP est accessible. Une deuxième structure a été trouvée dans les mailles de cristaux : un hexamère asymétrique dans lequel le site de fixation est également accessible présente une nouvelle position pour certains résidus arginine conservés et ceci entraîne la création d'un site enzymatique actif (Figure 38, C) (Satyshur *et al.*, 2007). Très récemment, la structure de PilT de *P. aeruginosa* a été déterminée à une résolution plus forte et les auteurs ont pu décrire trois types de conformation des sous-unités de l'hexamère PilT (Misic *et al.*, 2010). PilT serait dans un état « prêt », « actif » et « relâché » (Figure 39.A). Le premier état est le protomère non lié au nucléotide. La fixation de l'ATP entraîne le rapprochement des deux sous-unités N et C de PilT et la création du site actif par les arginines conservées. Le troisième état est le relâchement : les résidus arginine sont éloignés du nucléotide. La question est de savoir comment les changements conformationnels de PilT peuvent induire la rétraction du pilus.

Deux modèles ont été proposés (Figure 39.B). Dans le premier, l'ATPase de rétractation PilT tirerait vers elle la queue de la piline du pilus encore dans la membrane interne par un mécanisme d'interactions entre les sous-domaines de l'ATPase qui pourrait ressembler à une « roue à aubes » (Figure 39.B.a). Dans le deuxième modèle, l'ATPase de rétractation PilT interagirait avec les protéines de la membrane interne, supposées former une plateforme, ce qui induirait des changements conformationnels dans ces dernières et sur la piline du pilus encore dans la membrane interne. La piline serait alors désassemblée du pilus (Figure 39.B.b). Aucune interaction n'ayant été démontrée à ce jour entre les pilines et l'ATPase et vu la conservation des autres composants de la membrane interne, le deuxième modèle (Figure 39.B.b), dans lequel ces autres composants servent d'intermédiaires, semble plus probable (Misic *et al.*, 2010).

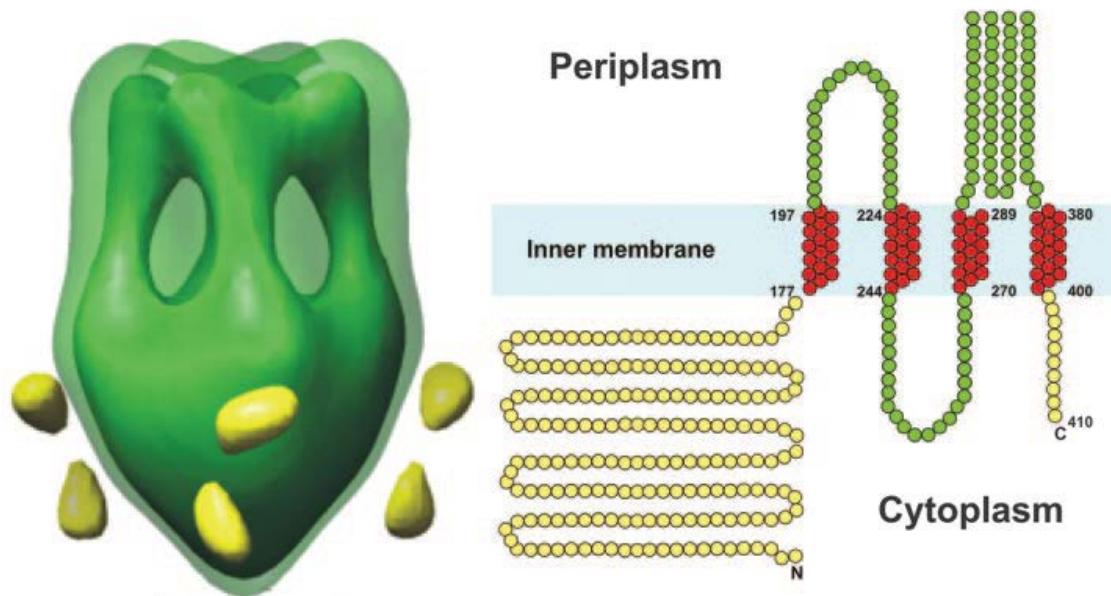


FIGURE 40 : Modèle du tétramère de PilG de *N. gonorrhoeae* par microscopie électronique et sa topologie (Collins *et al.*, 2007).

Le rôle de PilU, la deuxième ATPase de rétraction, est mal compris. La mutation du gène *pilU* provoque deux phénomènes contradictoires : un défaut de mobilité twitching généralement associé à la perte de l'élongation ou de la rétraction du pilus et une sensibilité accrue aux bactériophages généralement associée à un pilus fonctionnel (Whitchurch and Mattick, 1994). Malgré la forte similarité de séquence entre PilU et PilT (75% sur 240 résidus), une protéine chimère des deux protéines ne peut compléter ni le mutant *pilT* ni le mutant *pilU* (Chiang *et al.*, 2005). Les études parallèles des ATPases des T4P et des T2SS a permis de créer des modèles de fonctionnement, comme l'application du modèle hexamérique visualisé pour PilT à GspE. GspE est beaucoup plus proche phylogénétiquement de PilB que de PilT et PilU. Ce point suggère que GspE aurait plutôt un rôle d'élongation du pseudopilus au sein des T2SS. Même si le pseudopilus des T2SS ne semble pas dépasser de la membrane physiologiquement, le pseudopilus devra être rétracté pour un nouveau cycle de sécrétion. Une question en suspens est de savoir si GspE peut également avoir ce rôle.

IV.B.4) Les protéines de la membrane interne des T4P

La protéine PilC de *P. aeruginosa* (ou PilG de *N. gonorrhoeae*) est une protéine polytopique de la membrane interne dont les homologues sont XcpS de *P. aeruginosa*, OutF d'*E. chrysanthemi*, PulF de *K. oxytoca* et ExeF d'*A. hydrophila*, c'est-à-dire GspF des T2SS (Alm and Mattick, 1997). PilG est composé d'une large région cytoplasmique et d'une courte région périplasmique, séparées par 4 TMS (Figure 40). Elle possède donc un TMS et une région périplasmique de plus que GspF. Des expériences de gel natif et microscopie électronique ont permis de détecter des tétramères de PilG (Collins *et al.*, 2007). Les tétramères forment une structure asymétrique, resserrée dans le périplasme et la membrane interne et élargie dans le cytoplasme (Figure 40). Les régions cytoplasmique et périplasmique pourraient dépasser de la membrane de 50 et 30 Å respectivement (Collins *et al.*, 2007) et PilG/PilC est donc un candidat certain pour des interactions avec les protéines bitopiques de la membrane interne PilO, PilN ou PilP dans le périplasme. Etant donné que PilG/PilC semble avoir une région périplasmique plus large que celle de GspF, cette interaction potentielle avec un autre composant dans le périplasme pourrait ne pas avoir lieu dans les T2SS.

PilP est une lipoprotéine de la membrane interne (Martin *et al.*, 1995). La résolution de la structure d'une partie de la région périplasmique de cette protéine par RMN a mis à jour un repliement de brins β , dans lequel un site hydrophobe pour une interaction potentielle avec une

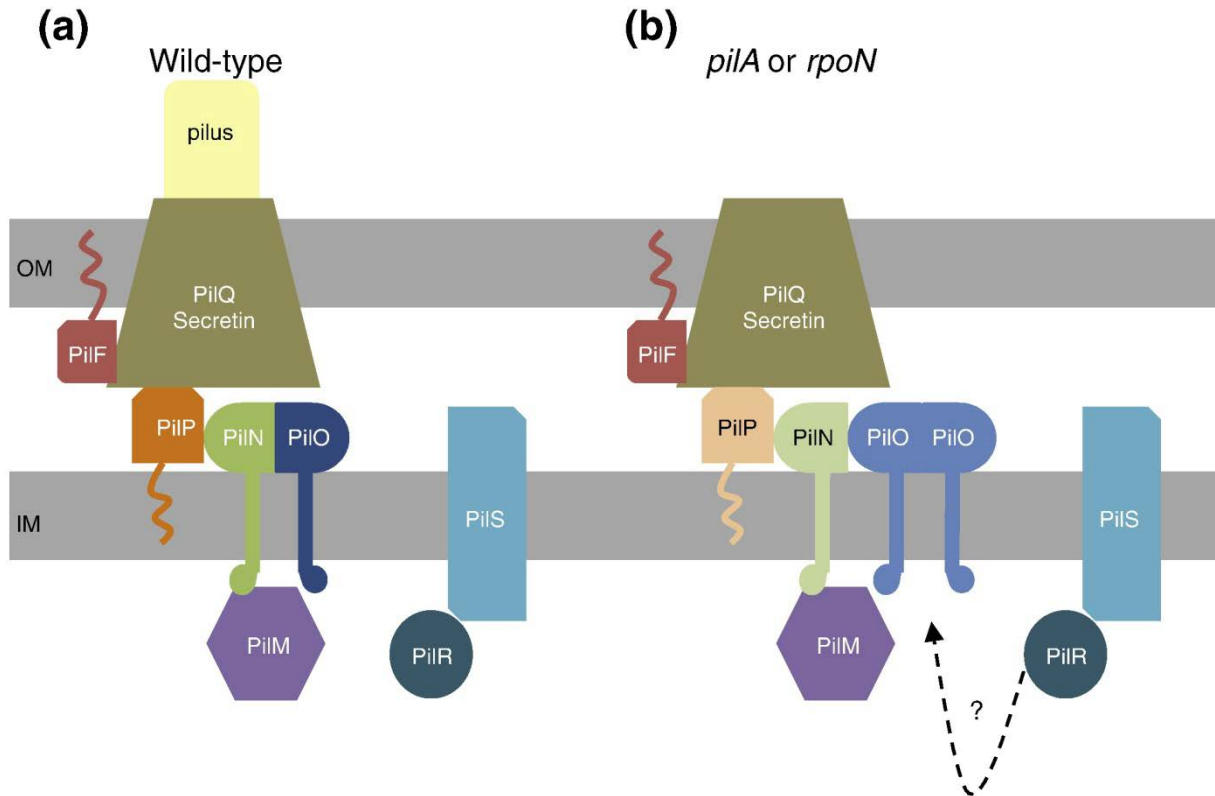


FIGURE 41 : Modèle de la machinerie d'assemblage du pilus chez *P. aeruginosa*. (a) dans la souche sauvage, PilR/S régule positivement l'expression de PilA et n'a pas d'effet sur le complexe de la membrane interne. (b) quand la piline n'est plus exprimée, la stabilité du complexe de la membrane interne est affectée, peut-être par un changement de l'équilibre entre les états dimériques de PilO. Les couleurs plus claires représentent une diminution de la quantité de ces protéines (Ayers *et al.*, 2009).

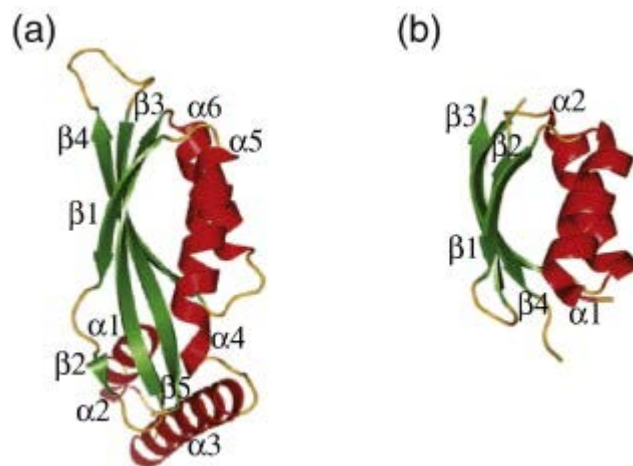


FIGURE 42 : PilO et EspM : homologues structuraux. (a) Structure cristallographique d'un monomère d'une partie de la région périplasmique de PilO (une partie du domaine coil-coiled et le domaine de type ferrédoxine). (b) Structure cristallographique d'un monomère du domaine de type ferrédoxine d'EpsM (Sampaleanu *et al.*, 2009 et Abendroth *et al.*, 2004).

petite protéine est présent (Golovanov *et al.*, 2006). Chez *N. meningitidis*, le nombre de multimères de PilQ est fortement réduit dans un mutant *pilP* (Drake *et al.*, 1997) mais PilP n'est pas impliqué dans la stabilité de la sécrétine (Balasingham *et al.*, 2007). Les régions N- et C-terminales de PilP interagissent directement avec la région N-terminale de la sécrétine (résidus 1 à 478) et plus fortement avec la région comprise entre les résidus 217 à 478 (Balasingham *et al.*, 2007). PilP n'a aucun homologue connu (Alm and Mattick, 1997). L'hypothèse selon laquelle PilP serait une pilotine a été exclue par les travaux décrits ci-dessus. Son accrochage à la membrane interne et son interaction avec la sécrétine peut faire penser aux fonctions de GspC, mais d'autres informations sur PilP sont nécessaires pour pouvoir établir un parallèle.

Les composants PilM/N/O/P présentent de fortes similitudes avec certains composants de la plateforme de la membrane interne des T2SS. Avec *pilQ*, le gène codant pour la sécrétine, les gènes *pilMNOP* sont organisés en opéron. PilO et PilN sont prédites comme des protéines bitopiques. La région périplasmique de PilO présente une similarité de structure avec la région périplasmique d'EpsM (GspM de *V. cholerae*) (Figure 42). La région cytoplasmique d'EpsL présente le même motif de type actine que PilM, tandis que PilN présente une similarité structurale avec la région périplasmique d'EpsL. Il a récemment été suggéré que PilM/N/O/P formeraient une plateforme indispensable à l'assemblage des pili (Ayers *et al.*, 2009). En effet, une mutation dans n'importe lequel de ces gènes résulte en l'absence totale de pili. Dans les gradients de sucrose, PilN et PilO ont été trouvées dans la fraction de la membrane interne, de même que PilM et PilP, respectivement prédites comme protéine cytoplasmique de type actine et lipoprotéine de la membrane interne. L'absence de PilM a un effet négatif sur la quantité des protéines PilN/O/P alors qu'aucune de ces protéines n'a le même effet sur PilM (Ayers *et al.*, 2009). PilN et PilO sont très fortement dépendantes l'une de l'autre, comme GspL et GspM, et la stabilité de PilP est affectée en l'absence de PilN ou PilO. Il semble que la stabilisation de PilP nécessite une présence simultanée de PilN et PilO. Bien que cela reste à démontrer, ces résultats suggèrent que PilP pourrait interagir avec les deux protéines en même temps, favorisant l'hétérodimère PilO/PilN à cette étape de l'assemblage des pili. L'ensemble de ces données suggèrent donc la formation d'un complexe PilM/N/O/P dans la membrane interne de *P. aeruginosa*. D'autre part, la stœchiométrie de chaque composant serait cruciale pour la formation de cette plateforme : ce n'est qu'en co-exprimant ces gènes que la mobilité twitching est restaurée.

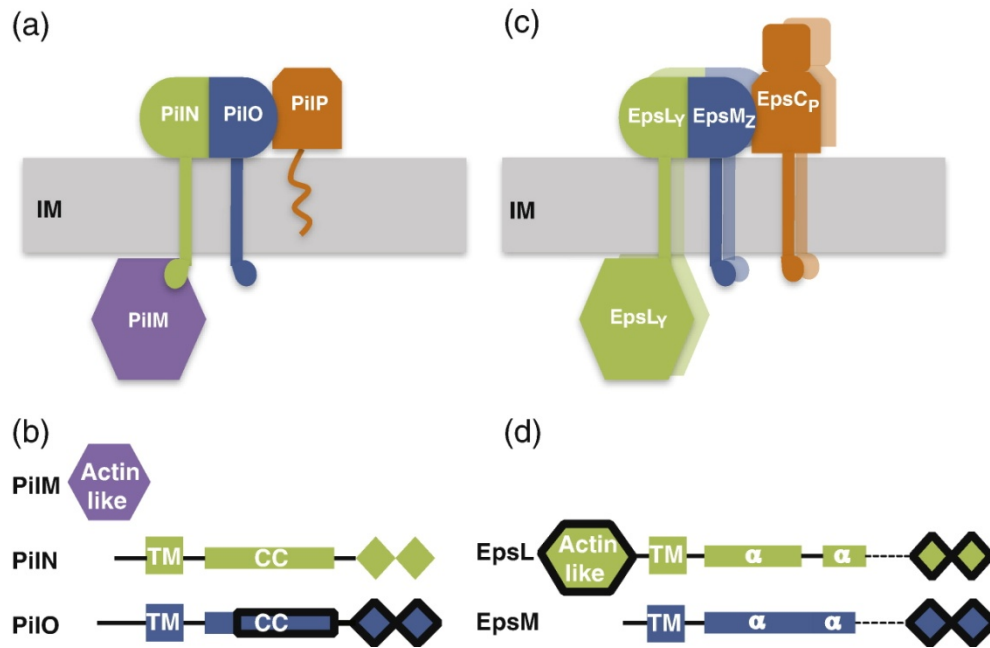


FIGURE 43 : Comparaison des complexes de la membrane interne des pili de type IV (a) et des systèmes de sécrétion de type II (c), et représentation schématique de PilM, PilN, PilO et leurs homologues structuraux EpsL et EpsM. (c) les dimères dans le T2SS sont représentés par les protéines de couleur plus claire à l'arrière. (b) et (d) les domaines dont les structures sont disponibles sont surlignés en noir. (Sampaleanu *et al.*, 2009).

L'absence de chacun de ces quatre gènes *pilM*, *pilN*, *pilO* ou *pilP* provoque une diminution de la quantité de sécrétine PilQ monomérique et des multimères de PilQ. L'absence de la protéine cytoplasmique PilM a l'effet négatif le plus fort sur PilQ. Ceci suggère qu'un lien entre les composants cytoplasmique et de la membrane externe ne doit pas être interrompu (Ayers *et al.*, 2009). Un modèle a été proposé à partir de ces données (Figure 41). Ainsi, une plateforme dans la membrane interne formée par plusieurs composants du T4P serait indispensable à l'assemblage du pilus, tout comme la plateforme de la membrane interne des T2SS est indispensable au processus de sécrétion des diverses exoprotéines.

Une autre étude récente a détaillé davantage les similitudes structurales entre les protéines bitopiques PilN et PilO, et GspL et GspM (Sampaleanu *et al.*, 2009). PilN et PilO seraient composées d'un court fragment cytoplasmique, d'un TMS (en hélice α), suivi d'une région d'une quarantaine d'acides aminés qui formerait un domaine coiled-coil. Une boucle contenant une proline conservée connecterait ce domaine coiled-coil à un domaine replié contenant une répétition du motif α - β - β , donc de type ferrédoxine (Sampaleanu *et al.*, 2009). D'après ces données, PilN et PilO semblent être les homologues structuraux de GspL Δ cyt et GspM. En effet, les régions périplasmiques de PilN et PilO (PilN_{péri} et PilO_{péri}) et celles de GspL et GspM présentent le même domaine structural (domaine de type ferrédoxine) à l'extrémité C-terminale (Figure 43.b). Il faut noter que d'après la structure cristallographique de PilO, l'hélice α 3 du domaine de type ferrédoxine est précédée d'une très courte hélice α (α 4) et le brin β 3 est précédé d'un très court brin β (β 2). Ces deux structures secondaires courtes, présentes dans PilO et absentes dans EpsM ne semblent pas apporter de modifications majeures au repliement du domaine de type ferrédoxine puisque EpsM_{péri} est le plus proche homologue structural de PilO_{péri}.

Une différence structurale majeure entre PilN et GspL est l'absence d'un large domaine cytoplasmique dans PilN qui est présent dans GspL. Les auteurs ont émis l'hypothèse que la protéine cytoplasmique PilM possédant un domaine de type actine pourrait être l'équivalent fonctionnel de la région cytoplasmique de GspL (Figure 43, b et d). Comme nous l'avons vu dans le chapitre 3, la région cytoplasmique GspL possède également un domaine de type actine. De plus, PilM a été retrouvée dans la fraction de la membrane interne, suggérant qu'une interaction qui l'associerait à la membrane interne. Le fait que dans le T4P les domaines homologues à ceux de GspL soient présents même si séparés en deux protéines montrent l'importance physiologique de ces deux domaines. La séquence de la courte région

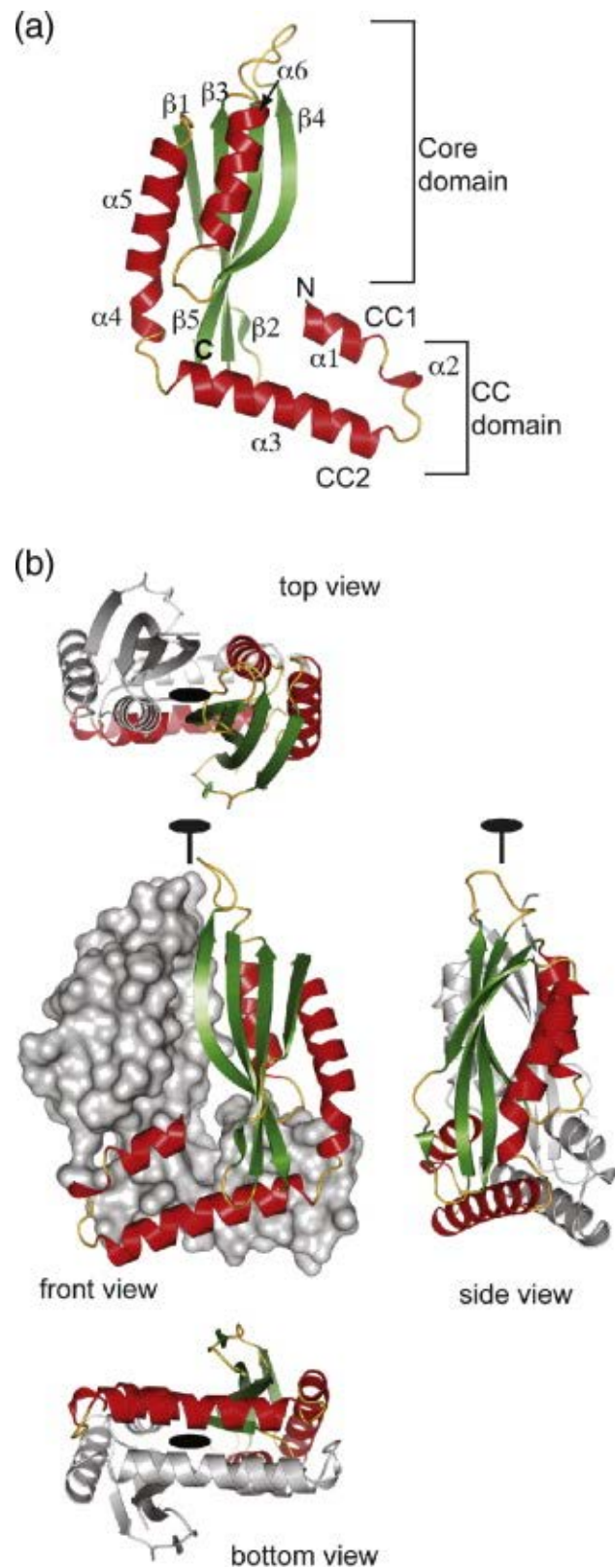


FIGURE 44 : Structure de la région périplasmique de PilO (Δ68). (a) Monomère de la région périplasmique de PilO. L'hélice α1 est probablement mal positionnée en raison de la délétion des 68 premiers résidus. (b) Différentes vues du dimère de PilO (Sampaleanu *et al.*, 2009).

cytoplasmique de PilN est très conservée parmi ses homologues et contient un motif consensus INLLPW. Par contre, sa région périplasmique semble beaucoup moins conservée, notamment l'extrémité C-terminale. PilO au contraire semble plus conservée au niveau de la région périplasmique. Les deux protéines ne partagent que 16% d'identité de séquence. Pourtant, PilN et PilO auraient les mêmes structures secondaires d'après les prédictions informatiques. Une interaction directe entre PilN_{péri} et PilO_{péri} a été montrée par des expériences de filtration sur gel et chromatographie d'affinité : les 2 dérivés ont été co-élus en quantité équimolaire. En l'absence de PilO_{péri}, PilN_{péri} forment des agrégats dans la fraction insoluble. Les auteurs émettent donc l'hypothèse que PilO doive être présent dès l'expression de PilN pour que celle-ci soit stable et correctement repliée.

Exprimée sans PilN_{péri}, PilO_{péri} forme un homodimère *in vitro*. La structure tridimensionnelle de l'homodimère de PilO_{péri} a été résolue par cristallographie. La surface d'interaction représente 2082 Å². Les deux domaines de PilO (coiled-coil et domaine de type ferrédoxine) sont impliqués dans la formation du dimère (Figure 44). Un tiers des résidus seraient engagés dans les interactions des domaines ferrédoxine/ ferrédoxine, coiled-coil/ coiled-coil et coiled-coil/ ferrédoxine. L'interface créée par les domaines de type ferrédoxine met en jeu l'hélice α_6 et le brin β_4 (Figure 46.a). Les hélices α des domaines coiled-coil comportent des résidus de charge contraire dans PilN et PilO, ce qui favoriserait la formation d'un hétérodimère. Ces résidus chargés ne sont pas conservés parmi les homologues de PilN et PilO. Les auteurs suggèrent que la position de la première hélice du domaine coiled-coil est probablement faussée en raison de la délétion de 68 résidus N-terminaux, prédits comme faisant partie de cette hélice (Sampaleanu *et al.*, 2009).

A partir de la structure de PilO_{péri}, les auteurs ont proposé des modèles de repliement de la région périplasmique de PilN et des dimères formés par ces protéines (Figure 45). Dans ces modèles, les TMS n'auraient pas de rôle dans les interactions car i) trop éloignés dans le modèle, ii) les régions périplasmiques sont suffisantes pour les interactions, iii) aucun motif résidu aromatique-X-X-aromatique n'a été retrouvé dans la séquence du TMS de PilO. Ceci irait à l'encontre de ce qui a été observé avec EpsM, le plus proche homologue de PilO dont le TMS dimérise *in vitro* probablement grâce à la présence d'un motif W-X-X-W (Sal-Man *et al.*, 2007). Certaines études ont suggéré que les TMS de GspM et GspL auraient un rôle dans leur stabilisation mutuelle et que le TMS de GspM peut homodimériser (Robert *et al.*, 2002 ; Sandkvist *et al.*, 2000 ; Sal-Man *et al.*, 2007). L'implication du TMS des composants du T2SS

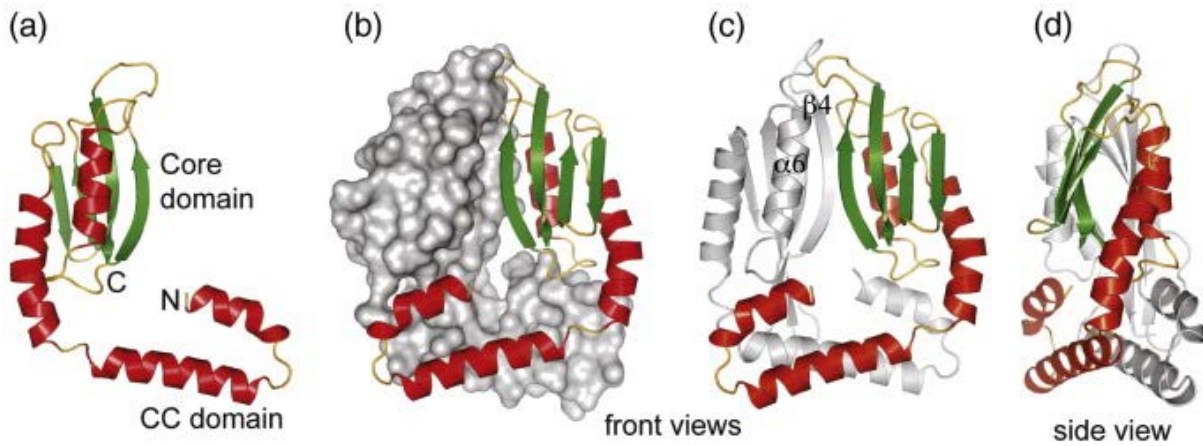


FIGURE 45 : Modèle de repliement de la région périplasmique de PilN grâce à son homologie de structure avec PilO. (a) monomère de PilN déléetée des 56 résidus N-terminaux ; (b) et (c) hétérodimère de PilO et PilN avec PilO en gris; (d) hétérodimère de PilN et PilO vu de côté avec PilO en gris (Sampaleanu *et al.*, 2009).

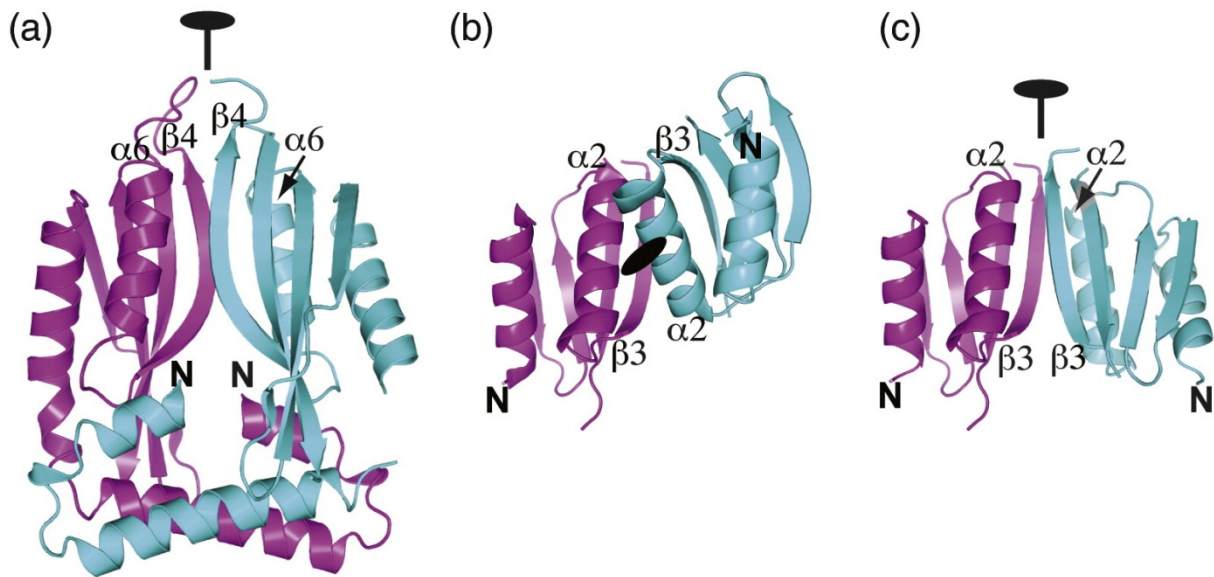


FIGURE 46 : Structures des dimères de PilO et EpsM. (a) Dimère de la région périplasmique de PilO décrit dans Sampaleanu *et al.*, 2009. (b) Dimère du domaine de type ferrédoxine décrit dans Abendroth *et al.*, 2004. (c) Dimère d'EpsM réorienté d'après la structure de PilO.

au contraire de ceux du T4P pourrait rendre différente la manière d'interagir de ces quatre homologues structuraux. D'autre part, la structure du dimère de la région périplasmique d'EpsM n'a pas la même orientation que celle de PilO. En réorientant le dimère d'EpsM, l'interface d'interaction est augmentée de 60% (733 Å contre 458 Å) et l'hélice $\alpha 2$ est toujours impliquée dans l'interaction mais avec le feuillet $\beta 3$ (Figure 46) (Sampaleanu *et al.*, 2009).

Un récapitulatif des complexes de la membrane interne dans les T4P et les T2SS est présenté dans la figure 43.a. Dans les T2SS, les trois composants GspC, GspL et GspM peuvent former des homodimères. Dans les T4P, PilO peut également former des homodimères mais aucune étude n'a encore décrit une homodimérisation des autres composants de la plateforme de la membrane interne PilM, PilN et PilP. Les prochaines études pourront éventuellement apporter d'autres points de comparaison avec les T2SS.

Objectifs de l'étude

L'étude du fonctionnement du système de sécrétion de type II est nécessaire pour comprendre les bactéries pathogènes. En effet, il est impliqué dans la virulence de nombreux pathogènes de l'homme, d'animaux ou de plantes et permet la sécrétion de toxines, comme la toxine cholérique de *Vibrio cholerae*, ou d'enzymes lytiques, comme les pectinases d'*Erwinia chrysanthemi*. Avec les résistances grandissantes des populations bactériennes aux antibiotiques, la lutte contre ces pathogènes dans le futur pourra se révéler difficile et l'arrêt de la sécrétion bactérienne pourrait être une alternative.

Bien que les composants du système de type II aient fait l'objet de multiples études, le fonctionnement global de la machinerie et la fonction de chaque composant restent très obscurs. Dans cette étude, nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement à trois protéines bitopiques de la membrane interne : OutC, OutL et OutM. Chacune de ces protéines est indispensable au processus de sécrétion. OutC interagit avec la sécrétine OutD qui forme le pore de la membrane externe et serait, avec OutD, responsable de la spécificité du système. OutL permet l'ancrage de l'ATPase OutE à la membrane interne et son activation. Certaines interactions décelées entre les protéines de la membrane interne OutF, OutL, OutM et OutC ont suggéré l'existence d'une plateforme de la membrane interne.

L'objectif de l'étude a été dans un premier temps de mettre en évidence et caractériser les interactions entre OutC, OutL et OutM par une technique *in vivo* : le double-hybride bactérien. Nous avons mis en évidence des interactions entre protéines entières. Ceci est l'objet du chapitre I. Les interactions entre les régions périplasmiques de ces protéines ont été recherchées et les mécanismes moléculaires qui les régissent ont ensuite été étudiés, afin de définir si l'ensemble de ces interactions peuvent être compatibles ou si elles sont en compétition. Les résultats sont présentés dans le chapitre II. Nous avons ensuite, dans le chapitre III, continué la dissection des interactions en recherchant les interactions qui pouvaient intervenir entre les TMS de ces protéines. Une précédente étude a montré une interaction entre la sécrétine OutD et OutC. Pour mieux analyser les multiples interactions au sein du T2SS, des expériences de triple-hybride ont été réalisées en coexprimant différentes combinaisons des régions solubles de trois composants. Nos résultats, présentés dans le chapitre IV, suggèrent qu'OutL empêche l'interaction entre OutC et OutD. Enfin, dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire du Pr. Pickersgill de la « School of Biological Sciences, Queen Mary University of London », nous essayons de déterminer la structure tridimensionnelle d'un complexe entre les régions périplasmiques d'OutL et d'OutM. Les résultats préliminaires sont présentés dans le chapitre V.

Matériels et Méthodes

A) Plasmides, souches et conditions de culture

Les plasmides utilisés sont décrits dans les tableaux I.1, II.1, III.1, IV.1 et V.1 situés dans les chapitres correspondants. La souche utilisée pour tous les clonages est *E. coli* NM522 ($\Delta(lac-proAB)$, *thi*, *hds5*, *supE*, [*F'**proAB*⁺, *lacI*, *lacZ* Δ M15]). Les surproductions de protéines ont été faites dans la souche d'*E. coli* BL21 (DE3) (*F*⁻ *dcm*⁻ *ompT* *r_B*⁻ *mB*⁻ *lon*⁻ λ (DE3)). Les tests de fonctionnalité *in vivo* ont été faits sur la souche *E. chrysanthemi* A4229 (*lacZ*, *protéase*⁻, *pectinases*⁺). Sauf mention contraire, les cultures ont été faites à 30°C en milieu LB (milieu riche Luria-Bertani) (Miller, 1972). La pression de sélection est maintenue si besoin par ajout d'ampicilline 100 µg/mL, de kanamycine 100 µg/mL, de chloramphénicol 50 µg/mL ou encore de la tétracycline 50 µg/mL.

B) Double-hybride bactérien

Ce système, développé initialement par Karimova et collaborateurs en 1998, est basé sur la reconstitution artificielle de l'activité de l'adénylate cyclase Cya grâce à une interaction de deux protéines d'intérêt. Celle-ci se fait *in vivo* dans la souche *cya*⁻ d'*E. coli* DHP1 [*F*⁻ *cya* *glnV44* (AS) *recA1* *endA1* *gyrA96* (NalR) *thi1* *hsdR17* *spoT1* *rfbD1*]. Le domaine catalytique de l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis* est composé de deux fragments appelés T18 et T25 qui, séparés, ne donnent aucune activité. Quand ces fragments sont fusionnés à des protéines interagissant entre elles, la dimérisation de ces protéines hybrides provoque la reconstitution de l'adénylate cyclase et ainsi la synthèse d'AMPc. Celui-ci se lie à l'activateur CAP et ce complexe augmente significativement l'expression de plusieurs gènes dont ceux des opérons *lac*, *mal* et *ara* impliqués dans le catabolisme du lactose, du maltose et de l'arabinose (Figure 47).

Les vecteurs utilisés sont :

- ❖ pUT18C (Karimova *et al.*, 1998) codant pour le fragment T18 de Cya et portant une résistance à l'ampicilline. Un polylinker de 9 sites uniques de restriction est présent en

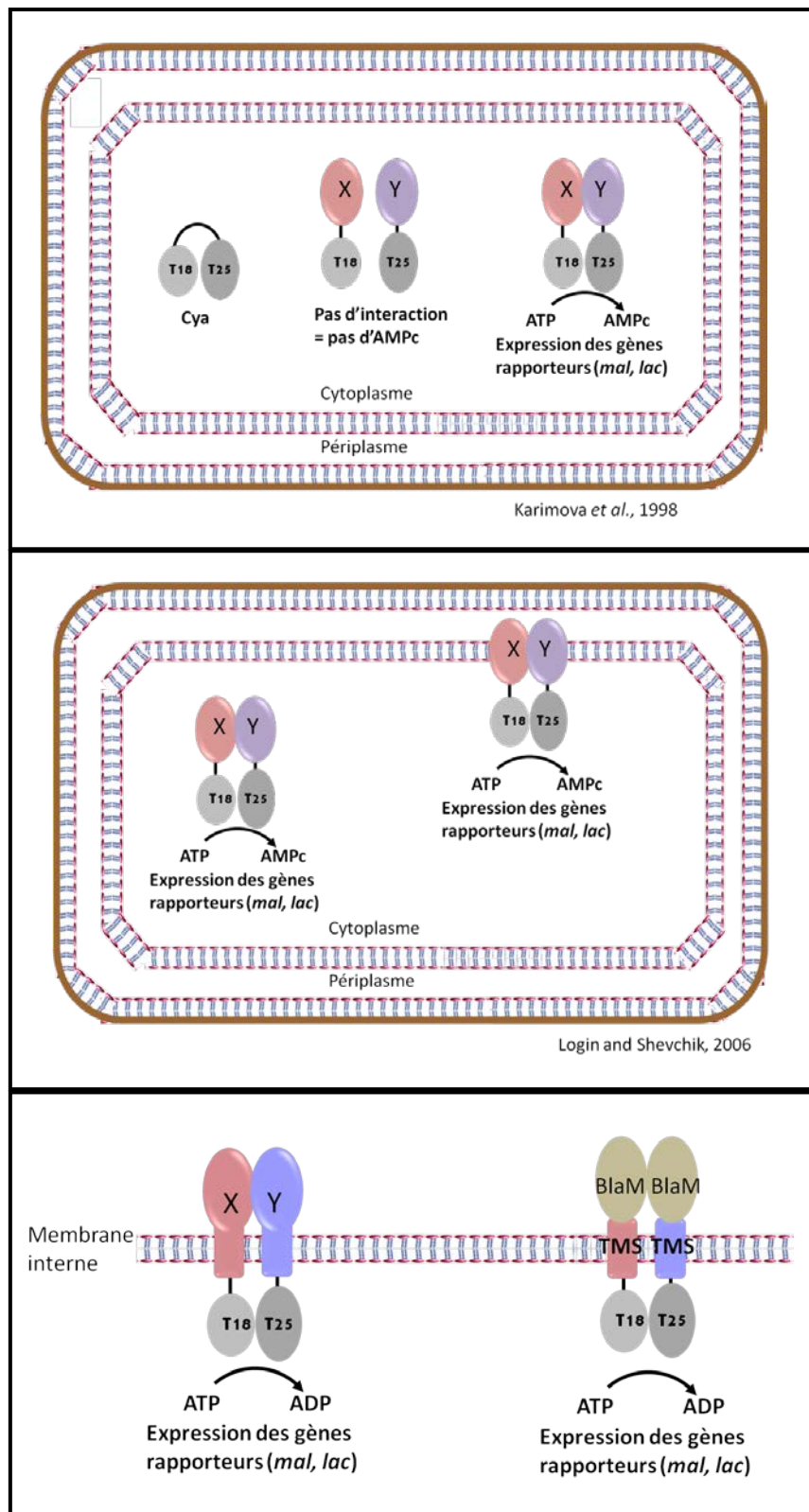


Figure 47 : Principe du double-hybride bactérien. (A) Technique du double-hybride développé par Karimova (Karimova *et al.*, 1998). (B) Utilisation du double-hybride bactérien pour les protéines membranaires. (C) Adaptation de la technique pour l'étude des segments transmembranaires.

3' de *T18 cya* pour permettre une fusion traductionnelle avec l'extrémité N-terminale de la protéine d'intérêt.

- ❖ pUT18C Cm^R (ce travail), qui correspond à pUT18C mais portant une résistance au chloramphénicol (*cat*). Ce gène de résistance a été cloné à la place du gène de résistance à l'ampicilline, *blaM*.
- ❖ pKT25 (Karimova *et al.*, 1998) codant pour le fragment T25 de *cya* et portant une résistance à la kanamycine. Il possède également un polylinker en 3' de *T25 cya*, permettant une fusion avec l'extrémité N-terminale de la protéine d'intérêt.

En cas d'interaction entre les deux protéines d'intérêt, la souche *E. coli cya* DHP1 va ainsi acquérir un phénotype Cya⁺ et va dégrader le maltose, le lactose et l'arabinose.

La souche d'*E. coli* DHP1 *cya*⁻ est co-transformée par les plasmides pUT18C ou pUT18C Cm^R et pKT25 portant les fusions d'intérêt, étalée sur milieu Mac Conkey maltose (1%) supplémenté avec Amp, Kan ou Cm, Kan et incubée à 30°C 60 h environ. La fermentation du maltose provoque l'acidification du milieu contenant un indicateur, le rouge neutre, et les colonies dégradant le maltose se colorent en rouge. Les colonies Cya⁻ apparaissent blanches.

A partir des boîtes Mac Conkey, 2 à 4 cultures ont été mises à pousser pendant 21 heures à 30°C de 5 mL de LB supplémenté par les antibiotiques adéquats et de l'IPTG 1mM. Ces cultures ont servi aux dosages de l'activité β -galactosidase.

Après 21 heures, la densité cellulaire (DO₆₀₀) de chaque culture est mesurée. Les cellules de 0,8 mL de ces cultures ont été toluguénisées, vortexées, incubées sur glace 15 minutes, vortexées et incubées sur glace de nouveau. Ensuite, 50 μ L de ces cellules ont été additionnées à 0,9 mL de tampon Z (Tampon phosphate Na 0,1 M pH 7, KCl 0,01 M, MgSO₄ 0,001 M, 2-mercaptoéthanol 0,05M) dans un tube à hémolyse. Les tubes sont pré-incubés en bain-marie à 37°C puis la réaction est initiée par ajout de 100 μ L d'ONPG. L'ONPG est un substrat synthétique dont l'hydrolyse génère du galactose et de l'orthonitrophénol (ONP) coloré en jaune. Lorsque l'échantillon vire au jaune-clair, la réaction est stoppée à un temps *t* par ajout de 0,5 mL de Na₂CO₃ 1 M. L'ONP présente un maximum d'absorption à 420 nm et la quantité d'ONP libérée peut être mesurée au spectrophotomètre. L'activité U (unité arbitraire) de la β -galactosidase est calculée d'après la formule : $U = (DO_{420} / t \times V \times DO_{600}) \times 1000$, avec l'absorbance de l'orthonitrophénol (DO₄₂₀), le temps de réaction *t* en minutes, le volume de lysat utilisé *V* en mL et l'absorbance de la culture (DO₆₀₀).

Le dosage est répété pour chaque culture (2 à 4). Plusieurs séries de transformation ont été faite pour toutes les combinaisons de double-hybride.

C) Double-hybride bactérien adapté à l'étude des TMS

La technique du double-hybride bactérien, initialement conçue pour l'analyse des régions solubles des protéines, a été par la suite utilisée pour détecter les interactions entre les protéines membranaires ayant un segment transmembranaire (TMS) (Figure 47.B). C'est par exemple le cas de l'étude d'OutC menée au laboratoire par Login et Shevchik (2006). Mais cette méthode de double-hybride n'est pas adaptée à l'étude des interactions entre TMS. En effet, s'il existe une interaction entre les régions périplasmiques, celle des TMS sera masquée. Quant à la délétion des régions périplasmiques, cela pose un problème pour détecter les protéines par immunoblot et sans doute pour la bonne insertion du segment dans la membrane.

Afin de pouvoir analyser les interactions intervenant entre les TMS seuls, nous avons adapté la technique du double-hybride bactérien. Dans cette adaptation, les sous-domaines T18 et T25 de l'adénylate cyclase sont fusionnés à l'extrémité N-terminale du TMS d'intérêt et vont donc rester dans le cytoplasme. En C-terminal de ce TMS, la protéine mature (sans peptide signal) périplasmique BlaM est fusionnée (Figure 47.C). La région périplasmique de la protéine d'intérêt est donc remplacée par BlaM. La protéine chimère est ainsi composée de 3 fragments. Le gène *blaM* a été extrait à partir du plasmide pYZ5 (Broome-Smith *et al.*, 1990). Lorsqu'elle est localisée correctement, dans le périplasme, la protéine BlaM est une β -lactamase qui permet à la cellule d'acquérir une résistance à l'ampicilline. Une insertion correcte de la triple fusion dans la membrane interne (N-in, C-out) conduit donc à la résistance à l'ampicilline.

Pour pouvoir visualiser l'effet de BlaM, les plasmides utilisés dans cette technique adaptée sont pUT18C Cm^R et pKT25 Kan^R.

D) Création du mutant d'*outM* d'*E. chrysanthemi*

Pour créer un mutant $\Delta outM$ dans *E. chrysanthemi*, la région contenant les gènes OutL et OutM a tout d'abord été amplifiée par PCR avec les oligonucléotides OutLHpa et OuMRI (Figure 51) et insérée dans le plasmide pGEM-T.

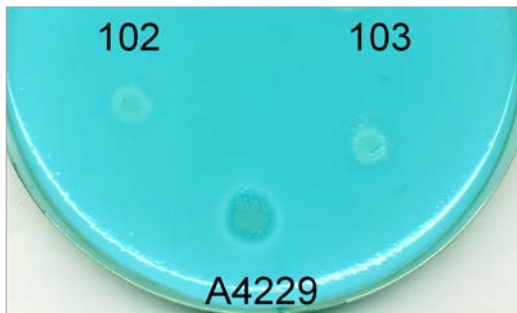


FIGURE 48 : Test sur boîte PGA des colonies 102 et 103, présentant une résistance au chloramphénicol. A4229 est la souche parentale d'*E. chrysanthemi* utilisée pour recombinaison le gène *outM::cat* muté. Les halôts de dégradation du PGA ont été révélés avec de l'acétate de cuivre.

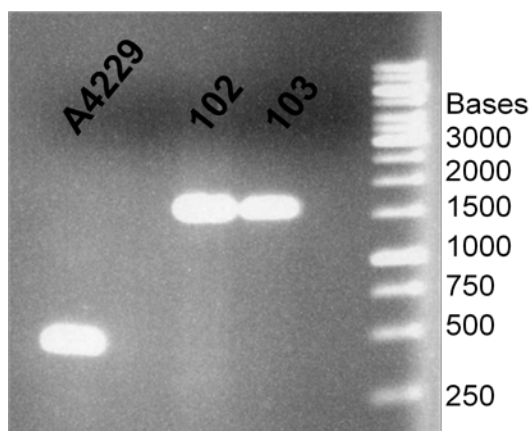


FIGURE 49 : Vérification de l'insertion du gène *cat* dans le gène *outM*. La PCR a été faite en utilisant l'ADN chromosomique comme matrice de la souche parentale A4229 et les mutants non sécréteurs 102 et 103. L'amplification du gène *outM* a été faite à partir des oligonucléotides OuMXba et OuMER.

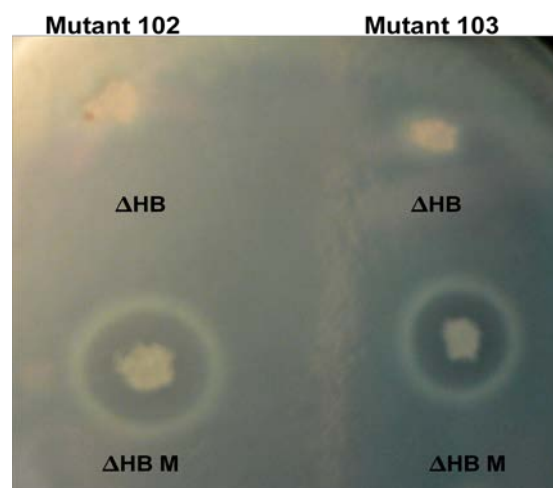


FIGURE 50 : Complémentation des mutants *E. chrysanthemi* $\Delta outM$ (102 et 103) par le plasmide $\Delta HB M$. Les bactéries ont été transformées avec les plasmides ΔHB (vecteur vide) et $\Delta HB M$ (portant *outM*), et patchées sur boîte PGA Ampicilline. Les halôts autour des colonies correspondent à la dégradation du polygalacturonate et ont été révélés par de l'acétate de cuivre.

Un site de restriction *Bam*HI a été créé par mutagénèse dirigée sur le codon 36 d'*outM*, qui se trouve dans la zone codant pour le début de la région périplasmique. Dans le plasmide pCK17, deux sites *Bam*HI collatéraux au gène *cat* ont permis l'insertion de ce gène dans le site *Bam*HI d'*OutM*. Cette insertion résulte en l'inactivation du gène *outM*. La souche parentale *E. chrysanthemi* A4229 a été transformée avec le plasmide obtenu, pGEM-T *OutL-OutM::Cm*.

Par recombinaison homologue, le gène *outM* portant une insertion du gène *cat* a été intégré dans le chromosome bactérien de la souche A4229. Pour cela, deux colonies ont été mises en culture dans le milieu minimum M63Y Cm 1/5 à 37°C. Le milieu M63 contient du glycérol Y comme unique source de carbone et du chloramphénicol 1/5 c'est-à-dire à une concentration de 10 µg/ mL. Puis 5 mL de M63Y ont étéensemencés avec 50 µL de la culture de la veille tous les jours pendant 12 jours. Les colonies qui ont recombiné le gène muté acquièrent le phénotype Cm^R, Amp^S. Les mutants ont été sélectionnés sur boîtes Cm 1/5 (10 µg/ mL) puis deux colonies (102 et 103) ont été ré-isolées sur boîtes PGA (polygalacturonate, dérivé de la pectine) et CMC Y (carboxyméthyl cellulose, dérivé soluble de la cellulose, complémenté en glycérol).

Les tests sur les milieux indicateurs, boîtes PGA et CMC Y, ont montré que les deux colonies sélectionnées 102 et 103 avaient perdu la capacité à dégrader la pectine et la cellulose (Figure 48). Ce sont donc deux mutants non sécréteurs. Afin de vérifier que ce phénotype est dû à l'inactivation du gène *outM*, par insertion de la cassette Cm, une PCR sur ADN chromosomique a été faite avec les amorces OuMXba et OuMER situées en 5' et 3' du gène *outM*. On observe une amplification d'un fragment d'ADN de 500 pb environ pour la souche parentale A4229 et une amplification de 1500 pb environ pour les mutants 102 et 103 (Figure 49). Or le gène *outM* fait 480 pb et le gène *cat* 1000 pb. Donc le gène *cat* est bien inséré dans le gène *outM* dans les mutants 102 et 103. Ces mutants sont complémentés par le plasmide ΔHB M, portant le gène *outM* sauvage, mais ne le sont pas par le plasmide ΔHB vide (Figure 50).

FIGURE 51 : Oligonucléotides utilisés dans cette étude
Amplification de gènes

Oligonucléotide	Séquence nucléotidique (5'-3')	Gène amplifié
OuMXba	GCGCTCTAGAATTGCGTCGCCGCTGG	<i>outM</i>
OuMER	GAATTCGCATCGATTACAGC	
OuLHpa	GTACGCGCCGCTGAAACCCTGTAAACAGGCGGTGCCGTGGC	<i>outL</i>
OuLER	GGGAATTCATGGCTGACTCCTCAG	

Mutagenèse dirigée

Oligonucléotide	Séquence nucléotidique (5'-3')	Protéine	Mutation insérée
OuMBH2	GCTGTATTATCTGTGCTGGGATCCGTGGCAGGAGCGGGCG	OutM	Site BamHI
OuMXba-sh	GCACGGCGGCAGATCGCCGGTCTAGACATCAGCCTGACGGTGTTG	OutM	Site XbaI
OuMPst-sh	GCAAAGCGCGGGCCCGCTGCAGCATCACCGTGCTGCGTATG	OutM	Site PstI
OuMEcl136II	GGGCACCGTGGCAGGAGCTCGCGCGACAGTGGCAGATGAC	OutM	Site Ecl136II
OuM-L122C	CGTAGCGATTCAACAACCTGTGCCACTGGCTGGCTGAACTGG	OutM	L122C
OuM-A126C	CAACCTGCTGCACTGGCTGTGTGAACTGGAGCAGAAAAACG	OutM	A126C
OuM-L122C-A126C	CAACCTGTGCCACTGGCTGTGTGAACTGGAGCAGAAAAACG	OutM	L122C A126C
OuLHpa	GTACGCGCCGGTGAAACCCTGTAAACAGGCGGTGTTGCCGTGGC	OutL	Site HpaI
OuLNhe	GGCTGCTGCTGGTGCTAGCAGAGTCTGTCTGGACCCATTAC	OutL	Site NheI
OuLshBH	GTACCGCAAACCTGTTCCCGGATCCGAAGCAGGTGGTGAACCCGCG	OutL	Site BamHI
OuLshBH3	CAGATGCAACGTCACCTGCAGGATCCGCGTTCCGGCATGAGCGGC	OutL	Site BamHI
OuCE47	CAATGCGCCGGTCTCCAGCGCTCAGATACCCCGGCACAGG	OutC	Site Eco47III
TetBHI	TTAAATTGCTAACGCAGTCAGGATCCGTGTATGAAATCTAACAATG	TetA	Site BamHI
TetBlaMBH2	GCAGTCAGGCACCGTGTATGGATCCTAACAATGCGCTCATCGTC	TetA	Site BamHI

E) Analyse d'une localisation correcte des protéines bitopiques dans la membrane interne par accessibilité aux protéases

Afin de contrôler la localisation correcte des protéines bitopiques de la membrane interne et spécialement les triples fusions avec BlaM, des tests d'accessibilité aux protéases dans les sphéroplastes ont été effectués comme décrit ci-dessous :

1) Formation de sphéroplastes : hydrolyse des polysaccharides par action du lysozyme

Une culture de 20 mL de LB a étéensemencée au 1/100 à partir d'une pré-culture de bactéries portant le plasmide d'intérêt. À $DO_{600}=0,3$, l'expression des gènes codant les fusions a été induite par ajout d'IPTG (1 mM final). Après 3h d'expression, les cellules de 5mL de culture ont été centrifugées (5 min à 2 300 g) puis resuspendues dans 0,5 mL de Tris-HCl pH 8,0 (0,2M) sur la glace. Après une nouvelle centrifugation (2 min à 9 300 g), le culot cellulaire a été repris dans 210 μ L de Tris-HCl pH 8,0 (0,2M) et 100 μ L ont été prélevés pour vérifier l'inaccessibilité des fusions aux protéases dans les cellules entières. Aux 110 μ L restants ont été ajoutés 110 μ L de Tris-HCl pH 8,0 (0,2M) sucrose 1M et 8 μ L d'EDTA 10 mM. Enfin, le lysozyme (6 μ L à 0,25 mg/mL) a été ajouté. Le mélange, après inversions douces, a été incubé 15 minutes sur glace. Après l'incubation, 220 μ L de $MgSO_4$ ou $MgCl_2$ 5 mM ont été ajoutés au mélange cellules/ lysozyme pour obtenir les sphéroplastes. De même, 110 μ L de $MgSO_4$ ou $MgCl_2$ ont été ajoutés à l'échantillon prélevé avant l'addition de lysozyme.

2) Dégradation par la trypsine des protéines bitopiques rendues accessibles dans les sphéroplastes

La solution de sphéroplastes a été séparée en 4 aliquots de 110 μ L. Les 4 échantillons ont été traités avec 6 μ L de protéase (trypsine 0,25 mg/ mL) et 4 μ L de Triton X100 10% ont été ajoutés dans un des quatre aliquots. La protéolyse a été stoppée à temps 0' pour le premier échantillon, 3' pour le deuxième et 15' pour les troisième et quatrième, par addition de 3 μ L de PMSF 2 mM et 4 μ L de cocktail d'inhibiteurs de protéases 50X (Millipore). Les échantillons ont été incubés pendant 5 minutes sur glace.

L'échantillon de cellules entières, prélevé avant l'ajout de lysozyme (220 µL), a été séparé en 2 aliquots. Un des deux a été traité avec 6 µL de trypsine 0,25 mg/mL pendant 15 minutes. La réaction a été stoppée par addition de 3 µL de PMSF 0,1 M et 4 µL de cocktail d'inhibiteurs de protéases 50X (Millipore). Cet échantillon a été incubé pendant 5 minutes sur glace. Ensuite, tous les échantillons ont été analysés par Western-blot.

F) GST pull-down

Le pull-down est une technique de purification par affinité dans laquelle un appât, protéine taguée, va « capturer » la ou les proies qui interagissent avec lui. Nous avons utilisé la GST (Glutathion S-Transferase) fusionnée à des protéines d'intérêt comme matrice d'affinité. La GST se fixe sur la résine Glutathion Sepharose 4B (GE Healthcare) ou Glutathion Agarose 4B (Macherey-Nagel).

La résine (0,3 mL) a tout d'abord été préparée par succession de lavages (d'un volume de 0,5 mL) à l'eau et au Tris-fix (50 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 100 mM NaCl ; 1mM EDTA). Les culots cellulaires issus de 100 mL de culture ont été remis en suspension dans 1,5 mL de tampon Tris-Fix + 15 µL de PMSF 0,1 M. Les cellules bactériennes ont ensuite été lysées par sonication (4 x 8 impulsions). Pour solubiliser des protéines, il a été ajouté 0,3 mL de Triton X100 10% et les extraits cellulaires ont été incubés par rotation pendant 15 minutes. Les protéines ont été séparées des débris cellulaires par centrifugation (7 min à 5 000 g) et 1,5 mL de surnageant a été récupéré. Les deux fractions (culot cellulaire et surnageant) de chaque échantillon a été déposé sur SDS-PAGE pour comparer la quantité de protéines présentes. Lorsque cela s'est avéré nécessaire, les surnageants ont été dilués par du tampon Tris-fix pour rééquilibrer la quantité de protéines. Puis ils ont été incubés une heure en rotation avec la résine. Après une heure d'incubation, la résine a subi une série de lavages (0,9 mL de Tris-fix, Triton X100 1%) qui permettent d'éliminer la majorité des protéines non-fixées. Les protéines fixées sur la résine ont ensuite été décrochées par ajout de 0,3 mL de tampon de charge pour SDS-PAGE (Tris-HCl pH 6,8 250 mM, glycérol 50%, SDS 10%, 2-mercaptoéthanol 500mM, Bleu de bromophénol 0,05%) et déposées sur SDS-PAGE. La coloration au bleu de coomassie a permis de comparer les quantités de protéines.

Résultats

TABLEAU I.1

Plasmides utilisés pour ce chapitre

Plasmide	Caractéristiques	Référence
Vecteurs de double-hybride bactérien		
pUT18C	Dérivé de pUC19 codant le domaine T18 de Cya, Amp ^R	Karimova <i>et al.</i> , 1998
pUT18C C	pUT18C portant <i>outC</i> (aa 2-272) fusionné en 5' au gène T18	Login and Shevchik, 2006
pUT18C M	pUT18C portant <i>outM</i> (aa 3-162) fusionné en 5' au gène T18	Ce travail
pUT18C LΔc	pUT18C portant ' <i>outL</i> tronqué (aa 244-400) fusionné en 5' au gène T18	Ce travail
pKT25	Dérivé de pSU40 codant le domaine T25 de Cya, Kan ^R	Karimova <i>et al.</i> , 1998
pKT25 C	pKT25 portant <i>outC</i> (aa 2-272) fusionné en 5' au gène T25	Login and Shevchik, 2006
pKT25 M	pKT25 portant <i>outM</i> (aa 3-162) fusionné en 5' au gène T25	Ce travail
pKT25 LΔc	pKT25 portant ' <i>outL</i> tronqué (aa 244-400) fusionné en 5' au gène T25	Ce travail

Chapitre I : étude des interactions entre OutC, OutM et OutL par double-hybride bactérien

Au sein du système de sécrétion de type II, la majorité des composants sont ancrés ou associés à la membrane interne. Parmi eux, les trois protéines OutC, OutL et OutM, dont le rôle n'est pas bien défini, formeraient avec OutE et OutF la plateforme de la membrane interne (Py *et al.*, 2001). Le rôle le plus probable de cette plateforme serait de servir de base au pseudopilus mais la fonction de chaque protéine au sein de cette plateforme reste à déterminer. Cette étude s'est focalisée sur la mise en place et l'assemblage des trois protéines OutC, OutL et OutM dans le T2SS. Nous avons tout d'abord recherché les interactions entre protéines entières, puis, une fois une interaction mise en évidence, disséqué ces protéines afin d'identifier les courtes régions directement impliquées dans les interactions.

La méthode choisie pour cela est le double-hybride bactérien (DHB), avec lequel les interactions interviennent chez *E. coli* (Karimova *et al.*, 1998). Contrairement au double-hybride levure, l'environnement des protéines dans le double-hybride bactérien est très proche de celui d'*E. chrysanthemi*. Comme décrit précédemment (matériels et méthodes), chacun des deux domaines T18 et T25 de l'adénylate cyclase Cya est fusionné aux protéines d'intérêt. L'interaction de ces protéines entraîne le rapprochement physique de deux domaines de Cya et l'activité enzymatique est reconstituée. Ceci résulte en la synthèse d'AMPc, qui, en se fixant sur CAP, a pour effet l'augmentation de l'expression des gènes rapporteurs. Ainsi, l'interaction entre deux protéines fusionnées à Cya est visualisée directement grâce à ces gènes rapporteurs (opérons *mal* et *lac*). La force d'interaction est tout d'abord estimée par le phénotype des colonies sur milieu indicateur Mac Conkey maltose puis quantifiée par dosage de l'activité β -galactosidase.

Comme l'activité de la β -galactosidase dépend de la force d'interaction et de la quantité de fusions produites lors des tests, elle peut apparaître faible à cause de l'absence d'interaction mais aussi à cause de la dégradation des fusions. Certaines protéines ne sont pas ou peu stables ce qui conduit à une faible activité de la β -galactosidase sans pour autant indiquer

MNISKLPPLSPSVIRRIIFYLLMLLFCQQLAMIFWRIGLPDNPVSSVQITPAQARQQPVTLNDFTLFGVSPEKNKAGALDASQMSNLPPSTLNLSLTGVMAGDDDSRSIAIISKD
 -----HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----EEEEEEEE-----EEEEEE-----
 NEQFSRGVNEEVPGYNAKIVSIRPDRVVLQYQGRYEVLLGLYSQEDSGSDGVPGAQVNEQLQQRASTTMSDYVSFSPIMNDNKLQGYRLNPGPKSDSFYRVGLQDNMAVALNGLDL
 --EEEE--E--EEEEEE--EEEE--EEEE--H--HHHHHHH-----EEEEEE--HHHHHH--EEEE--
 RDAEQAKKAMERMADVHNFTLTVERDGQRQDIYMEFGGDE
 --HHHHHHHHHH-----EEEEEE--EEEEEE-----

[illegible][illegible]

- 161 -

directement l'absence d'interaction entre ces protéines. C'est pourquoi nous avons systématiquement vérifié la présence et la quantité de chaque fusion par Western-blot.

OutC, OutL et OutM sont des protéines bitopiques. Elles possèdent un large domaine périplasmique, un segment transmembranaire et un domaine cytoplasmique qui n'est constitué que de 15 et 16 résidus chez OutC et OutM respectivement alors que celui d'OutL est constitué de 248 résidus (Figure I.1 et Figure I.2). Il a été démontré que la fusion des domaines Cya au N-terminus d'OutC n'affecte pas la topologie correcte N-in C-out de la protéine dans la membrane interne et la partie C-terminale d'OutC reste localisée dans le périplasme (Login and Shevchik, 2006). Les fusions T18::OutC et T25::OutC ont ainsi été utilisées pour démontrer une interaction OutC/ OutC *in vivo*. Nous avons employé la même stratégie avec OutL et OutM en construisant des fusions N-terminales T18 et T25 avec ces protéines et analysé les interactions entre les trois protéines.

I.A) Homodimérisation entre les protéines entières OutC, OutM et OutLΔc par double-hybride bactérien

I. A. 1) Homodimérisation d'OutC

L'homodimérisation d'OutC a été mise en évidence précédemment dans notre laboratoire (Login and Shevchik, 2006). Cette interaction était très forte en DHB, sur boîtes Mac Conkey et lors des dosages de la β -galactosidase. Le couple T18::OutC/ T25::OutC a donc été utilisé dans toutes les séries de double-hybride bactérien comme contrôle positif.

Il faut noter que lors des multiples séries de dosages de la β -galactosidase que j'ai réalisées, les valeurs observées avec ce couple ont varié parfois entre 1000 UA et 2500 UA, pour des échantillons issus de différentes séries de cultures. Ces variations sont probablement dues aux variations de milieux de culture et conditions de croissance. Néanmoins, l'utilisation systématique du couple T18::OutC/ T25::OutC comme contrôle positif et d'un couple avec un vecteur vide comme contrôle négatif nous permet de comparer proportionnellement toutes les combinaisons de couples entre eux.

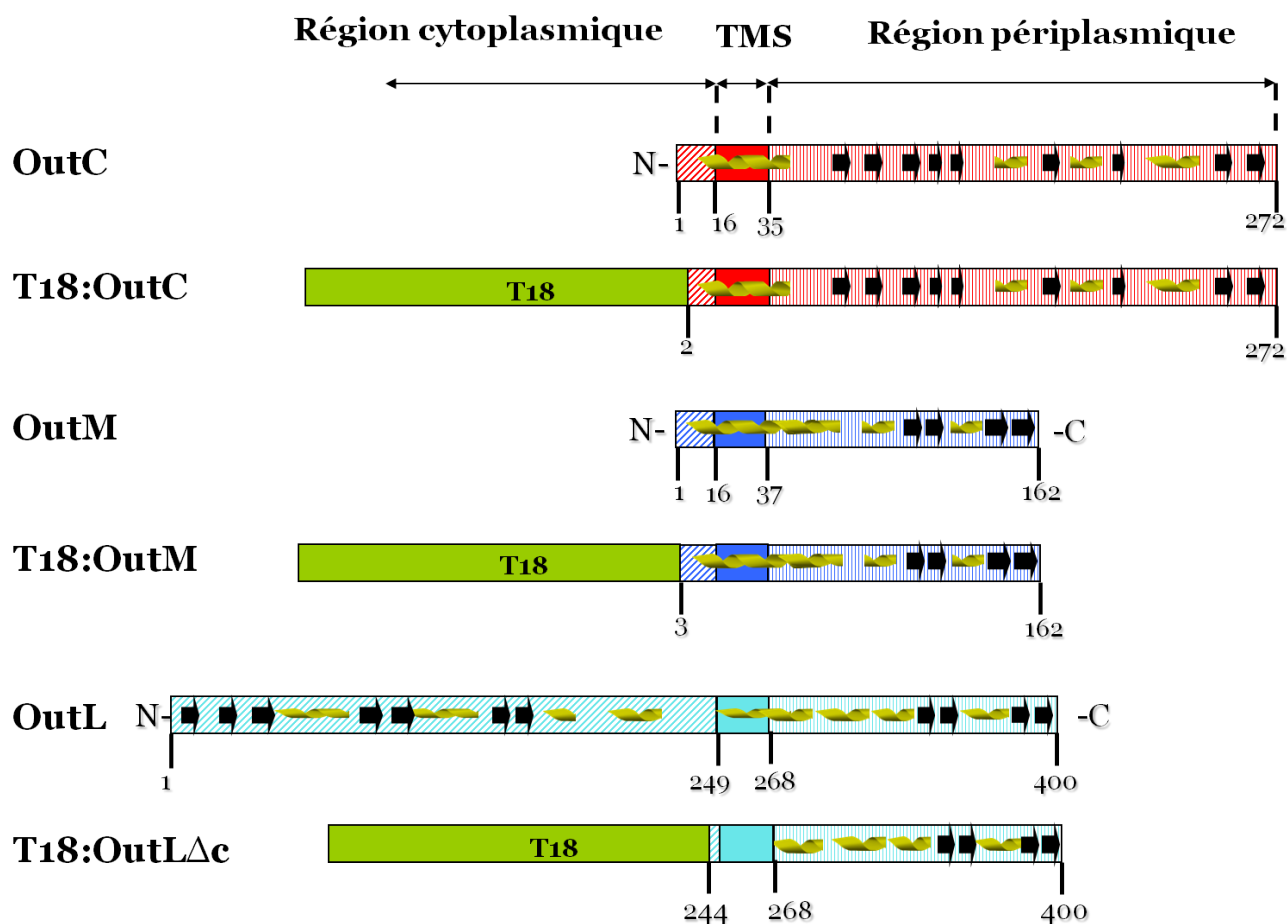


FIGURE I.2 : Représentations schématiques d'OutC, OutM et OutL et de leur dérivé construit pour le double-hybride bactérien. Les extrémités N-terminales des protéines C, M et L ont été fusionnées à l'un des deux domaines T18 ou T25 de l'adénylate cyclase Cya. Ici, seules les constructions avec T18 ont été représentées : les constructions avec T25 ont été faites de la même manière. Flèches pleines : brins β ; spirales : hélices α .

I. A. 1. 2) Homodimérisation d'OutM

Afin de tester si OutM est capable de dimériser *in vivo*, les fusions T18::OutM et T25::OutM ont été co-exprimées dans la souche DHP1. Dans plusieurs séries de dosages, l'activité de la β -galactosidase détectée avec le couple OutM/ OutM est comparable au contrôle négatif (T18::OutM/V ou V/T25::OutM) (Figure I.3, colonnes 2 et 4). Le contrôle négatif correspond à une fusion de T18:: ou T25::OutM co-exprimée avec T18 ou T25 seul (plasmide vide). Dans aucune des combinaisons, les fusions T18::OutM et T25::OutM ne sont détectées par Western-blot avec les anticorps anti-OutM (non montré). Ceci suggère que les fusions Cya::OutM ne sont pas ou peu stables au moins dans ces conditions ou que la réactivité des anticorps anti-OutM est trop faible. Néanmoins, d'autres interactions avec les fusions OutM (T18::OutM/T25::OutL Δ c ou T18::OutC/T25::OutM) ont été détectées en double-hybride comme l'indique la forte activité β -galactosidase observée avec ces couples (Figure I.3), ce qui montre que les fusions Cya::OutM sont bien exprimées et restent stables au moins en présence d'OutC ou OutL Δ c.

Nous avons voulu vérifier la fonctionnalité des fusions Cya::OutM chez *E. chrysanthemi*. Un mutant *outM* d'*E. chrysanthemi* a été construit lors de cette thèse (voir matériel et méthodes pour la construction). Ce mutant a été efficacement complémenté par le gène sauvage *outM* porté par un plasmide Δ HBM (Figure I.4.A). Nous avons également voulu vérifier la capacité des fusions T18::OutM et T25::OutM à compléter la mutation *outM*. Ces deux fusions ne complètent pas le mutant *outM* : il n'y a pas de sécrétion de pectinases dans le milieu extracellulaire (Figure I.4.A). En comparaison, les fusions T18::OutC et T25::OutC complètent un mutant *outC*, et les pectinases sont correctement sécrétées (Figure I.4.B). Or, là encore, les fusions Cya::OutM n'ont pas été détectées par les anticorps anti-OutM chez *E. chrysanthemi* (non montré).

En conclusion, les expériences réalisées en double-hybride bactérien avec les fusions portant OutM entière n'ont pas permis de déterminer si cette protéine dimérise.

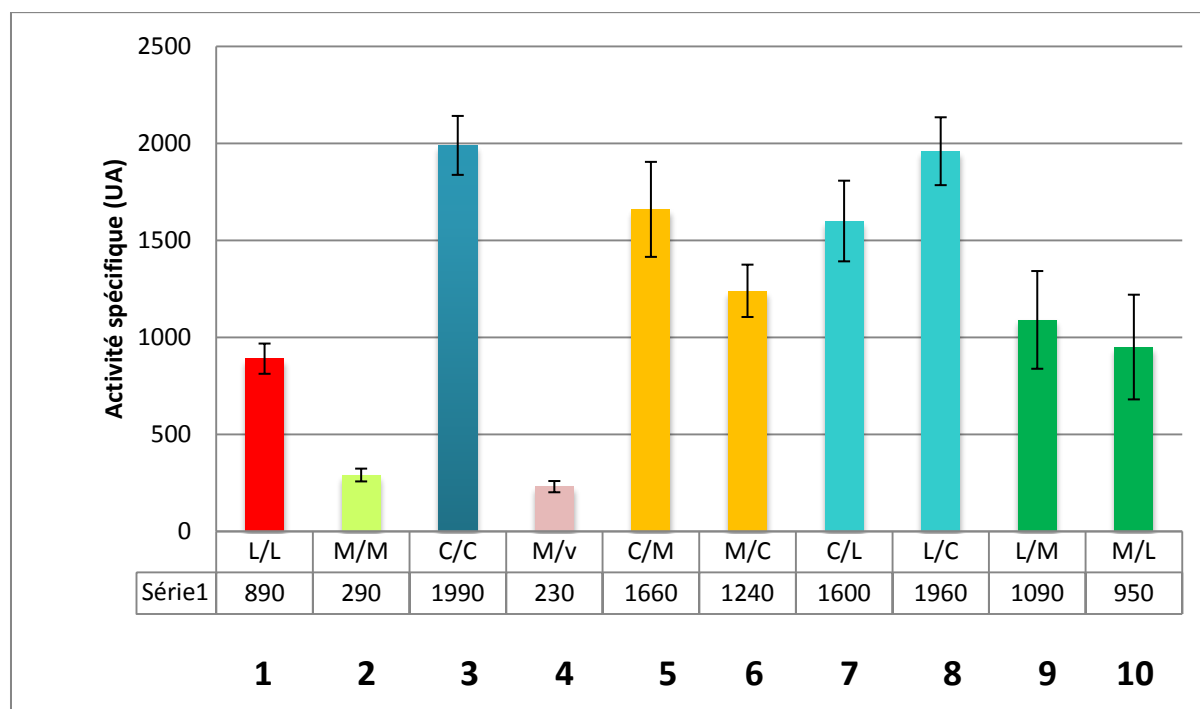


FIGURE I.3 : Analyse des interactions entre les protéines entières en double-hybride bactérien. Diagramme d'une série représentative de dosages de l'activité de la β -galactosidase. Pour chaque couple, plusieurs séries de transformations ont été faites, suivies de 2 à 4 séries de dosages de la β -galactosidase. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne à 4 mesures indépendantes d'une série de transformation. La première lettre, L (=L Δ c), M ou C, correspond aux fusions des protéines correspondantes avec T18, la seconde aux fusions avec T25. Le vecteur vide est représenté par v. Seul le couple M/v est présenté, les valeurs de la β -galactosidase avec les autres témoins négatifs sont similaires à celle-ci. Ces couples sont des témoins négatifs. Un seul de ces témoins négatifs est présenté ici par souci de place et de clarté.

I. A. 1. 3) Homodimérisation d'OutLΔc

Afin de tester si OutL dimérise en DHB, nous avons utilisé des fusions de Cya avec OutL dépourvue de sa partie cytoplasmique (OutLΔc). En effet, la protéine OutL entière et ses fusions avec GST, His et Cya se sont avérées être instables (non montré). Puisque l'implication de la région cytoplasmique dans l'homodimérisation d'OutL (et dans l'interaction avec l'ATPase OutE) a déjà été démontré précédemment (Ball *et al.*, 1999 ; Possot *et al.*, 2000 ; Py *et al.*, 1999 ; Chen *et al.*, 2005), l'utilisation d'OutLΔc en DBH nous a permis d'étudier le rôle du segment transmembranaire et de la région périplasmique seuls dans les interactions protéine-protéine au sein du T2SS.

Les dosages de la β-galactosidase montrent qu'OutLΔc dimérise en double-hybride bactérien (Figure I.3, colonnes 1 et 4). L'activité de la β-galactosidase du couple OutLΔc/OutLΔc est 4 fois supérieure au témoin négatif et 2 fois inférieure au témoin positif OutC/OutC.

Lorsque une fusion Cya::OutLΔc a été exprimée seule (avec un vecteur vide), la fusion n'a pu être détectée que difficilement par Western-blot avec les anticorps anti-OutL (Figure I.5, piste 3). En revanche, les fusions T18::OutLΔc et T25::OutLΔc, quand elles ont été exprimées ensemble dans la souche d'*E.coli* DHP1, ont été détectées avec ces anticorps. Cependant, une seule bande est visible mais étant donné la faible différence de poids moléculaire entre les deux fusions, les deux bandes se superposent (Figure I.5, pistes 4 et 5). Il pourrait aussi n'y avoir qu'une seule des deux fusions visible par immunoblot, car les protéines ne sont pas visibles en dessous d'un certain seuil. Or, nous avons constaté que les protéines exprimées à partir des plasmides pKT25 (origine de répllication p15) sont moins abondantes que celles exprimées à partir de pUT18C (origine ColE1) (Figure I.5 et non montré). Par exemple, OutLΔc apparaît en très grande quantité dans le couple T18::OutLΔc/T25::OutM et en quantité moyenne dans T18::OutM/T25::OutLΔc. Quoiqu'il en soit, la coexpression des fusions Cya::OutLΔc ensemble permet leur stabilisation.

On peut donc en conclure que l'interaction OutLΔc/ OutLΔc est relativement forte dans les conditions de DHB.

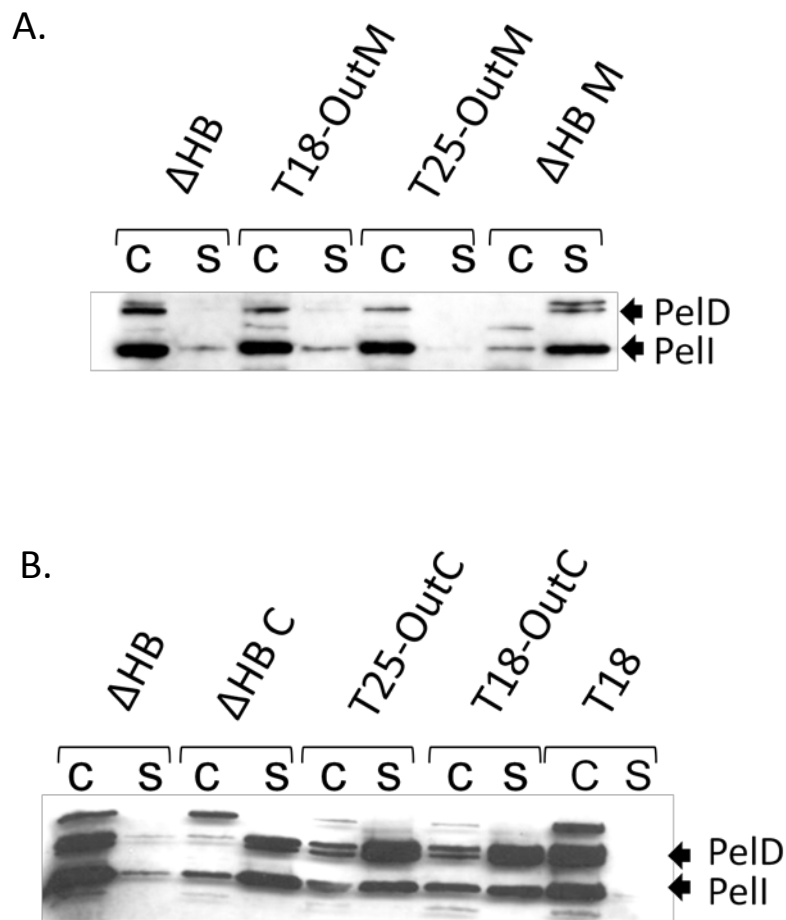


FIGURE I.4 : Fonctionnalité des fusions Cya::OutM et Cya::OutC chez *E. chrysanthemi* : (A) Capacité des fusions Cya::OutM à compléter un mutant *outM* d'*E. chrysanthemi*. (B) Capacité des fusions Cya::OutC à compléter un mutant *outC* d'*E. chrysanthemi*.

Détection de la sécrétion de pectinases par Western-Blot avec les anticorps anti-PelI et anti-PelD, 2 pectinases sécrétées par le T2SS. C : extrait cellulaire ; S : surnageant. Δ HB est un plasmide vide. Δ HB M est un plasmide portant le gène *outM*. T18::OutM et T25::OutM sont des plasmides portant les fusions correspondantes utilisées en double-hybride bactérien. Δ HB C est un plasmide portant le gène *outC*. T18 est un plasmide portant le sous-domaine T18 de Cya seul.

I. B) Interactions entre OutC, OutLΔc et OutM

I. B. 1) Interaction d'OutLΔc et OutM

Une fois l'homodimérisation d'OutC, OutLΔc et OutM analysée par DHB, nous avons recherché les interactions entre ces protéines. Lorsque T18::OutLΔc/ T25::OutM et T18::OutM/ T25::OutLΔc ont été co-exprimés dans la souche DHP1, les colonies sur milieu indicateur Mac Conkey sont apparues rouges. Des valeurs d'activité β-galactosidase fortes ont également été obtenues avec ces couples (Figure I.3, colonnes 9 et 10). Elles sont quatre fois supérieures au témoin négatif et deux fois inférieures au témoin positif OutC/ OutC (Figure I.3). La quantité de fusions Cya::LΔc est très fortement augmentée en présence de Cya::OutM (Figure I.5, pistes 4 et 5 par rapport à la piste 3). Ceci suggère que la présence d'OutM protège OutLΔc de la dégradation. La quantité de T25::LΔc est légèrement plus faible que T18::LΔc ce qui concorde avec la différence (faible) de l'activité de la β-galactosidase observée entre les deux couples OutLΔc/ OutM et OutM/ OutLΔc (Figure I.5, pistes 4 et 5). Ces résultats indiquent clairement une interaction entre OutM et OutL dépourvue de sa région cytoplasmique.

I. B. 2) Interaction d'OutC et OutLΔc

Nous avons ensuite cherché à savoir si OutLΔc interagit avec OutC en DHB. Les tests sur boîtes Mac Conkey maltose et les dosages de la β-galactosidase ont montré une forte activation des gènes rapporteurs lorsque T18::OutLΔc/ T25::OutC et T18::OutC/ T25::OutLΔc ont été co-exprimés dans *E. coli* DHP1. L'activité de la β-galactosidase observée avec T18::OutLΔc/ T25::OutC est égale au témoin positif OutC/ OutC et celle du couple T18::OutC/ T25::OutLΔc est légèrement plus faible (Figure I.3, colonnes 7,8 et 3). OutLΔc est peu visible en Western-blot lorsqu'elle est co-exprimée avec un vecteur vide mais apparaît en un peu plus grande quantité quand co-exprimée avec OutC (Figure I.5, pistes 3 et 6). OutC aurait peut-être un rôle dans la stabilisation d'OutL mais qui est bien moindre que celui d'OutM (Pistes 4 et 5 avec 6 et 7). En revanche, la quantité d'OutC est similaire dans tous les couples (Figure I.5, pistes 8 et 9).

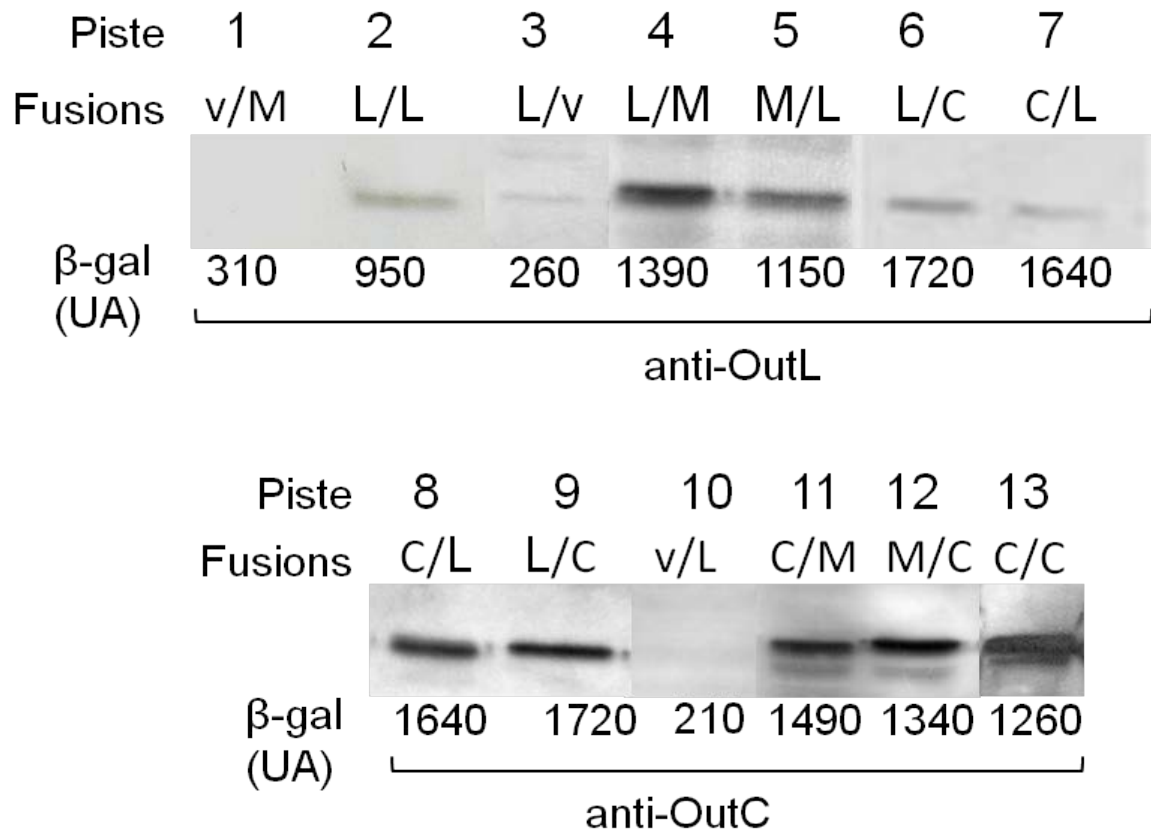


FIGURE I.5 : Expression des fusions des protéines entières Out en double-hybride bactérien. Les cellules *E. coli* DHP1 exprimant les combinaisons de fusions Cya::Out indiquées sur la figure ont été cultivées 20 h à 30°C puis utilisées pour les dosages de la β -galactosidase (indiqués en bas) et pour une analyse des protéines par Western-blot avec les anticorps anti-OutL et anti-OutC. La première lettre, L (=L Δ c), M ou C, correspond aux fusions des protéines correspondantes avec T18, la seconde aux fusions avec T25. Dans chaque Western-blot, une combinaison dans laquelle aucune des fusions ne réagit avec les anticorps correspondants sert de témoin négatif.

Au vu de ces résultats, OutLΔc interagit avec OutC dans les conditions du DHB et cette interaction semble protéger OutLΔc de la dégradation.

I.B.3) Interaction d'OutC et OutM

Lorsque nous avons co-exprimé les fusions Cya avec OutC et OutM chez *E. coli* DHP1, les valeurs de l'activité β-galactosidase observées ont été 6 à 8 fois supérieures à celle du témoin négatif (Figure I.3, colonnes 4,5 et 6). Sur Western-blot, Cya::OutC, co-exprimé avec Cya::OutM, apparaît en quantité comparable dans les deux combinaisons (Figure I.5, pistes 11 et 12). Les valeurs de dosages sont moins élevées avec le couple T18::OutM/ T25::OutC que dans le couple T18::OutC/ T25::OutM mais puisqu'il ne semble pas y avoir de différence entre la quantité de T18::OutC et T25::OutC, cette fois-ci, la quantité de T18::OutM dans le couple T18::OutM/ T25::OutC pourrait être le facteur limitant.

Au vu de ces résultats, OutC interagit également avec OutM dans les conditions du DHB.

I. C) Discussion et conclusion

Dans ce chapitre, nous avons employé la technique du DHB pour rechercher des interactions potentielles entre les trois protéines bitopiques de la membrane interne : OutC, OutL et OutM. Nous avons pu mettre en évidence de multiples interactions bipartitaires, notamment entre OutC/OutLΔc, OutC/OutM, OutLΔc/OutLΔc et OutLΔc/OutM. L'interaction OutC/OutC a été caractérisée lors d'une étude précédente du laboratoire (Login and Shevchik, 2006). Il apparaît donc que tous les couples de protéines que nous avons testés interagissent en DHB excepté OutM/OutM.

OutM est la plus petite des trois protéines étudiées (18kDa). Dans les expériences de DHB, je n'ai pas détecté d'interaction avec le couple OutM/ OutM. De plus, le mutant *outM* d'*E. chrysanthemi* n'a pas été complémenté par les fusions Cya::OutM. La stabilité des fusions T18::OutM et T25::OutM en est peut-être la cause. Malheureusement, il a été impossible de détecter les fusions avec les anticorps anti-OutM probablement à cause de leur faible réactivité. En revanche, dans les expériences de pull-down effectuées au laboratoire (travaux de thèse de Frédéric Login), la protéine His₆-OutM a été co-purifiée avec la protéine hybride GST::OutM et GST::OutMΔBper (région périplasmique d'OutM). De plus, la

protéine His₆::OutM, solubilisée avec le détergent Triton X100, forme un dimère stable *in vitro* comme l'ont démontré les expériences de filtration sur gel. Une homodimérisation d'EpsM, un homologue d'OutM, a aussi été observée par des expériences de filtration sur gel (Sandkvist *et al.*, 1999). D'autre part, dans les expériences de pull-down et filtration sur gel réalisées par F. Login, les différentes constructions d'OutM ont été bien visibles par immunoblot avec les anticorps anti-OutM. Ainsi, dans les cas où OutM est surproduite, elle est visible par les anticorps anti-OutM. Une absence de détection des fusions avec OutM entière en DHB peut signifier qu'elles sont peu exprimées et/ ou sont instables, au moins en absence d'un partenaire protéique approprié (OutL ou OutC). La contradiction entre les résultats *in vitro* et *in vivo* (DHB) peut être liée à des limitations de cette dernière technique. Il ne peut être exclu que la fusions des domaines T18 et T25 en N-terminal d'OutM pourrait créer des obstacles stériques empêchant l'interaction OutM/ OutM. En plus, comme nous le montrerons dans les chapitres suivants, la région périplasmique et le segment transmembranaire d'OutM homodimérisent tous les deux en DHB.

T18::OutLΔc/ T25::OutLΔc est l'interaction la plus faible détectée dans cette étude. La coexpression des ces deux fusions les stabilise mutuellement, ainsi que leur coexpression avec OutC (Figure I.5). Mais la stabilisation maximale des fusions Cya::OutLΔc est observée en présence de Cya::OutM. Par des expériences de pull-down, F. Login a détecté une interaction d'OutL avec elle-même. Une homodimérisation de son homologue EpsL a été suggérée par l'analyse de la protéine solubilisée avec du Triton X100 en filtration sur gel (Sandkvist *et al.*, 1999).

Les expériences de double-hybride bactérien indiquent une forte interaction entre OutLΔc et OutM. F. Login a également montré par les expériences de pull-down qu'His₆-OutL se fixe sur la matrice constituée de GST::OutM. Une telle interaction a été observée chez certains autres homologues d'OutM et OutL par co-immunoprécipitation : EpsL et EpsM (Sandkvist *et al.*, 1999), XpsL et XpsM (Lee *et al.*, 2001). Dans la littérature, il a été montré que GspL est peu stable en l'absence de GspM et que les deux protéines se stabilisent mutuellement (Michel *et al.*, 1998 ; Sandkvist *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 2001). J'ai pu démontrer pour la première fois une interaction directe entre GspL et GspM par une méthode *in vivo*. Ces résultats entérinent les résultats antérieurs et nous permettent de penser que tous les membres des familles GspL et GspM formeront ce complexe dans la membrane interne. Etant donné l'homodimérisation d'OutLΔc décelée en DHB et l'effet protecteur d'OutM vis-à-vis d'OutL,

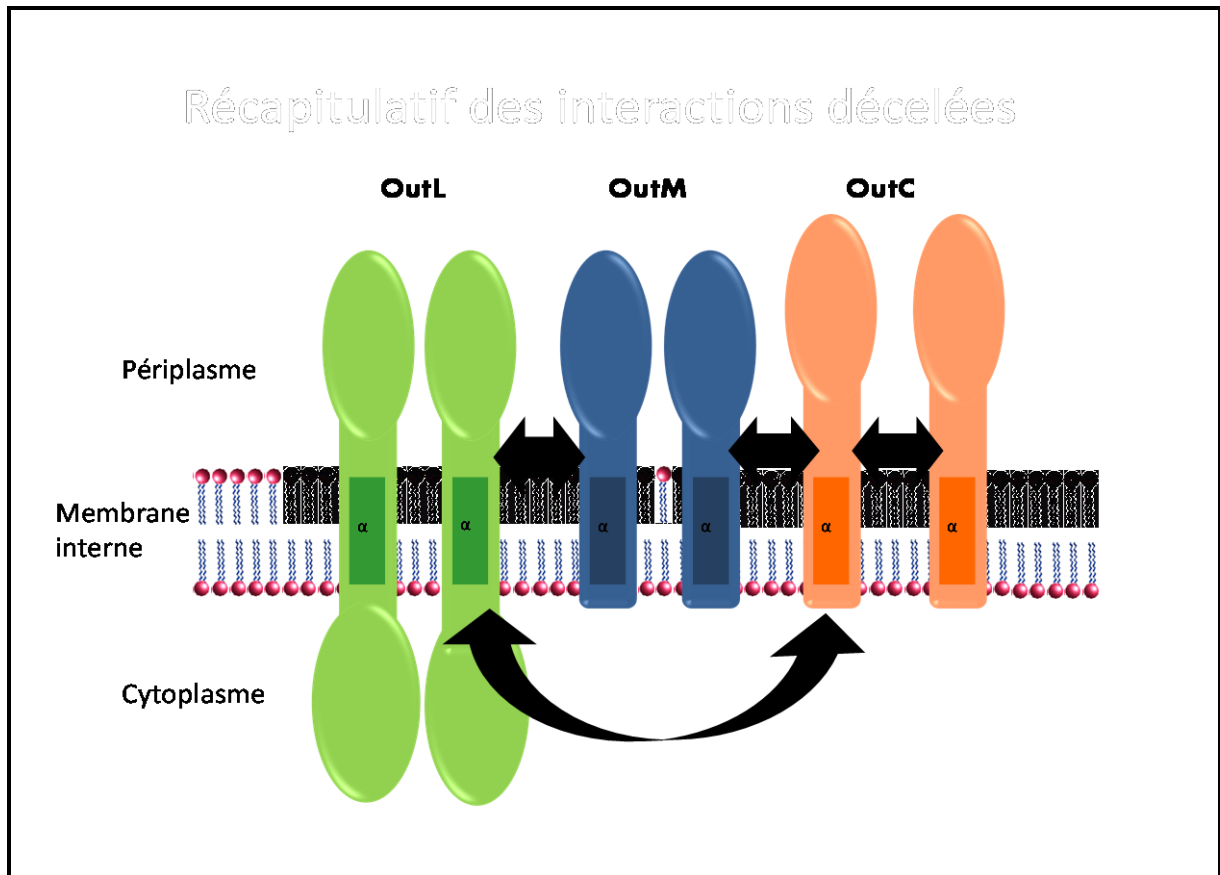


FIGURE I.6 : Représentation schématique des interactions décelées par double-hybride bactérien entre les protéines OutC, OutL Δ c et OutM du système de sécrétion de type II d'*E. chrysanthemi*. Les flèches symbolisent les interactions et leur épaisseur la force d'interaction.

deux hypothèses peuvent être émises : i) OutL homodimérise et interagit avec OutM grâce à un autre site, ce qui permet sa protection ii) l'homodimérisation d'OutL et son interaction avec OutM sont des interactions transitoires mais leur alternance pourrait permettre la protection d'OutL.

J'ai aussi détecté deux interactions impliquant OutC : OutC et OutM ainsi qu'OutC et OutL Δ c. Dans les expériences de pull-down de F. Login, His₆-OutL a été fixée spécifiquement sur la matrice GST::OutC ; et His₆-OutC sur la matrice GST::OutM. Tsai et collaborateurs ont étudié par chromatographie d'affinité l'association des trois protéines XpsN, XpsL et XpsM (homologues d'OutC, OutL et OutM respectivement) (Tsai *et al.*, 2002). XpsN s'associe et se dissocie du complexe L/M et renforce celui-ci. Néanmoins, une interaction directe bi-partenaire entre 1) GspC et GspM et 2) GspC et GspL Δ c n'a jamais été détectée auparavant. Les résultats de pull-down de F. Login et les quelques données bibliographiques sont cohérents avec les résultats obtenus en double-hybride bactérien lors de cette étude : les trois protéines interagissent chacune avec elle-même et avec les deux autres. Ceci laisse penser à un très fort réseau d'interactions entre ces protéines de la membrane interne.

Afin de mieux apprécier la validité de mes résultats, quelques points dits techniques vont être discutés, et les points forts et faibles de l'approche employée soulignés. La technique du DHB a été initialement conçue pour analyser des protéines solubles dans le cytoplasme bactérien (Karimova *et al.*, 1998). Lors de sa thèse, F. Login a démontré l'efficacité d'utilisation du DHB avec OutC (Login and Shevchik, 2006). De plus, depuis quelques années, cette technique a été employée avec d'autres protéines membranaires (Daniel *et al.*, 2006 ; Van den Ent *et al.*, 2006). Les protéines OutC, OutL et OutM possèdent une topologie N-in/C-out dans la membrane interne. Les domaines T18 et T25 de Cya étant fusionnés du côté N-terminal de ces protéines restent cytoplasmiques et peuvent devenir fonctionnels lorsque les protéines d'intérêt fusionnées interagissent entre elles.

Une utilisation appropriée du DHB avec les protéines bitopiques de la membrane interne nécessite donc une topologie correcte des fusions dans la membrane (N-in/C-out). Dans le cas des fusions T18::OutC et T25::OutC, leur localisation a été vérifiée par une analyse d'accessibilité de la partie périplasmique aux protéases (Login and Shevchik, 2006). Malheureusement, nous n'avons pas pu effectuer ce genre d'analyse avec les fusions Cya::OutL et Cya::OutM, faute de forte stabilité de ces fusions exprimées seules et/ou de

réactivité insuffisante des anticorps contre OutL et OutM. Cependant, les interactions positives observées entre OutL et OutC ainsi qu'entre OutM et OutC indiquent que les fusions Cya::OutL et Cya::OutM ont une topologie appropriée puisqu'elles interagissent fortement avec Cya::OutC, elle-même correctement localisée dans la membrane interne.

La force apparente des interactions (estimée par l'activité de la β -galactosidase) diminue dans l'ordre OutC/OutC, OutC/OutL Δ c, OutC/OutM, OutL Δ c/OutM et OutL Δ c/OutL Δ c (Figure I.3). Ces interactions bipartenaires observées en DHB pourront aussi avoir lieu au sein du T2SS. Toutefois, il est difficile d'estimer si les forces d'interaction seront comparables dans ce complexe multiprotéique. La force apparente des interactions estimée par l'activité de la β -galactosidase dépend de deux facteurs majeurs : la force d'interaction entre les deux protéines et la quantité de chaque fusion dans les cellules. Or, cette quantité dépend de taux d'expression et de stabilité des fusions. Par exemple, les fusions exprimées à partir de plasmide pKT25 (origine de réplication p15) sont produites en moindre quantité par rapport à celles du plasmide pUT18C (origine de réplication ColE1). Ceci explique en partie les variations des valeurs de la β -galactosidase observées avec les mêmes couples exprimés dans les deux sens (Figure I.3 et I.5, L/M et M/L par exemple). Dans ce cas, la quantité de la fusion moins stable (ici T25::OutL) semble être un facteur limitant de la restauration d'activité de Cya. Ensuite, nous avons remarqué que les fusions T18::OutL Δ c et T25::OutL Δ c, exprimées seules ou avec le vecteur vide ne sont pas stables (pas ou peu visibles par Western blot). Une coexpression de ces fusions avec elles-mêmes, Cya::OutC ou Cya::OutM augmentent leur quantité et aboutit à des valeurs positives de la β -galactosidase (Figure I.5 avec les anticorps anti-OutL). Il semble donc que, dans les conditions du DHB, une coexpression de deux protéines peut les protéger de la dégradation et donc augmenter leur quantité dans les cellules et, en conséquence, l'activité de la β -galactosidase (mais seulement si les deux protéines interagissent entre elles). En effet, la quantité de fusions Cya::OutL Δ c augmente dans l'ordre OutL Δ c/ v, OutL Δ c/ OutL Δ c, OutL Δ c/ OutC et OutL Δ c/ OutM (Figure I.5). Cependant, la valeur de l'activité β -galactosidase est plus importante dans le couple OutL Δ c/ OutC, où la quantité de fusion Cya::OutL Δ c est plus faible qu'avec OutL Δ c/ OutM. De plus, les expériences qui vont suivre montrent que la protection mutuelle de deux protéines lors de leur coexpression en DHB n'aboutit pas automatiquement à une augmentation de l'activité de la β -galactosidase si les deux protéines n'interagissent pas entre elles (comme le cas d'OutMpéri/ OutCpéri ; chapitre II.A.2).

En conclusion, l'utilisation du double-hybride bactérien pour étudier les interactions entre protéines entières de la membrane interne s'est révélée être fructueuse : plusieurs interactions entre les protéines (OutL Δ c/ OutL Δ c, {OutL Δ c et OutM}, {OutC et OutM} et {OutC et OutL}) ont été mises en évidence. On peut noter que les expériences de double-hybride ne détectent que des interactions bi-partenaires et ne nous permettent pas de voir si l'interaction d'une protéine avec un partenaire influence (diminue ou renforce) son interaction avec d'autres partenaires. Par ailleurs, ces protéines sont composées de deux régions principales : le TMS et la région périplasmique. On peut aussi imaginer que l'interaction de certaines régions de ces protéines ne sont pas compatibles avec celles d'autres régions, par exemple celles intervenant dans le périplasme avec celles intervenant dans la membrane. Afin de préciser la ou les régions impliquées dans chaque interaction, nous avons disséqué les trois protéines et analysé tout d'abord les interactions intervenant entre les régions périplasmiques dans le chapitre II.

TABLEAU II.1

Plasmides utilisés dans ce chapitre

Plasmide	Caractéristiques	Référence
Vecteurs de double-hybride bactérien		
pUT18C Cp	pUT18C portant 'outC tronqué (aa 40-272) fusionné en 5' au gène T18	Login and Shevchik, 2006
pUT18C Mp	pUT18C portant 'outM tronqué (aa 38-162) fusionné en 5' au gène T18	Ce travail
pUT18C MAX	pUT18C portant 'outM tronqué (aa 81-162) fusionné en 5' au gène T18	Ce travail
pUT18C MAP	pUT18C portant 'outM tronqué (aa 98-162) fusionné en 5' au gène T18	Ce travail
pUT18C Lp	pUT18C portant 'outL tronqué (aa 265-400) fusionné en 5' au gène T18	Ce travail
pUT18C LΔB1	pUT18C portant 'outL tronqué (aa 295-400) fusionné en 5' au gène T18	Ce travail
pUT18C LΔB3	pUT18C portant 'outL tronqué (aa 312-400) fusionné en 5' au gène T18	Ce travail
pUT18C LpMp	pUT18C portant la région périplasmique 'outL' (aa 265-400) suivi par la région périplasmique 'outM (aa 38-162)	Ce travail
pKT25 Cp	pKT25 portant 'outC tronqué (aa 40-272) fusionné en 5' au gène T25	Login and Shevchik, 2006
pKT25 Mp	pKT25 portant 'outM tronqué (aa 38-162) fusionné en 5' au gène T25	Ce travail
pKT25 MAX	pKT25 portant 'outM tronqué (aa 81-162) fusionné en 5' au gène T25	Ce travail
pKT25 Lp	pKT25 portant 'outL tronqué (aa 265-400) fusionné en 5' au gène T25	Ce travail
pKT25 LΔB1	pKT25 portant 'outL tronqué (aa 295-400) fusionné en 5' au gène T25	Ce travail
pKT25 LΔB3	pKT25 portant 'outL tronqué (aa 312-400) fusionné en 5' au gène T25	Ce travail
pKT25 LΔF :BlaM	pKT25 portant 'outL' tronqué (aa 265-311) fusionné en 5' au gène T25 et en 3' à blaM	Ce travail
pKT25 LΔH :BlaM	pKT25 portant 'outL' tronqué (aa 265-295) fusionné en 5' au gène T25 et en 3' à blaM	Ce travail
Vecteurs de clonage		
pGEM-T L-M :Cm	Porte la région outL-outM avec cat (Cm ^R) inséré dans outM	Ce travail
ΔHB	pT7-6 avec le promoteur pelC	Laboratoire
ΔHB M	pT7-6 avec outM sous contrôle du promoteur pelC	Laboratoire
ΔHB M L122C	ΔHB M avec la mutation L122C	Ce travail
ΔHB M A126C	ΔHB M avec la mutation A126C	Ce travail
ΔHB M L122C A126C	ΔHB M avec les mutations L122C et A126C	Ce travail
Vecteurs cassettes de résistance		
pCK17	Cassettes de résistance au Cm et à la Kan	Laboratoire

Chapitre II : étude des interactions entre les régions périplasmiques d'OutC, OutL et OutM

Nous avons analysé le rôle des régions périplasmiques dans les interactions protéines-protéines décelées. Ce travail doit permettre de préciser les interactions retrouvées avec les protéines entières : soit en montrant que la région périplasmique isolée d'une protéine est suffisante pour conduire l'interaction, soit en montrant que cette région isolée n'est pas capable d'interagir avec elle-même ou avec une autre région périplasmique et donc qu'elle n'est probablement pas impliquée dans l'interaction entre protéines entières. Les fusions des régions périplasmiques d'OutC, OutL et OutM et leurs dérivés tronqués utilisés dans cette étude sont représentés schématiquement dans la figure II.1.

II. A) Interactions entre les régions périplasmiques d'OutC, OutL et OutM en double-hybride bactérien

II. A. 1) Homodimérisation des régions périplasmiques d'OutC, OutL et OutM

OutC_{péri}/ OutC_{péri}

Nous avons voulu voir si les régions périplasmiques d'OutC isolées pouvaient dimériser. Les colonies co-transformées avec le couple T18::OutC_{péri}/ T25::OutC_{péri} donnent un phénotype *mal⁻*, *lac⁻* sur boîtes Mac Conkey et dans les dosages de l'activité β -galactosidase : les valeurs observées correspondent à celles du témoin négatif (Figure II.2, colonnes 3 et 5). Les régions périplasmiques d'OutC isolées ne sont donc pas capables de dimériser dans les conditions du DHB.

OutL_{péri}/ OutL_{péri}

Nous avons voulu tester la capacité de dimérisation des régions périplasmiques d'OutL. Les colonies co-transformées avec le couple T18::OutL_{péri}/ T25::OutL_{péri} ont donné sur boîtes Mac Conkey un phénotype mitigé : les colonies sont apparues roses. De même, les dosages de l'activité enzymatique de la β -galactosidase sont supérieurs d'environ deux fois à

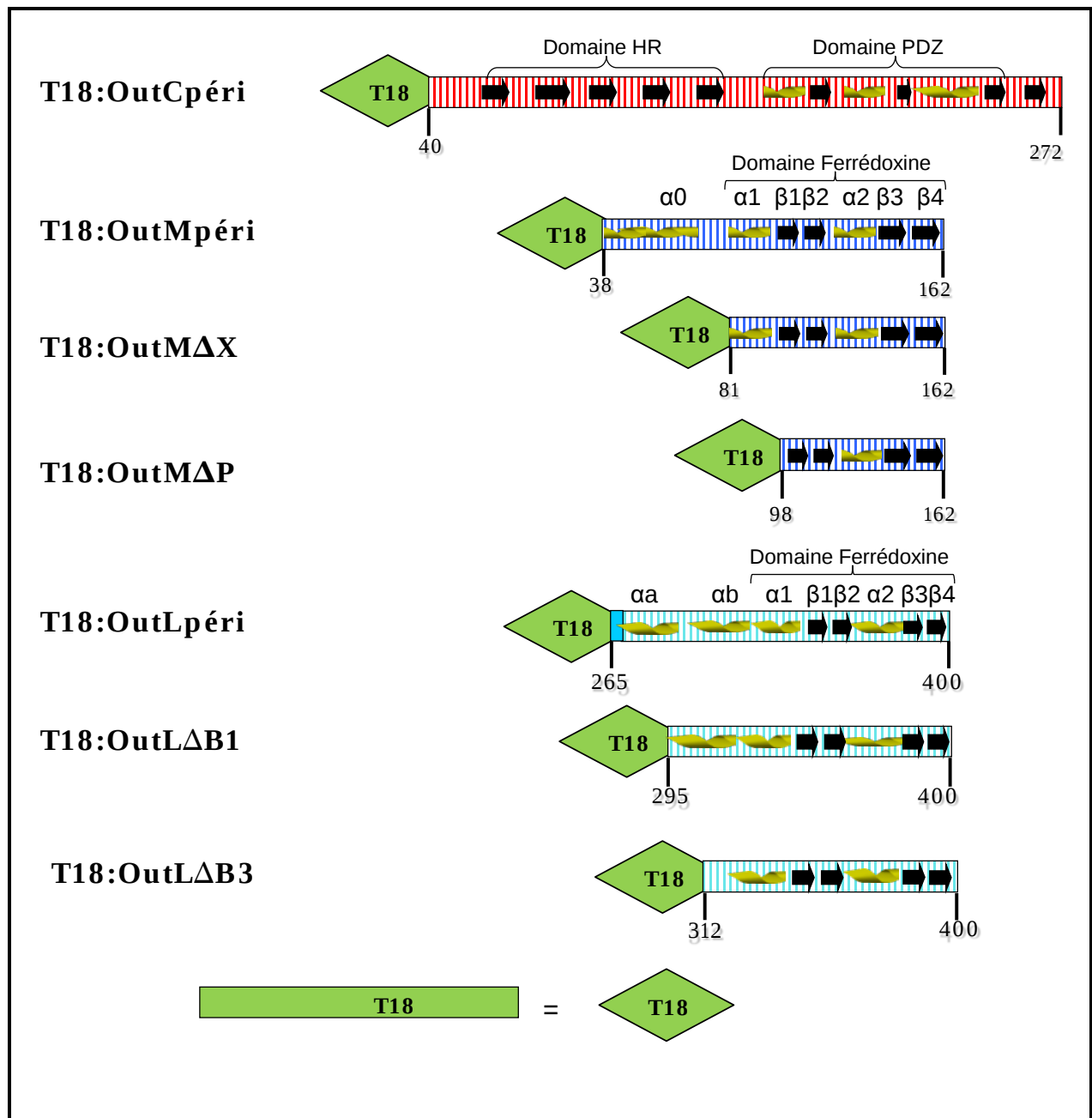


FIGURE II.1 : Représentation schématique des fusions de T18 avec les parties périplasmiques d'OutC, OutM et OutL et de leurs dérivés, construits pour le double-hybride bactérien. Seules les constructions avec T18 ont été représentées : les constructions avec T25 ont été faites de la même manière. Les éléments de la structure secondaire des protéines sont présentés : les brins β par les flèches noires, les hélices α par les spirales jaunes. Par souci de place, T18 est représenté schématiquement, sa taille (à la même échelle que les dérivés) est présentée en bas de la figure.

ceux du témoin négatif (Figure II.2, colonnes 1 et 5). Ceci suggère que la région périplasmique d'OutL isolée est capable de dimériser seule.

Lorsque les fusions T18::Lpéri ou T25::Lpéri ont été exprimées seules (avec un vecteur vide), elles n'ont pas pu être détectées par Western-blot (pas montré). En revanche, lorsqu'elles ont été co-exprimées ensemble, une seule bande fine est visible avec les anticorps anti-OutL car la taille des fusions T18::Lpéri et T25::Lpéri est trop proche (Figure II.3, piste 5). Il peut s'agir ainsi de deux bandes superposées. La coexpression des fusions Cya::OutLpéri permettrait leur stabilisation comme pour les protéines entières.

OutMpéri/ OutMpéri

Ensuite, nous avons testé si la région périplasmique d'OutM interagit avec elle-même. Contrairement aux tests avec OutM entière, une interaction a été détectée entre T18::OutMpéri et T25::OutMpéri. Sur boîtes Mac Conkey, les colonies sont apparues roses. Les valeurs de l'activité β -galactosidase de ce couple sont 2,5 fois supérieures à celles du témoin négatif (Figure II.2, colonne 2). Cette interaction n'est pas très forte dans les conditions de double-hybride bactérien. Cela pourrait être probablement due à une faible quantité des fusions produites. Cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée par immunoblot à cause d'une très faible réactivité des anticorps anti-OutM dont nous disposons et qui ne donnent pas de réponse claire en dehors des protéines surproduites. Néanmoins, l'homodimérisation de la région périplasmique d'OutM suggère que la protéine entière serait aussi capable de dimériser.

II.A.2) Interactions entre les régions périplasmiques des trois protéines

Par la suite, j'ai cherché des interactions hétéroprotéiques entre les régions périplasmiques d'OutC, OutL et OutM.

OutLpéri/ OutMpéri

En double-hybride bactérien, OutLpéri interagit fortement avec OutMpéri : les valeurs de l'activité β -galactosidase du couple T18::OutLpéri/ T18::OutMpéri (1600 UA) sont presque équivalentes au témoin positif OutC/ OutC (1790 UA) (Figure II.2, colonnes 10 et 11 avec 4). La fusion T18::OutLpéri est environ 10 fois plus abondante lorsqu'elle est coexprimée avec

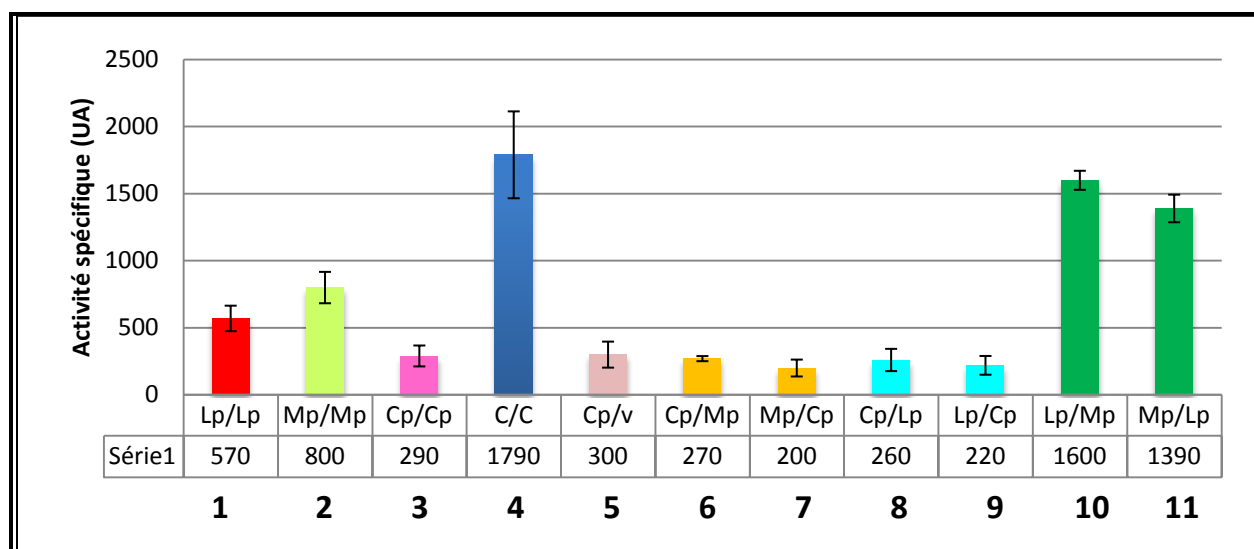


FIGURE II.2 : Analyse des interactions entre les régions périplasmiques d'OutC, M et L en double-hybride bactérien. Diagramme d'une série représentative de dosages de l'activité β -galactosidase. Pour chaque couple, plusieurs séries de transformations ont été faites, suivies de 2 à 4 séries de dosages de l'activité de la β -galactosidase. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne des mesures indépendantes d'une série de transformation.

La première lettre correspond aux fusions des régions des protéines Out correspondantes avec T18, la seconde aux fusions avec T25. Le vecteur vide est représenté par v. Seule le couple Cp/ v est présenté, les valeurs de β -galactosidase avec les autres témoins négatifs sont similaires à celle-ci. p : région périplasmique.

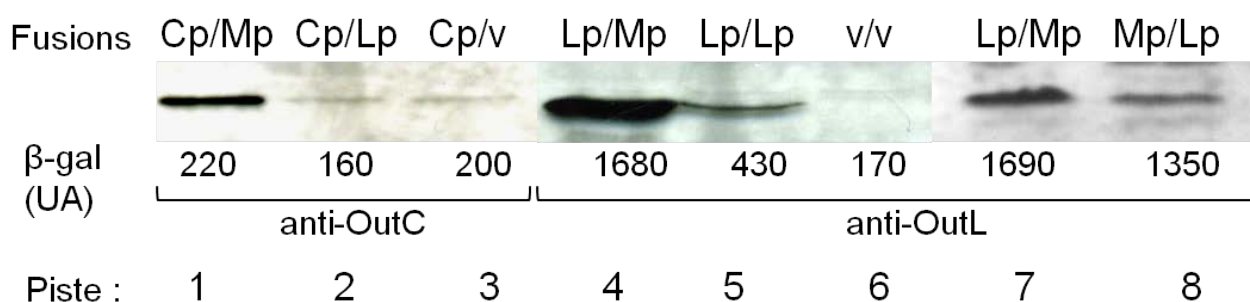


FIGURE II.3 : Expression des fusions des régions périplasmiques d'OutC, M et L en double-hybride bactérien. Les cellules *E. coli* DHP1 exprimant les combinaisons de fusions Cya::Out indiquées sur la figure ont été cultivées 20 h à 30°C puis utilisées pour les dosages de la β -galactosidase (indiqués en bas) et pour une analyse des protéines par Western-blot avec les anticorps anti-OutL et anti-OutC. Dans chaque Western-blot, une combinaison dans laquelle aucune des fusions ne réagit avec les anticorps correspondants sert de témoin négatif.

T18::OutMpéri que dans le couple OutLpéri/ OutLpéri (Figure II.3, pistes 4 et 5). Ceci montre bien le rôle protecteur d'OutMpéri vis-à-vis d'OutLpéri. Ainsi, les parties périplasmiques isolées d'OutM et OutL interagissent entre elles. Cette interaction peut éventuellement être moteur de l'interaction entre OutLΔc et la protéine entière OutM, décrite précédemment (Figure I.3).

OutCpéri/ OutMpéri et OutCpéri/ OutLpéri

Les couples OutCpéri et OutMpéri, ainsi qu'OutCpéri et OutLpéri, quelle que soit la combinaison, n'interagissent pas en DHB. Les colonies sur boîtes Mac Conkey sont blanches et les dosages de la β-galactosidase sont équivalents au témoin négatif (Figure II.2, colonnes 6 à 9 avec 5). Ces résultats sont très étonnants car de fortes interactions ont été détectées entre les protéines entières correspondantes : OutC/ OutLΔc et OutC/ OutM (Figure I.3). On peut donc suggérer que les régions périplasmiques ne sont pas directement impliquées dans ces interactions ou sont incapables d'interagir entre elles lorsqu'elles sont isolées du reste de la protéine.

De manière intéressante, bien que les valeurs de dosages soient équivalentes entre Cp/v, Cp/Lp et Cp/Mp, la quantité d'OutCpéri visible dans ces échantillons par Western-blot est très variable (Figure II.3). Alors que la quantité de T18::OutCpéri est faible en présence de T25 seul ou de T25::OutLpéri, elle est beaucoup plus importante en présence de T25::OutMpéri (Figure II.3, pistes 2 et 3 avec 1). Dans les 5 séries de transformations (dont les résultats d'une seule sont présentés), ce phénomène a été systématiquement observé. Il semble donc qu'OutMpéri ait un fort effet de protection vis-à-vis d'OutCpéri mais n'interagisse pas avec dans les conditions de DHB.

II. B) Dissection des interactions décelées avec OutLpéri et

OutMpéri : raccourcissement des régions périplasmiques

Les structures tridimensionnelles de la région périplasmique d'EpsM, un homologue d'OutM dans le T2SS de *V. cholerae*, et de PilO, un orthologue d'OutM dans le T4P de *P. aeruginosa*, ont été résolues (Abendroth *et al.*, 2004 ; Sampaleanu *et al.*, 2009). La région C-terminale de la région périplasmique de ces deux protéines possède la même organisation. Selon certains programmes d'analyse de la structure secondaire, tous les membres de la

famille GspM possèderaient les mêmes structures secondaires qu'EpsM. Cette protéine est composée d'une grande hélice α_0 qui est, la continuation de l'hélice α transmembranaire puis d'un domaine de type ferrédoxine. Ce domaine est lui-même composé d'une répétition de deux sous-domaines α - β - β , appelés α_1 - β_1 - β_2 - α_2 - β_3 - β_4 (Figure II.1). L'analyse structurale de la région périplasmique d'EpsL (homologue d'OutL dans le T2SS de *V. cholerae*) a démontré qu'elle présente une organisation similaire à celle d'EpsM. La région périplasmique d'EpsL est composée d'une hélice α_a qui est également la prolongation de l'hélice α transmembranaire, puis d'une hélice α_b et enfin d'un domaine de type ferrédoxine α_1 - β_1 - β_2 - α_2 - β_3 - β_4 similaire à celui d'EpsM (Abendroth *et al.*, 2009). La région périplasmique d'OutL est prédite par les programmes informatiques (JPred, PREDATOR) comme étant également composée de deux hélices α_a et α_b et du domaine α_1 - β_1 - β_2 - α_2 - β_3 - β_4 (Figure II.1).

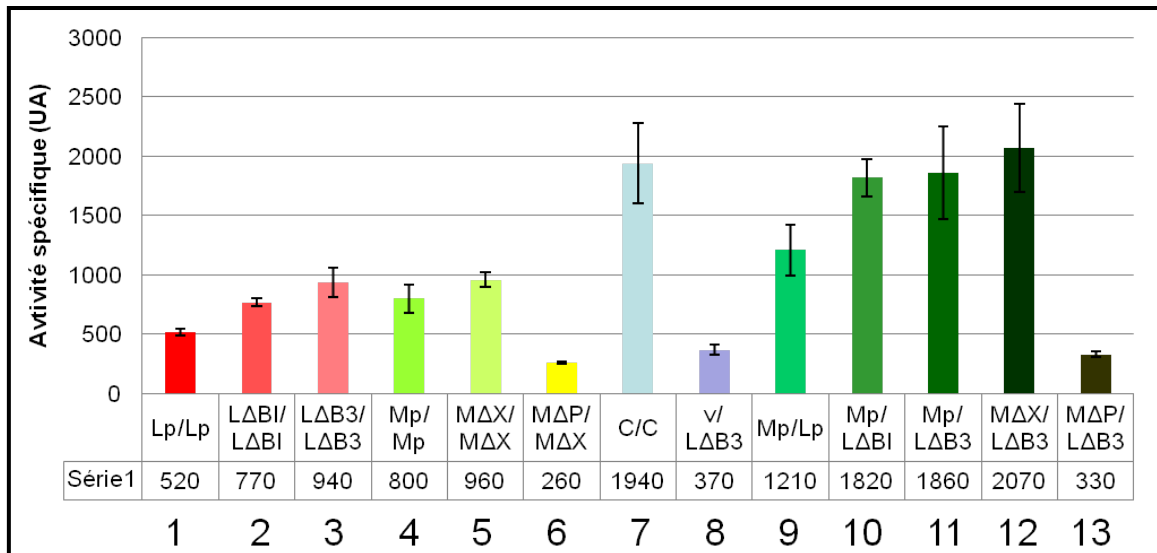
Le motif α - β - β est une permutation cyclique du modèle « ferredoxin fold » (β - α - β). Etant donné leur présence dans deux protéines, il est probable que ce domaine de type ferrédoxine ait un rôle important pour la fonctionnalité du système. En nous basant sur les données structurales disponibles sur les homologues d'OutM et d'OutL (EpsM et EpsL de *V. cholerae*, PilO de *P. aeruginosa*), nous avons construit des dérivés tronqués des régions périplasmiques de ces deux protéines afin d'identifier les courtes régions directement impliquées dans les interactions.

II.B.1) Rôle du domaine de type ferrédoxine dans les interactions d'OutL et OutM

Pour analyser quelles parties de la région périplasmique d'OutM et OutL sont impliquées dans les interactions protéine/protéine, nous avons construit les dérivés OutL Δ B1 et OutL Δ B3. La première construction OutL Δ B1 possède α_b et le domaine de type ferrédoxine (α_1 - β_1 - β_2 - α_2 - β_3 - β_4). La deuxième OutL Δ B3 ne contient plus que le domaine de type ferrédoxine (Figure II.4.B).

De la même manière que pour OutL, le dérivé OutM Δ X a été construit pour ne contenir que le domaine de type ferrédoxine. Un autre dérivé, OutM Δ P, a été construit dans lequel l'hélice α_0 et la première hélice α (α_1) du domaine de type ferrédoxine ont été délétées

A.



B.

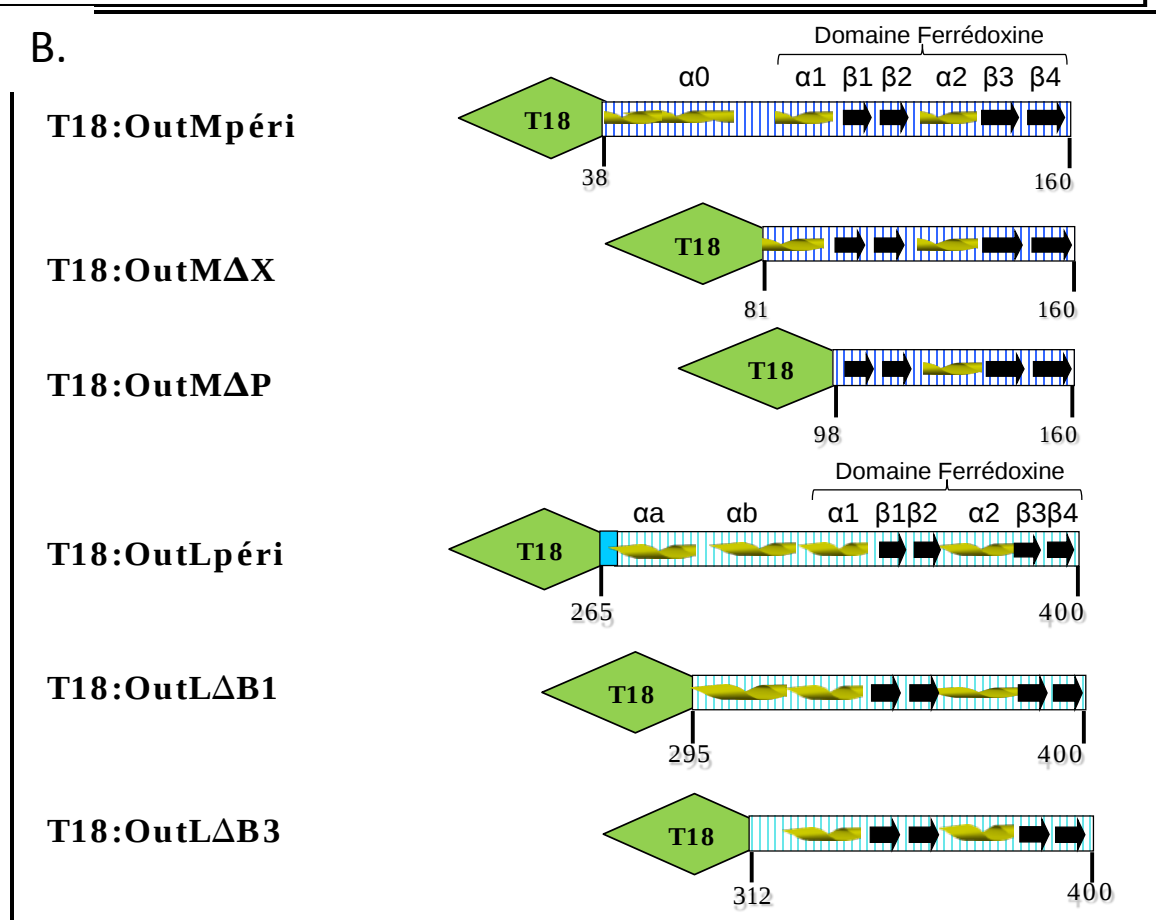


FIGURE II. 4: (A) Analyse des interactions entre les régions périplasmiques d'OutM et OutL contenant le motif de type ferrédoxine en DHB. Diagramme de séries représentatives de dosages de l'activité β -galactosidase. Pour chaque couple, plusieurs séries de transformations ont été faites, suivies de 2 à 4 séries de dosages de la β -galactosidase. Le vecteur vide est représenté par v ; le couple dans lequel il est présent est un témoin négatif. Lp/Lp signifie T18::Lp/T25::Lp et ainsi de suite pour les autres combinaisons. (B) Représentation schématique des fusions utilisées dans les tests de DHB ci-dessus.

(Figure II.4.B). Ainsi, dans OutM Δ P, seules les structures β 1- β 2- α 2- β 3- β 4 du motif de type ferrédoxine sont présentes.

Homodimérisation des versions tronquées d'OutLpéri et OutMpéri

De manière surprenante, lorsque les dérivés tronqués de la région périplasmique d'OutL ont été co-exprimés, l'activité de la β -galactosidase a augmenté dans l'ordre OutLpéri, OutL Δ B1 et OutL Δ B3 (Figure II.4.A, colonnes 1, 2 et 3). Ainsi, en enlevant successivement les parties de la région périplasmique d'OutL situées hors du domaine de type ferrédoxine, nous avons renforcé son homodimérisation. Par immunoblot, nous avons pu constater distinctement la présence des versions raccourcies d'OutL avec les anticorps anti-OutL mais seulement lorsqu'ils sont co-exprimés ensemble (Figure II.5.A). Ces résultats montrent clairement une implication directe du domaine ferrédoxine dans l'homodimérisation d'OutL.

Un phénomène similaire a été observé avec le dérivé tronqué de la région périplasmique d'OutM, OutM Δ X (Figure II.4.A, colonnes 4 et 5). La valeur de l'activité β -galactosidase du couple T18::M Δ X/ T25::M Δ X est un peu plus élevée que celle de T18::Mpéri/ T25::Mpéri. Le domaine de type ferrédoxine est donc suffisant à l'homodimérisation de la région périplasmique d'OutM.

Dans le but de préciser davantage la région responsable de l'interaction protéine/protéine, nous avons testé l'homodimérisation du dérivé dépourvu de la première hélice α du domaine de type ferrédoxine OutM Δ P. Seule la fusion T18::M Δ P a été construite, c'est donc la fusion T25::M Δ X qui a été testée avec. La valeur de l'activité β -galactosidase est égale au témoin négatif (Figure II.4.A, colonne 6). Le manque de réponse des anticorps anti-OutM nous empêche de vérifier si ce résultat négatif est dû à une absence d'interaction ou à une instabilité de cette construction T18::M Δ P qui serait ainsi dégradée. Les deux hypothèses sont tout à fait concevables, car en enlevant la première hélice du motif de type ferrédoxine, nous risquons d'affecter le repliement de la protéine et donc favoriser sa dégradation et/ou empêcher l'interaction avec d'autres protéines.

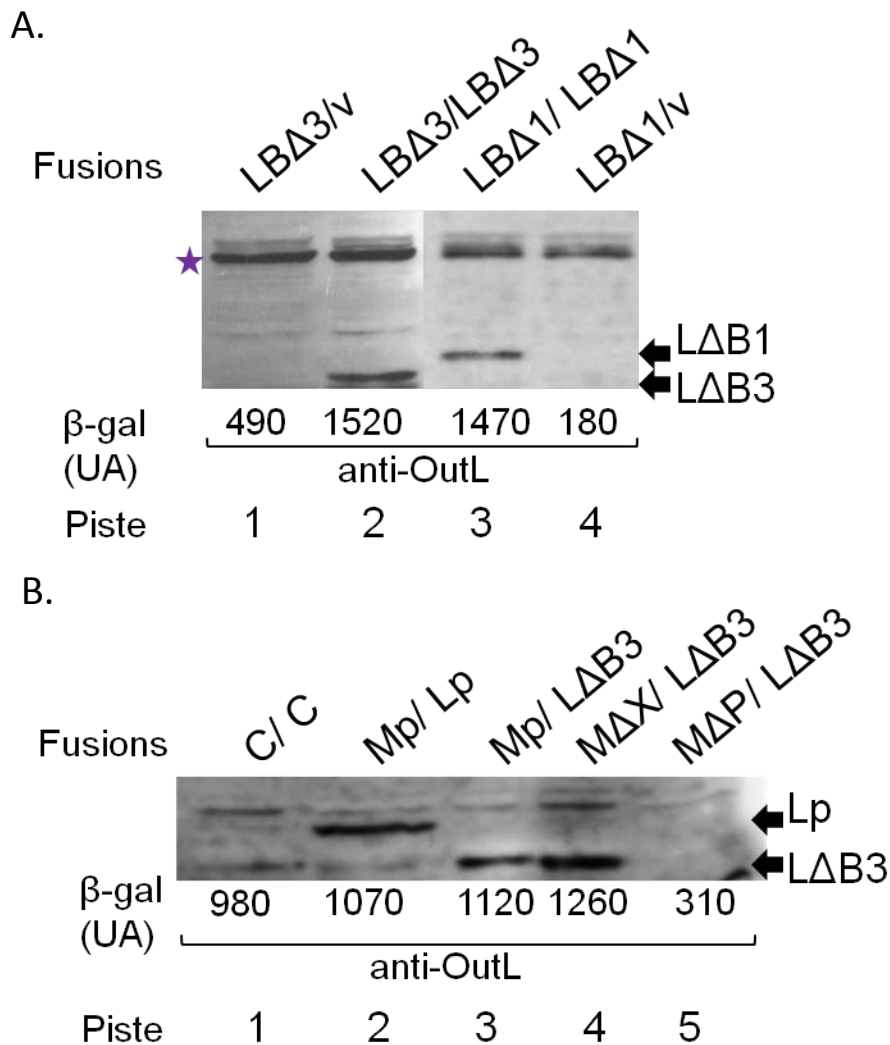


FIGURE II.5 : Expression des fusions des dérivés d'OutM et OutL en double-hybride bactérien. Les cellules *E. coli* DHP1 exprimant les combinaisons de fusions Cya::Out indiquées sur la figure ont été cultivées 20 h à 30°C puis utilisées pour les dosages de la β -galactosidase (indiqués en bas) et pour une analyse des protéines par Western-blot avec les anticorps anti-OutL. (A) Quantité des dérivés d'OutL quand co-exprimés ensemble. L'étoile indique des protéines aspécifiques. (B) Quantité des dérivés d'OutL quand co-exprimés avec les dérivés d'OutM Le premier terme correspond aux fusions des dérivés d'OutL ou d'OutM avec T18, la seconde aux fusions des dérivés d'OutL avec T25. La combinaison dans laquelle aucune des fusions ne réagit avec les anticorps correspondants (ici C/C) sert de témoin négatif.

Interaction entre les versions tronquées d'OutLpéri et OutMpéri

Ensuite, nous avons voulu préciser les parties des régions périplasmiques d'OutL et OutM impliquées dans l'interaction OutLpéri/ OutMpéri en utilisant les dérivés tronqués de ces protéines.

En comparaison avec l'interaction T18::Mpéri/ T25::Lpéri, les couples T18::Mpéri/ T25::LΔB1 et T18::Mpéri/ T25::LΔB3 donnent une activité β-galactosidase plus élevée (Figure II.4.A, colonnes 10 et 11 avec 9). L'activité de la β-galactosidase avec les deux derniers couples atteint le maximum observé dans les tests de DHB. Le même phénomène a été observé quand ces dérivés tronqués ont été combinés dans le sens inverse. Pour une question de clarté, ces résultats n'ont pas été présentés. Nous pouvons donc en conclure que la version la plus courte d'OutL, OutLΔB3, qui ne contient que le domaine de type ferrédoxine (aa 312-400), contient les résidus suffisants à l'interaction avec OutMpéri.

Nous avons ensuite testé le couple T18::MΔX/ T25::LΔB3, uniquement constitué des domaines de type ferrédoxine de chaque protéine. Les valeurs de l'activité β-galactosidase de T18::MΔX/ T25::LΔB3 sont légèrement supérieures à T18::Mpéri/ T25::LΔB3 (Figure II.4.A, colonne 12). Nous pouvons en conclure que l'homodimérisation d'OutMpéri et d'OutLpéri ainsi que l'interaction entre elles interviennent grâce au domaine de type ferrédoxine.

Lorsque le domaine de type ferrédoxine d'OutM a été partiellement tronqué (OutMΔP), aucune interaction avec OutL n'a pu être détectée (Figure II.4.A, colonne 13). Ceci indique que l'intégrité du domaine ferrédoxine est important pour l'interaction des régions périplasmiques d'OutL et OutM. Cependant, comme précédemment avec le couple T18::MΔP/ T25::MΔX, nous ne pouvons pas vérifier la présence de la version tronquée d'OutM par Western-blot. Il est intéressant de remarquer que la construction T25::LΔB3 n'a pas été détectée quand elle a été coexprimée avec la construction T18::MΔP (Figure II.5.B, piste 5). Ce résultat est cohérent avec la faible valeur de β-galactosidase observée avec ce couple et indique qu'OutMΔP ne stabilise pas ce dérivé d'OutL.

En revanche, co-exprimés avec les autres dérivés d'OutM, les dérivés d'OutL apparaissent en quantité à peu près équivalente dans les trois couples T18::Mpéri/ T25::Lpéri, T18::Mpéri/ T25::LΔB3 et T18::MΔX/ T25::LΔB3 (Figure II.5.B, piste 4). Par contre, exprimés seuls (avec le vecteur vide), les dérivés d'OutL ne sont pas visibles, car probablement dégradés

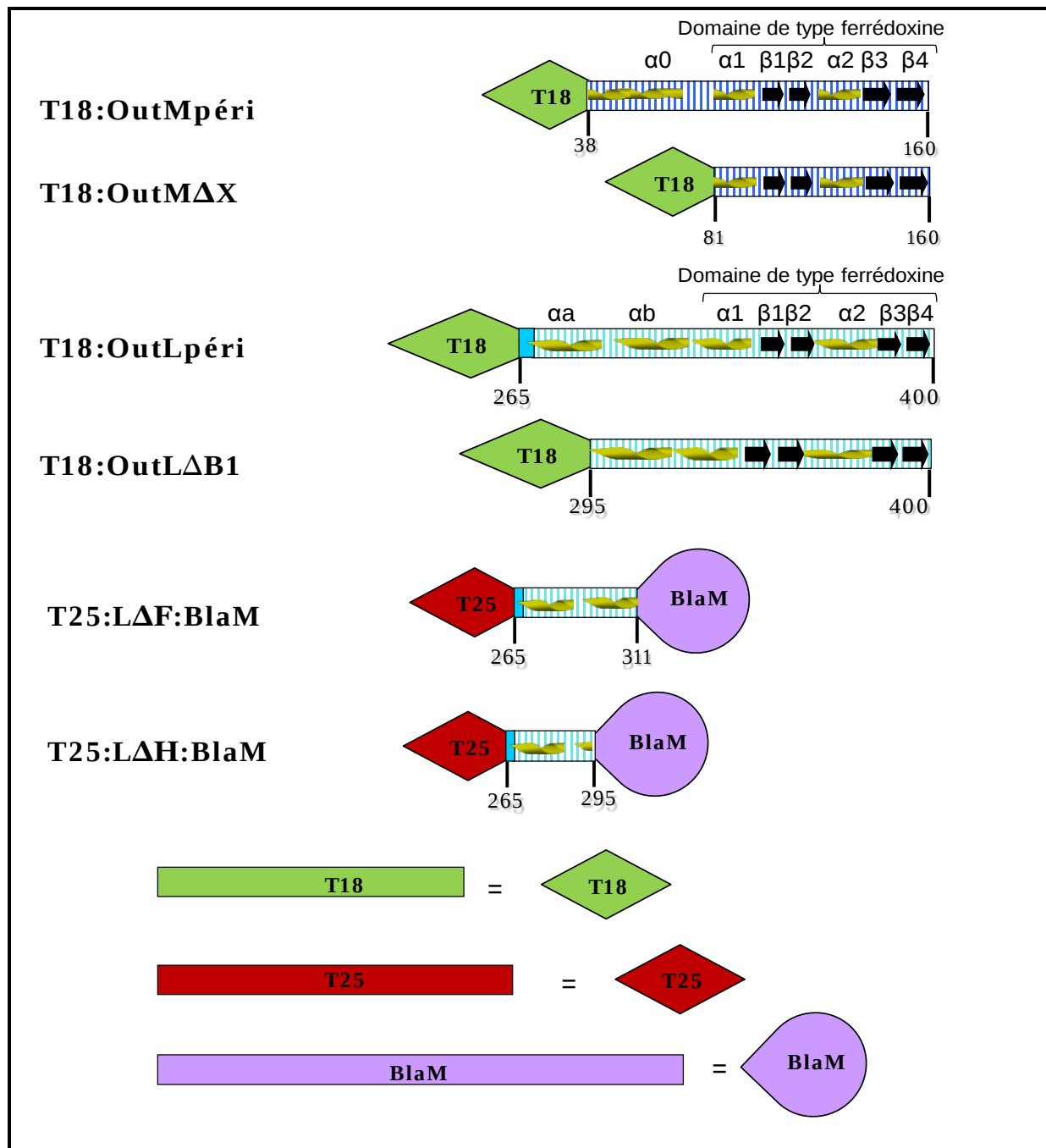


FIGURE II.6 : Représentation schématique des fusions de T18 avec OutM et OutL et de leurs dérivés, construits pour le double-hybride bactérien et analysées dans le chapitre II.B.2. Les éléments de la structure secondaire des protéines sont présentés : les brins β par les flèches noires, les hélices α par les spirales jaunes. Par souci de place, T18, T25 et BlaM sont représentés schématiquement, leur taille (à la même échelle que les dérivés) est présentée en bas de la figure.

(Figure II.5.A, pistes 1 et 4). Le dérivé d'OutL contenant uniquement le domaine de type ferrédoxine, T25::L Δ B3, est donc stabilisé par la région d'OutM contenant le domaine de type ferrédoxine (Figure II.5.B, pistes 2, 3 et 4). Ainsi, une stabilisation mutuelle des dérivés périsplasmiques d'OutL et OutM est fortement corrélée avec les valeurs de β -galactosidase observées.

Les constructions Cya::L Δ B3 ont également été coexprimées avec Cya::Cpéri (non montré). Les activités de la β -galactosidase observées avec ces couples étaient négatives, comme avec la région périsplasmique entière d'OutL combiné avec OutCpéri (Figure II.2), suggérant l'absence d'interaction entre le domaine ferrédoxine d'OutL et la région périsplasmique isolée d'OutC.

II. B.2) Etude de la courte partie de la région périsplasmique d'OutL dépourvue du domaine de type ferrédoxine

Bien que les expériences décrites ci-dessus démontrent clairement que le domaine de type ferrédoxine conduit l'homo- et l'hétérodimérisation des régions périsplasmiques d'OutL et OutM en DHB (chapitre II.B.1), nous avons voulu savoir si la partie de la région périsplasmique précédant ce domaine n'avait pas un rôle dans les interactions. En effet, une précédente étude a suggéré que cette partie d'EpsL (homologue d'OutL chez *V. cholerae*) serait impliquée dans l'interaction avec EpsM (Sandkvist *et al.*, 2000). De plus, une étude structurale récente de PilO, l'orthologue d'OutM dans les pili de type IV, a suggéré une implication de cette région dans l'homodimérisation de cette protéine et de PilN (Sampaleanu *et al.*, 2009). PilN est l'orthologue d'OutL Δ cyt, c'est-à-dire du TMS et de la région périsplasmique d'OutL. La protéine PilM est l'orthologue de la région cytoplasmique d'OutL. Nous avons donc construit des fusions de Cya avec des dérivés de la courte partie de la région périsplasmique d'OutL précédant le domaine de type ferrédoxine.

Les deux fusions utilisées sont T25::L Δ F:BlaM et T25::L Δ H:BlaM (Figure II.6). Les lettres Δ F signifient délétée du domaine de type Ferrédoxine et Δ H délétée de l'Hélice α + domaine de type ferrédoxine. Les fragments d'OutL restants étant très courts, la protéine BlaM leur a été fusionnée en C-terminal. Elle permettrait de mimer la présence stérique du domaine de type ferrédoxine mais elle permet surtout de contrôler la présence de ces fusions

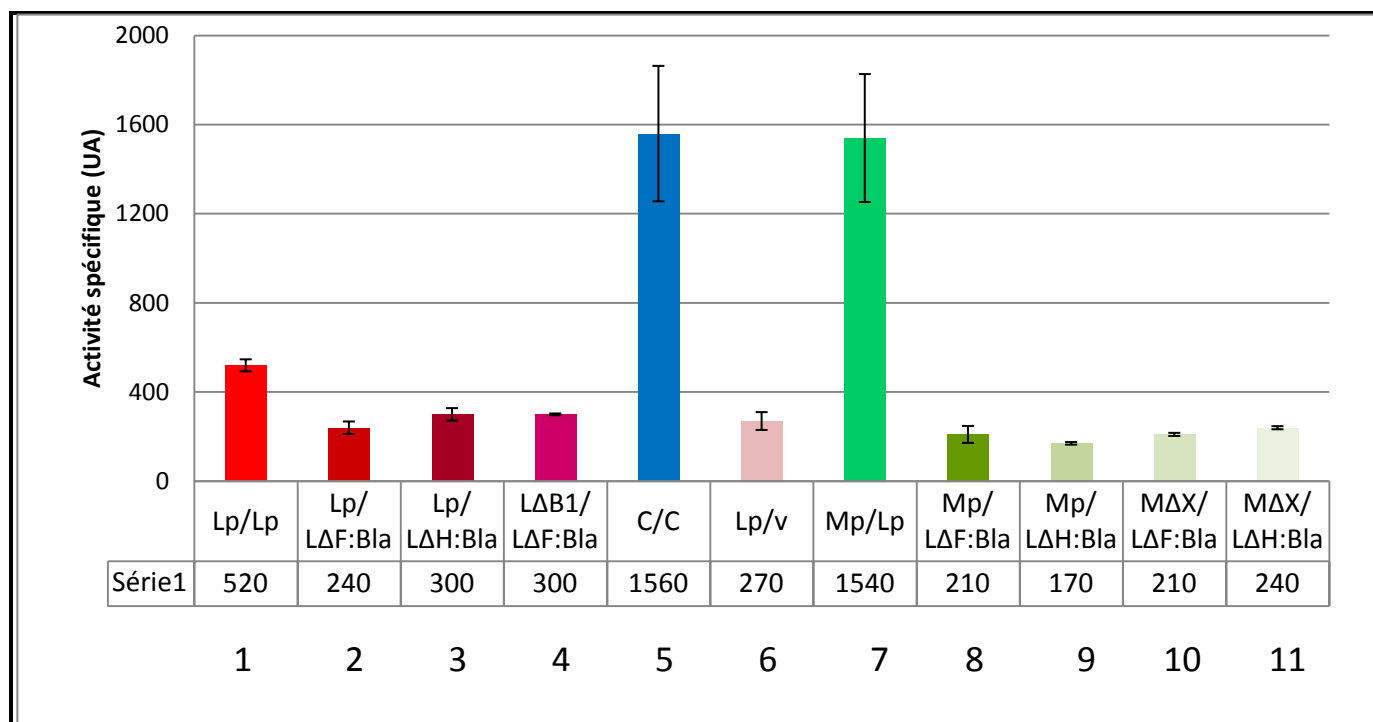


FIGURE II.7 : Analyse des régions périplasmiques tronquées d'OutL et d'OutM en double-hybride bactérien. Diagramme de séries représentatives de dosages de l'activité β -galactosidase. Pour chaque couple, plusieurs séries de transformations ont été faites, suivies de deux à quatre séries de dosages de la β -galactosidase. Le vecteur vide est représenté par v. Le couple dans lequel il est présent est un témoin négatif. Lp/Lp signifie T18::Lpéri/T25::Lpéri et ainsi de suite pour les autres combinaisons.

en les visualisant grâce aux anticorps anti-BlaM (les caractéristiques de cette protéine seront développées dans le chapitre III).

Cette région d'OutL peut-elle dimériser en DHB ?

La fusion de ces petites régions périplasmiques d'OutL n'a été faite qu'avec T25. Pour tester leur capacité à dimériser dans le DHB, chacun de ces dérivés a été coexprimé avec la fusion T18::Lpéri dans la souche *E. coli cya⁻* DHP1. Les fusions T18::Lpéri, T25::LΔF::BlaM et T25::LΔH::BlaM ne possèdent pas de TMS. Les interactions potentielles interviendraient donc dans le cytoplasme.

Les dosages de l'activité de la β-galactosidase avec les deux couples comportant la fusion T25::LΔF::BlaM ou T25::LΔH::BlaM ont montré une activité égale au témoin négatif (Figure II.7, colonnes 2, 3 avec 6). On peut donc en conclure que cette courte région périplasmique d'OutL précédant le domaine de type ferrédoxine n'est pas le moteur de l'homodimérisation de la partie périplasmique d'OutL.

Dans le même temps, comme le domaine de type ferrédoxine seul avait renforcé l'homodimérisation d'OutLpéri, nous avons voulu vérifier si une interaction pouvait être détectée entre ce domaine et la courte région le précédant. Le couple T18::LΔB1/T25::LΔF::BlaM n'a provoqué que l'activité de base de la β-galactosidase (Figure II.7, colonne 4). Ces deux dérivés n'ont en commun que l'hélice αb. Il n'y aurait pas d'interaction entre le début de la région périplasmique d'OutL et la région C-terminale comportant le domaine de type ferrédoxine.

De plus, les fusions T25::LΔF::BlaM et T25::LΔH::BlaM n'ont pas été visibles par Western-blot avec les anticorps anti-BlaM lorsque T18::Lpéri ou T18::LΔB1 ont été coexprimées avec (Figure II.8.A, pistes 4, 5 et 6). Les dérivés d'OutLpéri n'ont également pas été visibles avec les anticorps anti-OutL (Figure II.8.B, pistes 3, 5 et 6). Cette courte région d'OutL n'est donc pas suffisante à la stabilisation d'OutLpéri, confirmant indirectement l'absence d'interaction avec elle-même.

Interaction entre OutLΔF::BlaM ou OutLΔH::BlaM et OutMpéri

De même, les dérivés portant la courte partie de la région d'OutLpéri située entre le TMS et le domaine de type ferrédoxine ont été testés avec les dérivés périplasmiques d'OutM.

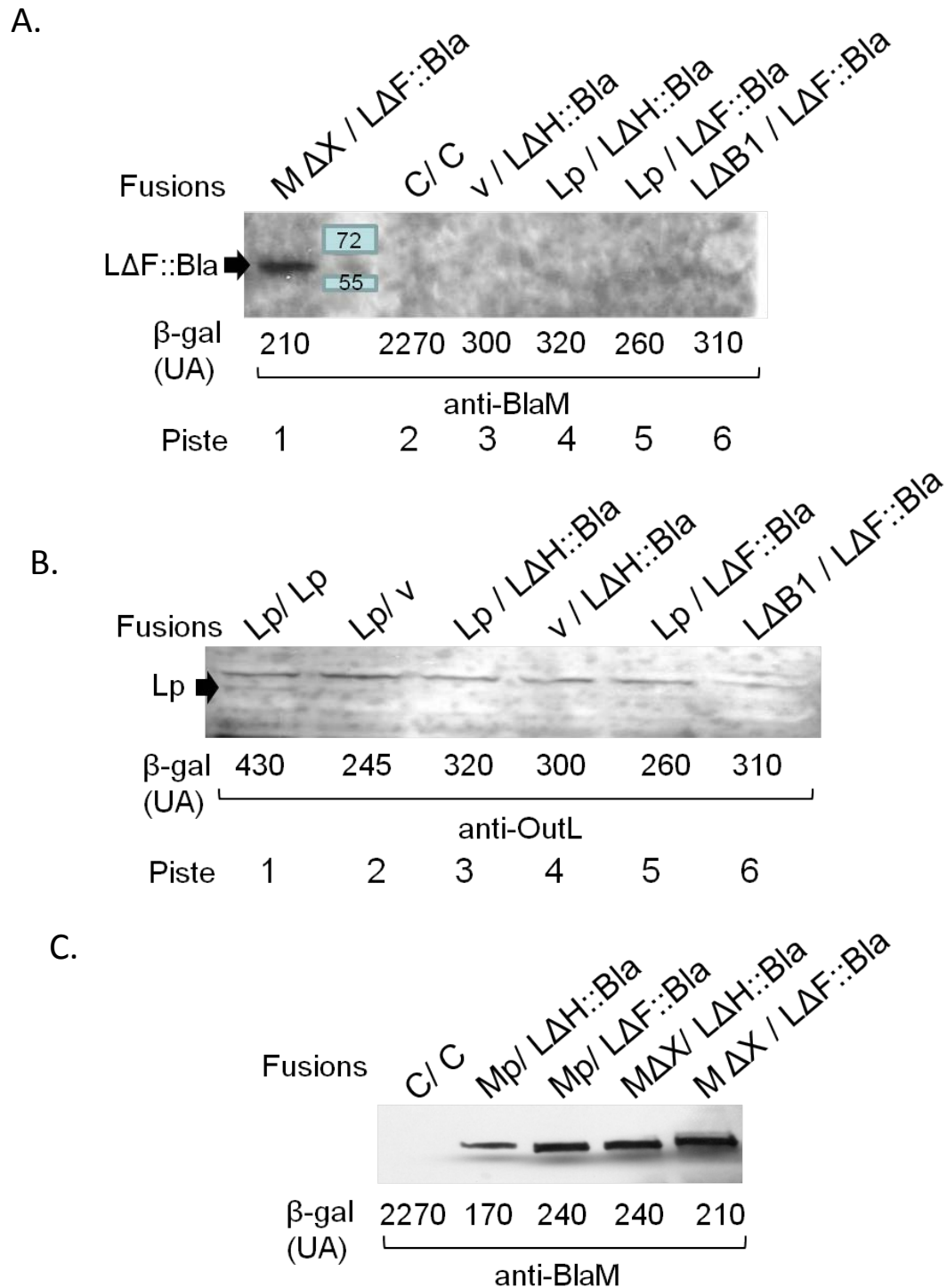


FIGURE II.8 : Expression des fusions des dérivés d'OutL (A et B) et OutL et OutM (C) en double-hybride bactérien. Les cellules *E. coli* DHP1 exprimant les combinaisons de fusions Cya::Out indiquées sur la figure ont été cultivées 20 h à 30°C puis utilisées pour les dosages de la β -galactosidase (indiqués en bas) et pour une analyse des protéines par Western-blot avec les anticorps anti-BlaM ou anti-OutL. Le premier terme correspond aux fusions des dérivés d'OutL ou d'OutM avec T18, la seconde aux fusions des dérivés d'OutL avec T25. Dans chaque Western-blot, une combinaison dans laquelle aucune des fusions ne réagit avec les anticorps correspondants sert de témoin négatif.

Lorsque T25::LΔF:BlaM ou T25::LΔH:BlaM est co-exprimé avec T18::Mpéri, des valeurs d'activité de la β-galactosidase très faibles, égales à celle du témoin négatif ont été mesurées (Figure II.7, colonnes 8 et 9). Selon la même logique que pour l'homodimérisation d'OutL, nous avons voulu vérifier si une interaction ne pouvait pas être détectée avec le domaine de type ferrédoxine d'OutM seul. Les activités des couples T18::MΔX/ T25::LΔF:BlaM et T18::MΔX/ T25::LΔH:BlaM sont également équivalentes à celle du témoin négatif (Figure II.7, colonnes 10 et 11).

Pourtant, T25::LΔF:BlaM et T25::LΔH:BlaM ont toutes les deux été bien visibles sur WB avec les anticorps anti-BlaM, et ce, qu'en présence de T18::Mpéri et T18::MΔX (Figure II.8.A, piste 1 ; Figure II.8.C). Alors que ni ces triples fusions, ni T18::Lpéri n'ont été détectées lorsqu'elles ont été coexprimées ensemble (Figure II.8.A et B), il semble que la présence du domaine de type ferrédoxine d'OutM stabilise les triples fusions T25::LΔF:BlaM et T25::LΔH:BlaM. Nous avons donc ici un autre exemple de protection mutuelle de deux partenaires dans les tests de DHB sans qu'il y ait interaction entre les deux protéines (l'autre exemple est le couple OutCpéri/ OutMpéri) (Figure II.3).

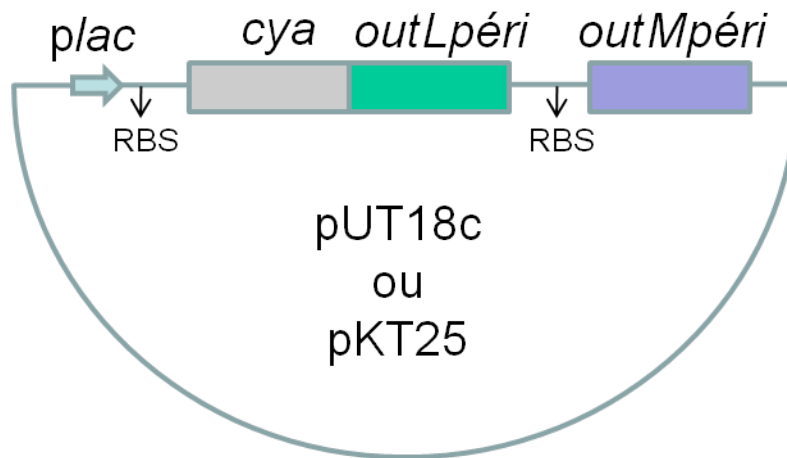
Pour résumer, dans OutLpéri comme dans OutMpéri, il semble que seuls les domaines de type ferrédoxine composés des structures secondaires α1-β1-β2-α2-β3-β4 aient un rôle dans l'homodimérisation et l'interaction entre les régions périplasmiques de ces deux protéines.

II.C) Etude de la compatibilité des interactions entre les régions périplasmiques d'OutL et OutM

Le but de cette étude est de déterminer si les interactions entre les régions périplasmiques d'OutL et d'OutM, et plus précisément entre les domaines de type ferrédoxine de ces protéines, sont compatibles entre elles. En effet, les études précédentes et notamment les études structurales des homologues d'OutL et d'OutM sont plutôt contradictoires.

L'analyse structurale et fonctionnelle d'EpsL et EpsM (GspL et GspM chez *V. cholerae*) suggère que deux sites distincts sur chaque protéine sont impliqués dans l'homo- et l'hétérodimérisation (voir aussi Introduction bibliographique III.B.3.4). Les interfaces des

A.



B.

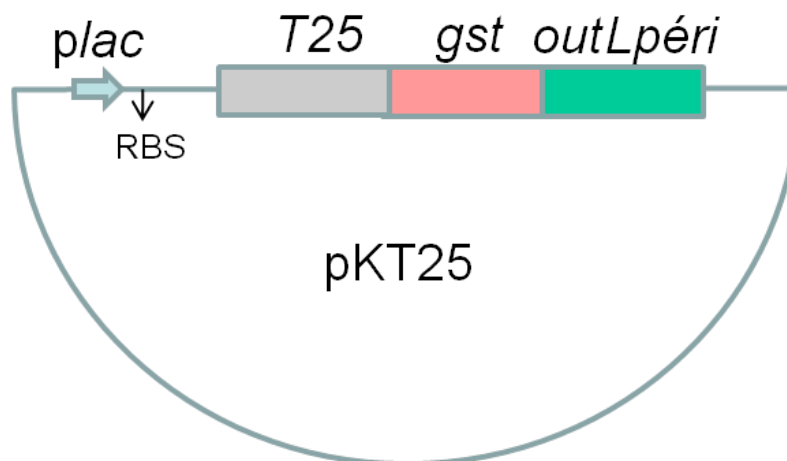


FIGURE II.9 : Représentation schématique des constructions de (A) la fusion Cya::OutLpéri co-exprimée avec OutMpéri à partir du même vecteur et (B) la triple fusion T25::GST::OutLpéri. Les gènes sont sous le contrôle du promoteur *plac*. RBS : site de fixation du ribosome (ribosome binding site).

dimères d'OutLpéri et d'OutMpéri sont formées par des éléments structuraux différents ({hélice $\alpha 1$ et brin βA } et hélice $\alpha 2$ respectivement). Une étude structurale plus récente des orthologues d'OutL Δ cyt et OutM dans les pili de type IV (T4P), PilN et PilO, a suggéré que l'homodimérisation des régions périplasmiques des deux protéines est conduite par le même mécanisme. L'interface du dimère de PilO est formée par l'hélice $\alpha 2$ et par le feuillet $\beta 4$ (qui correspond à $\beta 3$ dans GspM) et les auteurs suggèrent que l'interface du dimère de PilN et du dimère PilO/PilN soit formée par les mêmes éléments structuraux (Sampaleanu *et al.*, 2009).

II.C. 1) Mise au point d'un triple-hybride bactérien

Pour répondre à ces questions, j'ai employé plusieurs approches. La première a été la mise au point de la technique du triple-hybride bactérien pour l'étude de l'effet d'un troisième partenaire. La présence d'un troisième partenaire pourrait influencer (augmenter ou diminuer) les interactions bi-partenaires détectées en double-hybride. Nous avons co-exprimé OutMpéri avec T18::OutLpéri ou avec T25::OutLpéri à partir du même vecteur (Figure II.9.A). Ceci nous a permis d'analyser l'effet de la présence d'OutMpéri sur les interactions T18::Lpéri/ T25::Lpéri et T18::Mpéri/ T25::Lpéri (ou l'inverse).

Les expériences de double-hybride ont montré que l'activité de la β -galactosidase dans les couples à trois partenaires, T18::Lpéri-Mpéri/ T25::Lpéri (LpMp/Mp sur la figure II.10, colonne 7) et T18::Lpéri/ T25::Lpéri-Mpéri (Lp/LpMp sur la figure II.10, colonne 8), est plus faible que dans le couple à deux partenaires T18::Mpéri/ T25::Lpéri (Mp/Lp sur la figure II.10, colonne 9). Cette première constatation suggère fortement qu'il y a compétition entre OutMpéri et Cya::OutMpéri pour interagir avec Cya::OutLpéri.

Nous n'avons pas observé d'augmentation de l'activité β -galactosidase avec les autres couples à trois partenaires dans lesquels l'homodimérisation d'OutLpéri a été étudiée en présence d'OutMpéri (LpMp/Lp, Lp/LpMp et LpMp/ LpMp dans la figure II.10, colonnes 1, 2 et 3) par rapport à T18::Lpéri/ T25::Lpéri (Lp/Lp, colonne 4). Au contraire, l'activité β -galactosidase causée par l'homodimérisation des régions périplasmiques d'OutL semble diminuer en présence du troisième partenaire OutMpéri. Il semble donc qu'il y ait une compétition entre l'homodimérisation d'OutLpéri et l'interaction entre OutLpéri et OutMpéri.

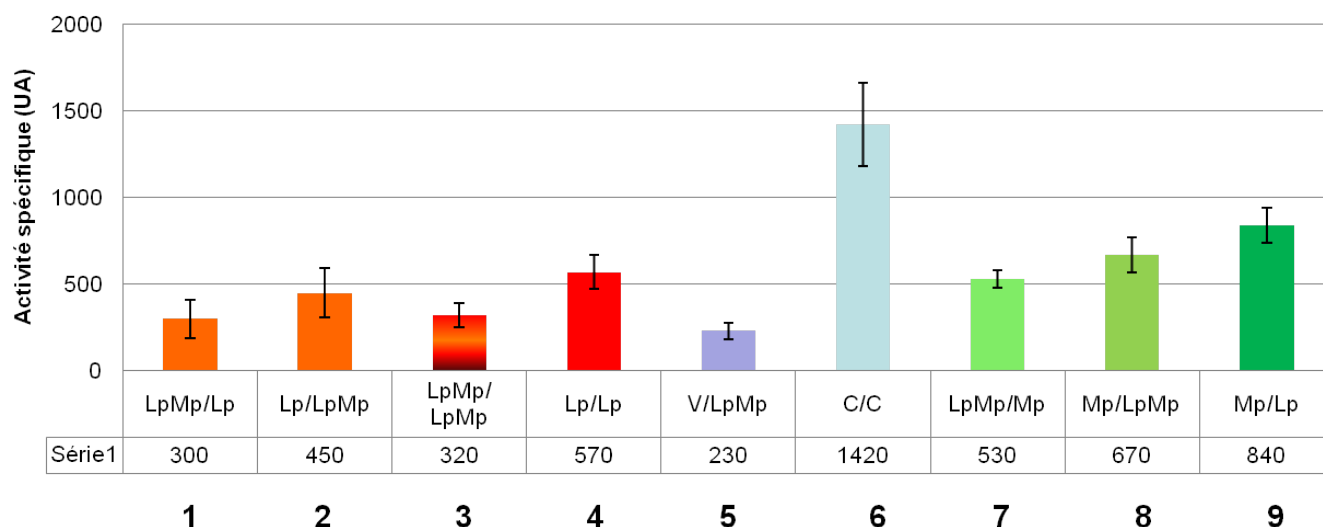


FIGURE II.10 : Analyse des interactions entre les régions périplasmiques d'OutL et OutM en triple-hybride bactérien. Diagramme d'une série représentative de dosages de l'activité β -galactosidase. Pour chaque couple, plusieurs séries de transformations ont été faites, suivies de 2 à 4 séries de dosages de l'activité β -galactosidase. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne des mesures indépendantes d'une série de transformation. Les premiers termes des couples correspondent aux fusions avec T18, les seconds aux fusions avec T25. La seconde partie du premier ou du deuxième terme n'est pas fusionné. Le vecteur vide est représenté par V.

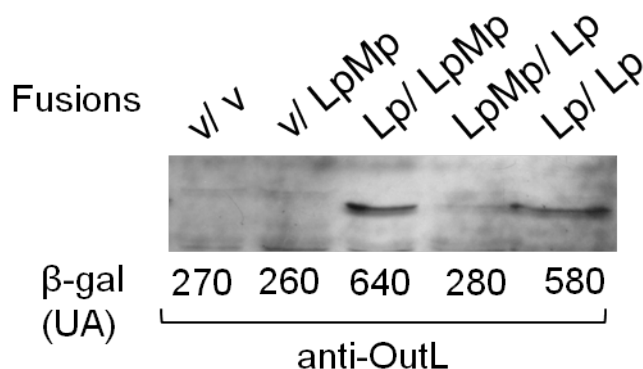


FIGURE II.11 : Expression des fusions Cya::OutLpéri + OutMpéri en triple-hybride bactérien. Les cellules *E. coli* DHP1 exprimant les combinaisons de fusions Cya::Out indiquées sur la figure ont été cultivées 20h à 30°C puis utilisées pour les dosages de la β -galactosidase indiqués en bas et pour une analyse des protéines par Western-blot avec les anticorps anti-OutL. Dans chaque Western-blot, un échantillon de cellules transformées par des plasmides ne codant pas pour la protéine reconnue par les anticorps associés sert de témoin négatif. p : région périplasmique.

Nous avons aussi émis l'hypothèse qu'OutMpéri co-exprimée avec Cya::OutLpéri à partir du même vecteur pourrait protéger OutLpéri de la dégradation. Or, la quantité de Cya::OutLpéri observée avec ou sans OutMpéri ne varie pas (Figure II.11). Ceci est étonnant puisque la coexpression de Cya::OutLpéri et Cya::OutMpéri avait fait fortement augmenter la quantité de Cya::OutLpéri (Figure II.3).

En conclusion, ces expériences de triple-hybride indiquent que bien que la coexpression d'OutMpéri n'affecte pas la quantité de Cya::OutLpéri, la présence d'OutMpéri diminue l'efficacité de l'homodimérisation OutLpéri/ OutLpéri. Les deux interactions, OutLpéri/ OutLpéri et OutLpéri/ OutMpéri semblent donc être peu compatibles dans ces conditions.

II.C.2) Triple fusion avec la GST

Les résultats acquis par triple-hybride bactérien sur l'homodimérisation d'OutLpéri et l'interaction OutLpéri/ OutMpéri suggèrent que ces deux interactions sont peu compatibles ou même incompatibles. Afin d'étayer ces résultats, nous avons mis en œuvre une deuxième approche. Nous avons voulu examiner si l'homodimérisation d'OutLpéri avait une incidence sur l'interaction OutLpéri/ OutMpéri. Nous avons construit une triple fusion T25::GST::OutLpéri (Figure II.9.B). La GST forme des dimères stables et peut renforcer la dimérisation des protéines fusionnées avec elle (McTigue *et al.*, 1995). Nous avons utilisé cette propriété pour favoriser la dimérisation d'OutLpéri au sein de cette triple fusion.

Les tests de double-hybride bactérien avec cette triple fusion montrent que l'activité β -galactosidase observée avec le couple T18::OutLpéri/ T25::GST::OutLpéri est similaire à celle du couple T18::OutLpéri/ T25::OutLpéri (Figure II.12, colonnes 1 et 2). Il semble donc que la présence de GST n'affecte pas l'interaction de la région périplasmique d'OutL avec elle-même. De plus, la quantité de T18::OutLpéri est très largement augmentée en présence de T25::GST::OutLpéri et *vice versa* (Figure II.13). T25::GST::OutLpéri en face du vecteur vide n'est pas détectable car probablement dégradée. T18::OutLpéri et T25::GST::OutLpéri s'apportent donc une protection mutuelle.

En testant le couple T18::OutMpéri/ T25::GST::OutLpéri, nous avons voulu voir si l'homodimérisation forcée d'OutLpéri affecte son interaction avec OutMpéri. L'activité de la

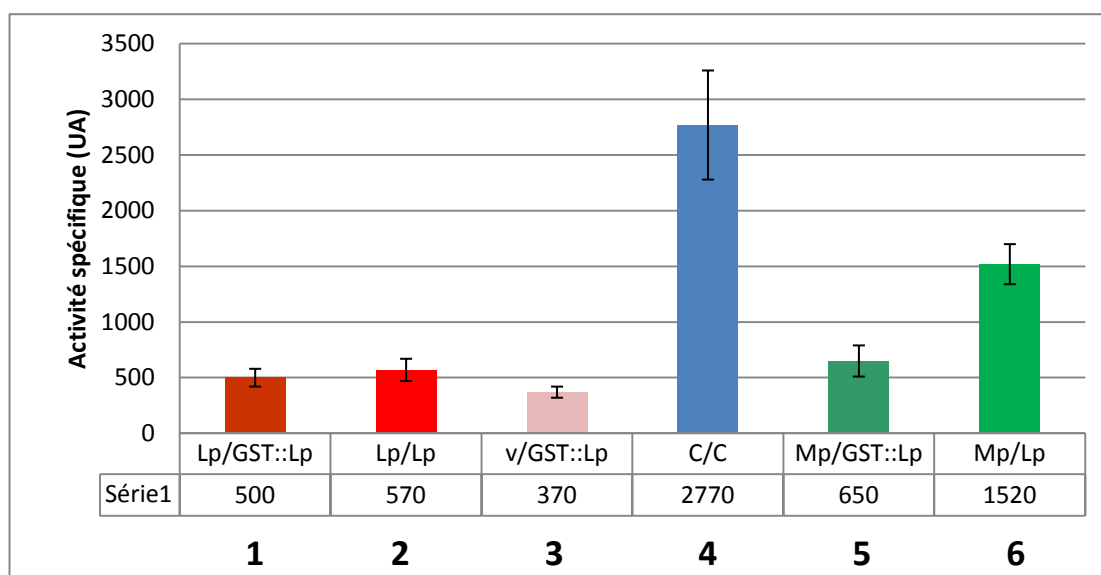


FIGURE II.12 : Analyse des interactions des régions périplasmiques d'OutL et OutM avec la triple fusion T25::GST::OutLpéri en double-hybride bactérien. Diagramme d'une série représentative de dosages de l'activité β -galactosidase. Pour chaque couple, plusieurs séries de transformations ont été faites, suivies de 2 à 4 séries de dosages de l'activité β -galactosidase. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne des mesures indépendantes d'une série de transformation. Les premiers termes des couples correspondent aux fusions avec T18, les seconds aux fusions avec T25. Le vecteur vide est représenté par V.

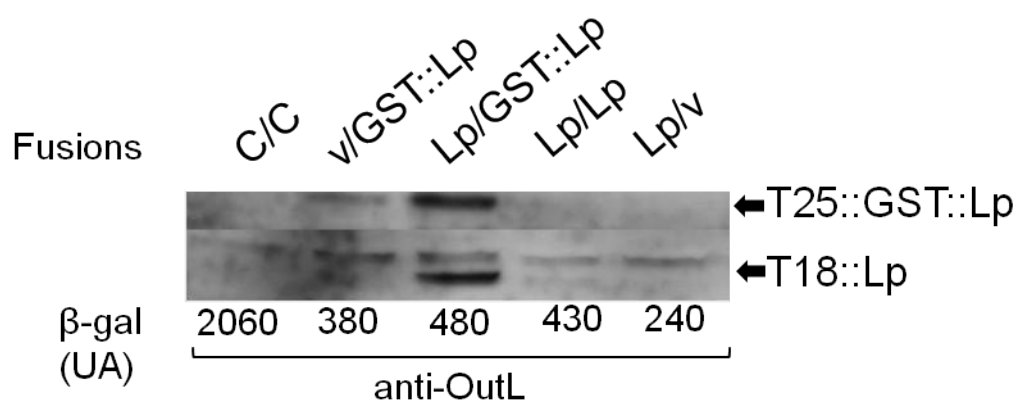


FIGURE II.13 : Expression de la fusion T25::GST::OutLpéri en double-hybride bactérien. Les cellules *E. coli* DHP1 exprimant les combinaisons de fusions Cya::Out indiquées sur la figure ont été cultivées 20h à 30°C puis utilisées pour les dosages de la β -galactosidase indiqués en bas et pour une analyse des protéines par Western-blot avec les anticorps anti-OutL. Dans chaque Western-blot, un échantillon de cellules transformées par des plasmides ne codant pas pour la protéine reconnue par les anticorps associés sert de témoin négatif. p : région périplasmique. V : vecteur vide.

β -galactosidase observée avec T18::OutMpéri/ T25::GST::OutLpéri est deux fois inférieure à celle de T18::OutMpéri/ T25::OutLpéri (Figure II.12, colonnes 5 et 6).

En conclusion, la triple fusion T25::GST::OutLpéri permettrait de former un homodimère forcé d'OutLpéri grâce à la dimérisation de la GST. Nous avons pu voir en double-hybride bactérien que l'interaction entre les régions périplasmiques d'OutL et OutM diminue fortement probablement à cause de cette homodimérisation. L'ensemble des expériences de triple-hybride et de double-hybride avec cette triple fusion suggèrent fortement que l'homodimérisation d'OutLpéri est peu ou pas compatible avec son interaction avec OutMpéri. Il se peut que l'homodimérisation de la région périplasmique d'OutL (et d'OutM) provoque des changements conformationnels qui empêchent l'interaction OutLpéri/ OutMpéri. Il est aussi probable que l'homo et l'hétérodimérisation des régions périplasmiques d'OutL et OutM impliquent les mêmes sites ou des sites très proches et ne pourraient pas intervenir en même temps. Ces résultats sont donc plutôt en faveur du modèle PilO/PilN dans lesquels les mêmes éléments de la structure secondaire de ces protéines seraient impliqués dans la formation de l'interface des homo- et hétérodimères (Sampaleanu *et al.*, 2009).

II.C.3) Etude de l'homodimérisation d'OutM dans un mutant outM d'E. chrysanthemi

En parallèle de ces travaux, nous avons voulu tester l'interface de dimérisation de la région périplasmique d'OutM *in vivo* par la technique de « cystein-bonding » *in vivo*. Les résidus situés à l'interface supposée de dimérisation sont substitués par une cystéine. La formation d'un pont disulfure *in vivo* indique la proximité des résidus substitués. La fonctionnalité d'un tel dimère covalent *in vivo* va signifier que i) la dimérisation d'OutMpéri est bien tolérée et ii) que l'interaction entre OutMpéri et OutLpéri n'intervient pas sur le même site qu'OutMpéri/ OutMpéri. Par contre, une fonction altérée (voire l'absence de fonctionnalité) va signifier que la dimérisation d'OutMpéri n'est pas tolérée *in vivo* parce qu'OutMpéri ne reste pas dimérique en permanence et/ ou le même site est utilisé pour l'interaction avec OutLpéri. Nous nous sommes appuyés sur les données structurales disponibles de l'homologue d'OutM, EpsM (Abendroth *et al.*, 2004) et celles de l'orthologue d'OutM, PilO (Sampaleanu *et al.*, 2009).

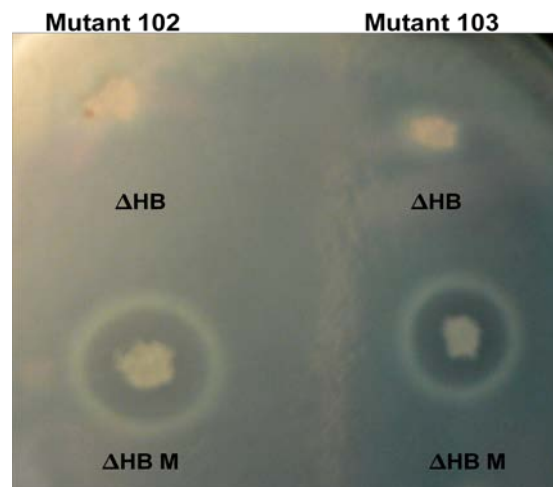


FIGURE II.14 : Complémentation des mutants d'*E. chrysanthemi* $\Delta outM$ 102 et 103 obtenus par recombinaison homologue par le plasmide $\Delta HB M$. Les cellules d'*E. chrysanthemi* $\Delta outM$ (102 et 103) portant les plasmides ΔHB (vecteur vide) et $\Delta HB M$ (avec *outM*) ont été patchées sur boîtes contenant le dérivé pectique, le PGA (polygalacturonate). Les halôts de dégradation, causés par l'action des pectinases sécrétées par le T2SS, sont révélés par de l'acétate de cuivre.

Les résidus du domaine de type ferrédoxine d'EpsM ainsi que ceux de l'hélice α_0 qui traverse le segment transmembranaire sont bien conservés parmi tous les homologues GspM (par exemple 31% d'identité entre les domaines de type ferrédoxine d'EpsM et OutM ; 42% entre ceux d'OutM et de PulM). Ceci suggère une conservation de la structure dans OutMpéri. L'interface de l'homodimère d'EpsMpéri (900 Å²) est constituée de 7 résidus faisant partie de l'hélice α_2 . Avec ces 7 résidus sur chaque monomère, 4 interactions par formation de ponts hydrogène et une interaction hydrophobe ont été supposées (Abendroth *et al.*, 2004).

Nous nous sommes intéressés à cette dernière interaction hydrophobe qui comprend les résidus V126 et A130 d'EpsM. Un alignement de séquences a montré que dans OutM d'*E. chrysanthemi*, ces positions correspondaient aux résidus L122 et A126. Notre objectif a été de figer l'interaction entre les deux monomères par remplacement de L122 et A126 par une cystéine. La formation d'un pont disulfure *in vivo* va signifier la proximité des résidus en question et donc la validité de l'interface EpsMpéri/ EpsMpéri observée dans l'étude d'Abendroth *et al.* (2004). Nous avons introduit deux substitutions simples L122C et A126C et une substitution double L122C/ A126C en utilisant la mutagenèse dirigée.

Afin de tester la fonctionnalité de ces protéines OutM mutées, nous avons construit un mutant d'*outM* d'*E. chrysanthemi* (voir construction dans matériels et méthodes). Ce mutant a été parfaitement complémenté par un plasmide Δ HB M portant le gène *outM* sauvage (Figure II.14). Ensuite, la souche mutée *E. chrysanthemi* Δ *outM* a été transformée par les plasmides Δ HB M portant ces mutations ponctuelles (Tableau II.1). Les tests sur boîtes PGA ampicilline montrent que le mutant *outM* a été complémenté par Δ HB M, mais aussi par Δ HB M L122C, Δ HB M A126C et Δ HB M L122C A126C (non montré). La sécrétion par ces mutants a été analysée par Western-blot avec des anticorps contre PelI et PelD, deux pectinases sécrétées par le T2SS. Les pectinases PelI et PelD sont sécrétées dans le mutant *outM* complémenté par Δ HB M, mais aussi par les mutants Δ HB M L122C, Δ HB M A126C et Δ HB M L122C A126C (Figure II.15). Les substitutions L122C et/ ou de A126C n'ont pas d'effet sur la fonctionnalité d'OutM dans le système de sécrétion. Comme nous l'avons expliqué dans l'introduction de ce sous-chapitre, ceci peut signifier soit que les deux cystéines créent un pont disulfure et la formation d'un dimère covalent n'affecte pas la sécrétion ou bien que les deux cystéines ne forment pas de pont disulfure à cause de leur éloignement physique.

Pour conclure sur l'implication des résidus L122 et A126 dans l'homodimérisation d'OutM, nous avons tenté d'examiner l'état de multimérisation de ces protéines mutées chez

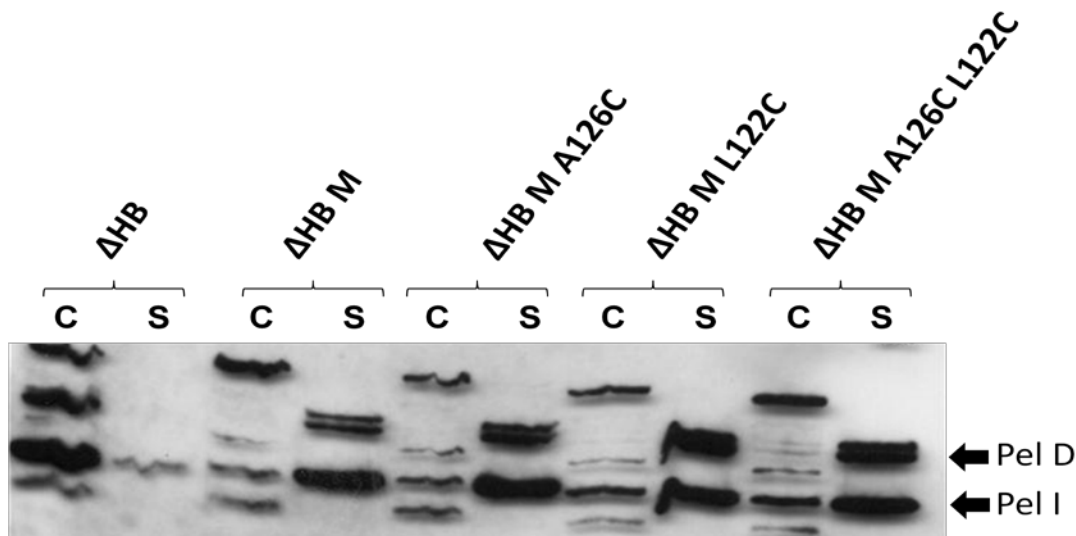


FIGURE II.15 : Fonctionnalité des protéines OutM mutées portant des substitutions de cystéine chez *E. chrysanthemi* : capacité de ces mutants à compléter un mutant *outM* d'*E. chrysanthemi* et détection de la sécrétion de pectinases par Western-Blot. Les plasmides ont été exprimés dans un mutant *outM* d'*E. chrysanthemi* : Δ HB est un plasmide vide. Δ HB M est un plasmide portant le gène *outM* sauvage et Δ HB M A126C, Δ HB M L122C et Δ HB M A126C L122C portent les mutations ponctuelles indiquées. L'extrait cellulaire (C) et le surnageant (S) de chaque mutant ont été visualisés par Western-blot avec les anticorps anti-PelI et anti-PelD, 2 pectinases sécrétées par le T2SS.

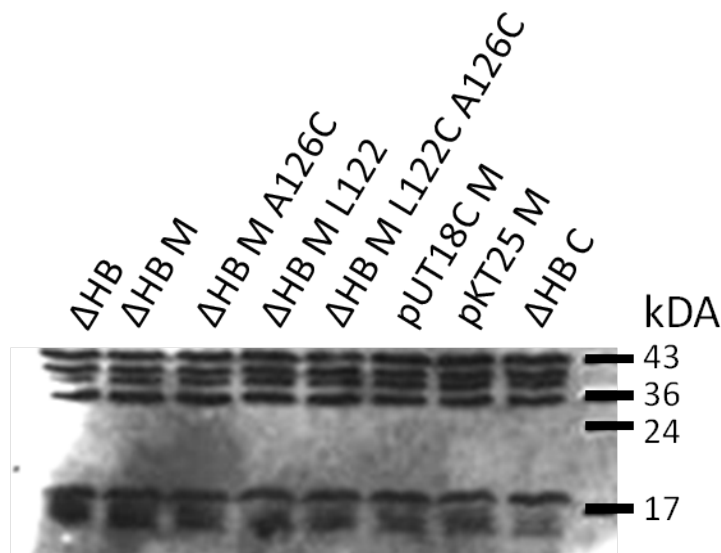


FIGURE II.16 : Cystein-bonding des mutants cystéines d'OutM : vérification de la présence de monomères avec 2-mercaptoéthanol. Les échantillons ont été déposés sur SDS-PAGE 15% d'acrylamide puis le Western-blot a été révélé par les anticorps anti-OutM. Aucune bande spécifique n'est apparue.

E. chrysanthemi. Une culture de la souche *E. chrysanthemi* A4229 portant Δ HB, Δ HB M, Δ HB M L122C, Δ HB M A126C ou Δ HB M L122C A126C a été traitée au iodoacétamide pour bloquer les cystéines libres, puis séparées par SDS-PAGE, soit dans des conditions d'oxydation (sans 2-mercaptoéthanol) soit de réduction (avec 2-mercaptoéthanol). L'analyse de ces échantillons par Western-blot, révélés par les anticorps anti-OutM, n'a rien apporté. En effet, seules de nombreuses protéines aspécifiques ont été détectées par les anticorps (Figure II.16). Pour augmenter la quantité de protéines, nous avons procédé à une séparation des membranes et des compartiments solubles par ultracentrifugation. OutM et ses mutants auraient dû se trouver dans la fraction membranaire mais là encore, la protéine OutM n'était pas visible par Western-blot. Un échantillon issu de surproduction de GST::OutM a été également déposé sur gel et GST::OutM est apparue sous la forme d'une large bande spécifique.

Comme pour les tests de double-hybride bactérien chez *E. coli*, il n'y a pas de réponse des anticorps anti-OutM chez *E. chrysanthemi*. Nous n'avons donc pas pu voir si un dimère était formé par le mutant d'OutM portant la double substitution L122C/A126C.

II.D) Discussion et conclusion

La dissection des protéines OutC, OutL et OutM dans les travaux présentés ici a permis de définir clairement si les régions périplasmiques des trois protéines étaient impliquées dans les interactions et si oui, quelles parties de ces régions. Nous avons tout d'abord analysé les combinaisons des régions périplasmiques entières des trois protéines : les régions périplasmiques d'OutL et OutM sont capables de dimériser en double-hybride bactérien. Elles sont aussi capables d'interagir l'une avec l'autre, ce qui stabilise fortement OutL_{péri}. OutM_{péri} est probablement également stabilisée lors des interactions avec OutL_{péri} mais faute de réactivité des anticorps anti-OutM, nous n'avons pas pu vérifier. Par contre, la région périplasmique d'OutC isolée n'est pas capable d'interagir ni avec elle-même ni avec OutL_{péri}, ni avec OutM_{péri} en DHB. Les mêmes conclusions ont été exposées par des expériences de pull-down lors de la thèse de F. Login.

En utilisant les données structurales disponibles sur les régions périplasmiques des homologues d'OutL et OutM, EpsL et EpsM de *V. cholerae* (Abendroth *et al.*, 2004 ;

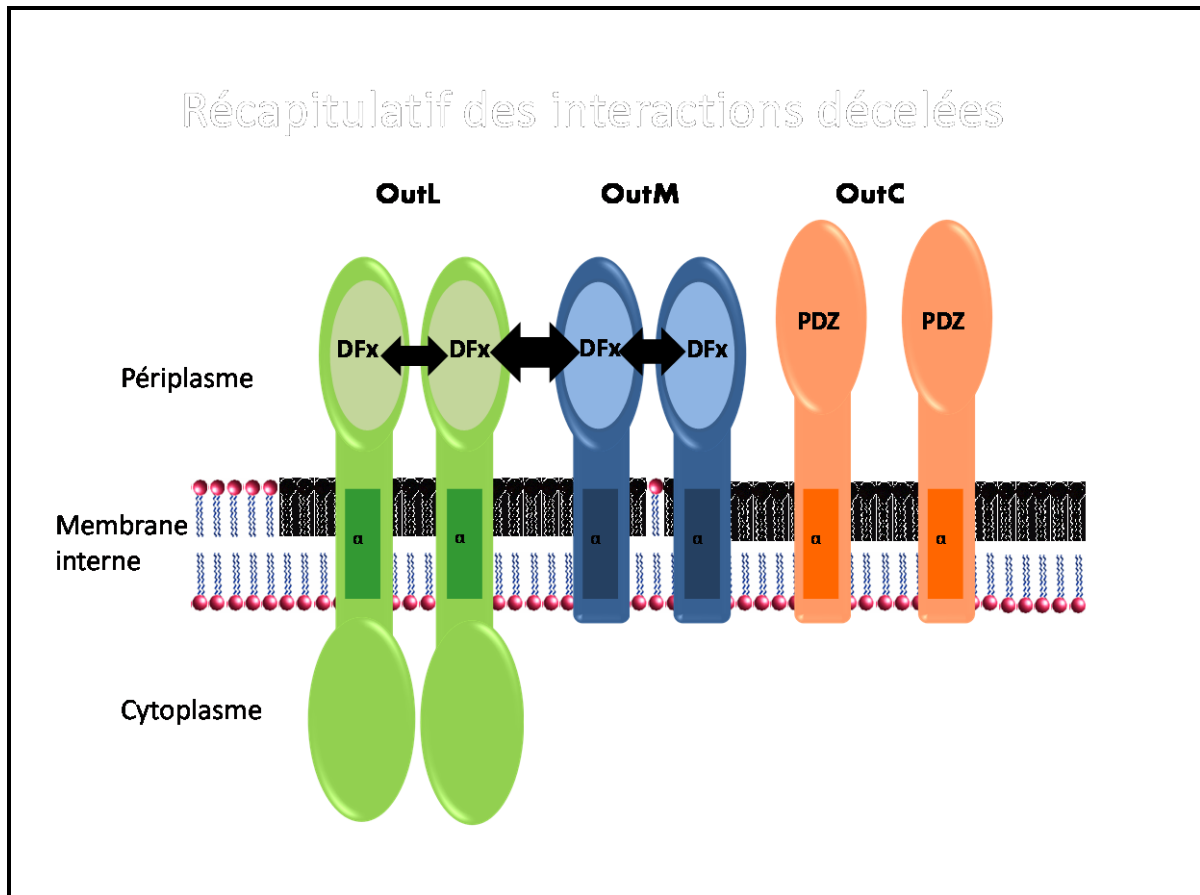


FIGURE II.17 : Représentation schématique des interactions décelées par double-hybride bactérien entre les régions périplasmiques d'OutC, OutL et OutM du système de sécrétion de type II d'*E. chrysanthemi*. Les flèches symbolisent les interactions et leur épaisseur la force d'interaction

Abendroth *et al.*, 2009), nous avons construit les dérivés tronqués d'OutL et OutM en découpant les régions périplasmiques en deux parties : i) la région contenant les structures secondaires $\alpha 1$ - $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\alpha 2$ - $\beta 3$ - $\beta 4$, communes aux deux protéines et appelées domaine de type ferrédoxine, et ii) la région située entre le TMS et le domaine de type ferrédoxine. De manière très intéressante, les domaines de type ferrédoxine isolés d'OutL et OutM (OutL Δ B3 et OutM Δ X respectivement) interagissent avec eux-mêmes et entre eux plus fortement que les régions périplasmiques entières. Ceci démontre que les interactions homo- et hétéroprotéiques des domaines de type ferrédoxine interviennent indépendamment des autres régions des protéines. La tentative de déléter la première hélice α du domaine de type ferrédoxine d'OutM (OutM Δ P) s'est révélée infructueuse. La suppression d'une hélice engendre très probablement des modifications de la structure de ce domaine, conduisant à la dégradation de la protéine hybride et/ou à la perte de sa fonctionnalité.

Afin de savoir si une autre partie de la région périplasmique d'OutL et d'OutM n'était pas impliquée dans les interactions, nous avons construit deux triples fusions T25::L Δ F::BlaM et T25::L Δ H::BlaM. La première possède la région périplasmique d'OutL délétée du domaine de type ferrédoxine, la seconde est encore plus courte et ne contient que la première hélice α d'OutL_{péri}. Aucune de ces deux fusions ne semble être impliquée dans les interactions OutL/OutL et OutL/OutM. Le récapitulatif des interactions détectées entre les régions périplasmiques par DHB lors de cette étude est présenté dans la figure II.17.

Dans les études précédentes, quelques données avaient été collectées sur les interactions entre régions périplasmiques de ces protéines ou de leurs homologues :

- l'utilisation de double-hybride levure a montré une homo- et hétérodimérisation des régions périplasmiques d'OutM et une absence d'interaction avec la région périplasmique d'OutC (Py *et al.*, 1999 ; Py *et al.*, 2001; Douet *et al.*, 2004). Plus précisément, la partie de la région périplasmique d'OutM entre les résidus 37 et 90 (hélice $\alpha 0$) n'est pas nécessaire à l'homodimérisation et à l'interaction avec OutL. La partie C-terminale de la région périplasmique d'OutM (résidus 84 à 152 formant le domaine de type ferrédoxine) permet à elle seule de retrouver l'interaction avec OutL_{péri} et avec elle-même (Figure II.17.A) (Douet *et al.*, 2004).
- La structure 3D de la région périplasmique d'EspM a été résolue par cristallographie aux rayons X (Abendroth *et al.*, 2004) : les dimères d'EpsMpéri

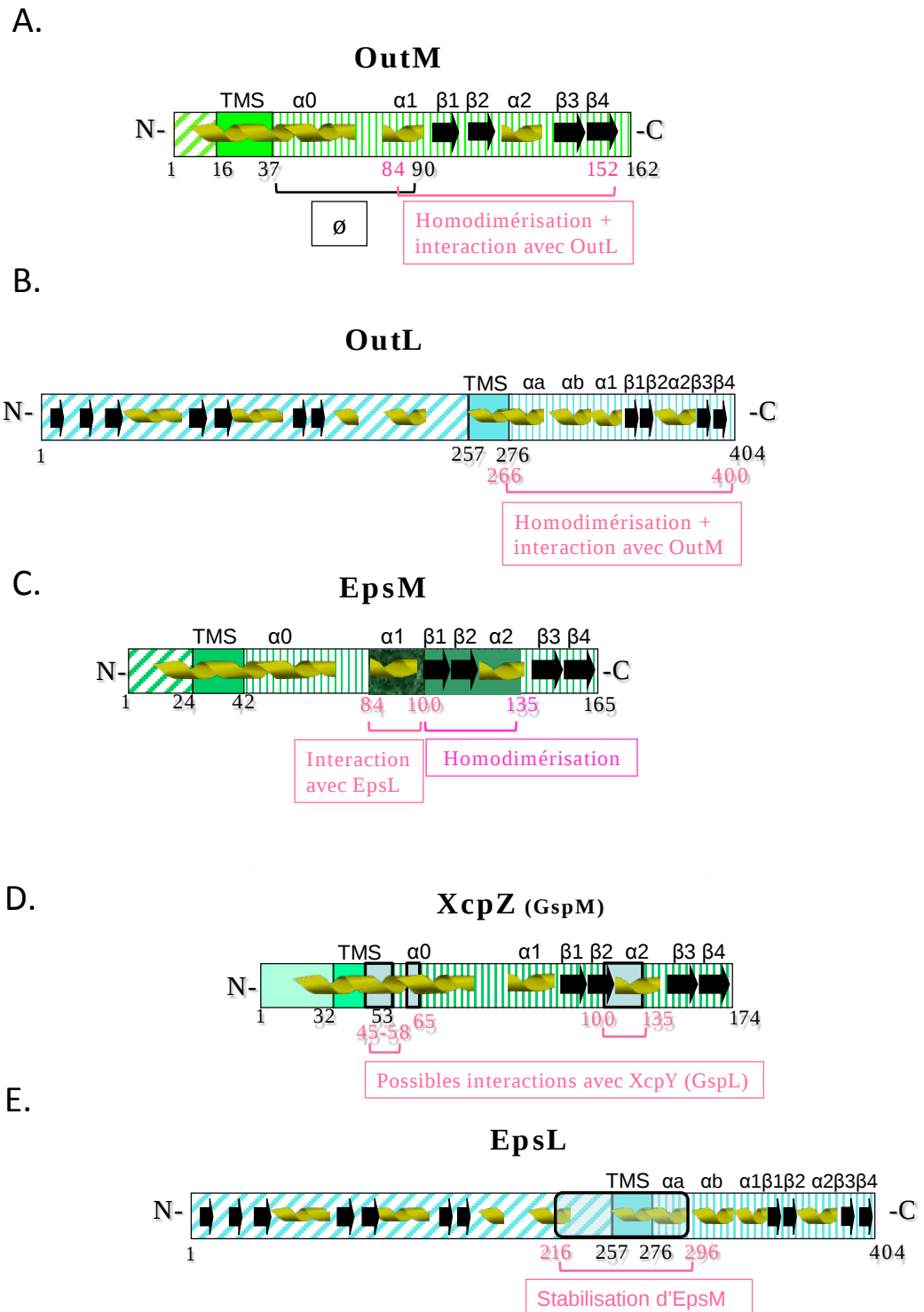


FIGURE II.18 : Représentation schématique des protéines GspM et GspL et les régions impliquées dans les interactions entre elles. (A et B) Régions d'OutM et d'OutL directement impliquées dans leur homodimérisation et l'interaction entre elles, définies par double-hybride levure (Py *et al.*, 2001) ; (C) Régions d'EpsM impliquées dans les interactions notées en bas, suggérées par copurification et coimmunoprécipitation (Johnson *et al.*, 2007) ; (D) Régions de XcpZ (GspM) impliquées dans la stabilisation de XcpY (GspL), détectées par insertion de peptides

(Robert *et al.*, 2002) ; (E) Région d'EpsL impliquée dans la stabilisation d'EpsM, détectée par échange de régions avec son homologue ExeL (Sankvist *et al.*, 2000).

sont présents dans les mailles de cristaux. L'interface cristallographique formée par les deux monomères d'EpsM est majoritairement constituée des résidus de l'hélice $\alpha 2$ du domaine de type ferrédoxine.

- Une étude structurale plus récente sur PilO, l'orthologue de GspM dans les T4P, a présenté une structure très proche de celle d'EpsMpéri (Sampaleanu *et al.*, 2009). Cependant, l'interface du dimère formé par PilO est sensiblement différente de celle suggérée pour EpsMpéri. L'interface est notamment beaucoup plus large (3091 Å contre 900 Å respectivement) et comprend des résidus de l'hélice $\alpha 2$ et du brin $\beta 3$ du domaine ferrédoxine, contre l'hélice $\alpha 2$ seule pour le dimère d'EpsMpéri.
- Johnson et collaborateurs (2007) ont suggéré que deux régions différentes de la partie périplasmique d'EpsM intervenaient dans les interactions EpsM-EpsM et EpsL-EpsM. En utilisant des dérivés tronqués d'EpsM, les auteurs ont montré qu'une partie de la région périplasmique (résidus 100 à 135) était nécessaire à la dimérisation d'EpsM et qu'une autre partie (résidus 84 à 99) était indispensable pour l'interaction avec EpsL (Figure II.18.C). Or, les résidus 84 à 99 correspondent dans la structure à l'hélice $\alpha 1$ tandis que les résidus 100 à 135 forment les feuillets $\beta 1$ - $\beta 2$ et l'hélice $\alpha 2$. Ces résultats sont donc cohérents avec la structure cristallographique d'EpsM, où l'interface du dimère est formée par l'hélice $\alpha 2$.
- Dans *P. aeruginosa*, la mutagenèse par insertion de peptides a suggéré trois régions dans XcpZ (GspM) indispensables à la stabilisation de XcpY (GspL). La première correspond au TMS de XcpZ, la deuxième à la région périplasmique adjacente au TMS de XcpZ et la troisième au motif de type ferrédoxine de XcpZ (Figure II.18.D) (Robert *et al.*, 2002).

Les données bibliographiques concernant GspL sont beaucoup moins nombreuses. Les études suivantes ont été décrites :

- Sandkvist et collaborateurs ont suggéré une région d'interaction d'EpsL avec EpsM située environ 40 résidus avant et 20 résidus après le TMS. En effet, les

protéines chimères d'EpsL contenant la région correspondante d'ExeL (homologue GspL d'*A. hydrophila*) sont incapables de stabiliser EpsM (Figure II.18.E) (Sandkvist *et al.*, 2000).

- Les études de double-hybride levure citées plus haut ont également montré l'implication d'OutLpéri dans l'homodimérisation et dans l'interaction avec OutMpéri, ainsi que l'absence d'interaction d'OutLpéri avec OutCpéri (Figure II.18.B) (Py *et al.*, 1999 ; Py *et al.*, 2001; Douet *et al.*, 2004).
- Enfin, la structure 3D de la région périplasmique d'EpsL de *V. parahaemolyticus* a également été résolue par cristallographie aux rayons X (Abendroth *et al.*, 2009). Bien que le repliement d'EpsLpéri soit similaire à celui d'EpsMpéri, l'arrangement des deux dimères est complètement différent. Pour EpsLpéri, l'interface est formée par les résidus de l'hélice $\alpha 1$ et du brin $\beta 1$.

Mes résultats de double-hybride bactérien sont cohérents avec les résultats de double-hybride levure : les régions périplasmiques d'OutL et d'OutM, et plus précisément de la région contenant le domaine de type ferrédoxine pour OutM, sont suffisants pour conduire l'homodimérisation. Nous sommes allés plus loin en montrant l'implication directe du domaine de type ferrédoxine d'OutL dans l'interaction OutL/OutM, ce qui n'a jamais été montré auparavant. Nous avons également démontré l'implication de ce même domaine dans l'homodimérisation d'OutL et d'OutM *in vivo*, comme l'avait suggérée les études structurales.

Sandkvist et collaborateurs n'ont décrit qu'une seule région d'EpsL qui stabiliserait EpsM (Sandkvist *et al.*, 2000). Ils en ont conclu que cette région (qui possède le TMS) pourrait interagir avec EpsM. Ces mêmes auteurs ont disséqué EpsM et ont conclu, par les expériences de coimmunoprécipitation, que la région C-terminale d'EpsM était essentielle pour la dimérisation et pour l'interaction avec EpsL (Johnson *et al.*, 2007). La combinaison des deux études suggère qu'une interaction asymétrique pourrait intervenir entre le TMS d'EpsL (ou une courte région de 20 résidus le suivant qui correspond à OutL Δ H dans notre étude) et le domaine de type ferrédoxine d'EpsM. Néanmoins, dans la première étude (Sandkvist *et al.*, 2000), les auteurs n'ont pas testé la capacité de la région C-terminale d'EpsL à stabiliser EpsM et dans la seconde étude, l'effet de la délétion du TMS d'EpsM n'a pas été étudié. Nous avons montré une interaction directe entre les domaines de type ferrédoxine d'OutL et OutM ; et le domaine de type ferrédoxine d'OutM (OutM Δ X) est suffisant à la stabilisation d'OutLpéri, OutL Δ B1 et OutL Δ B3. Même si la faible réactivité des anticorps anti-OutM ne

nous a pas permis de vérifier cette hypothèse, il est probable que cet effet soit réciproque vis-à-vis d'OutM et que le domaine de type ferrédoxine d'OutL soit suffisant pour la stabilisation d'OutMpéri. D'autre part, la région d'EpsL suggérée par Sandkvist comme impliquée dans l'interaction avec EpsM va jusqu'à 20 résidus après le TMS. Cette région est composée de la fin de l'hélice α transmembranaire. Cette courte région correspond à nos constructions L Δ H::BlaM et L Δ F::BlaM. Nous n'avons pu déceler aucune interaction de cette région avec les domaines de type ferrédoxine d'OutL et d'OutM et plus globalement avec aucune des régions périplasmiques entières de ces deux protéines. De plus, cette courte région entre le TMS et le domaine de type ferrédoxine ne conduit pas à une stabilisation d'OutL. Nos résultats semblent contredire ceux suggérés par Sandkvist. Mais il ne peut pas être exclu que les approches utilisées dans leurs études et la nôtre aient pu conduire à des conclusions opposées. Une étude supplémentaire est donc nécessaire, spécialement sur les segments transmembranaires de ces protéines. Qui plus est, nous avons montré dans le chapitre I.A que les trois protéines entières interagissent avec elles-mêmes et les unes avec les autres. Les interactions entre {OutC et OutM} et {OutC et OutL} restent inexplicées après l'analyse des régions périplasmiques des trois protéines. Au vu des différents éléments précités, nous avons donc cherché à déterminer si les segments transmembranaires (TMS) sont capables de conduire les interactions. L'étude des interactions entre ces TMS fera l'objet du chapitre III.

Lors du processus de sécrétion, le T2SS devra effectuer une succession de cycles pour transloquer toutes les exoprotéines. Cette considération implique un système dynamique dans lequel les composants devront subir des changements conformationnels lors du processus de sécrétion et interagir en alternance avec certains autres composants du système. Nous nous sommes intéressés à cet aspect dynamique en étudiant la compatibilité entre l'interaction des régions périplasmiques d'OutL et d'OutM et l'homodimérisation de chacune de ces régions. Nous avons adapté la technique du double-hybride bactérien pour deux nouvelles approches : i) le triple-hybride bactérien pour visualiser l'effet de la coexpression d'OutMpéri sur les interactions OutLpéri/ OutLpéri et OutLpéri/ OutMpéri et ii) les triples fusions portant la GST pour visualiser l'influence de l'homodimérisation forcé d'OutLpéri sur l'interaction OutLpéri/ OutMpéri.

Etonnamment, la quantité de T18::OutLpéri n'a pas augmentée avec la coexpression d'OutMpéri, à l'inverse de la coexpression du couple T18::OutLpéri/ T25::OutMpéri. OutMpéri peut être peu exprimée ou partiellement dégradée. Pourtant, il doit y avoir une

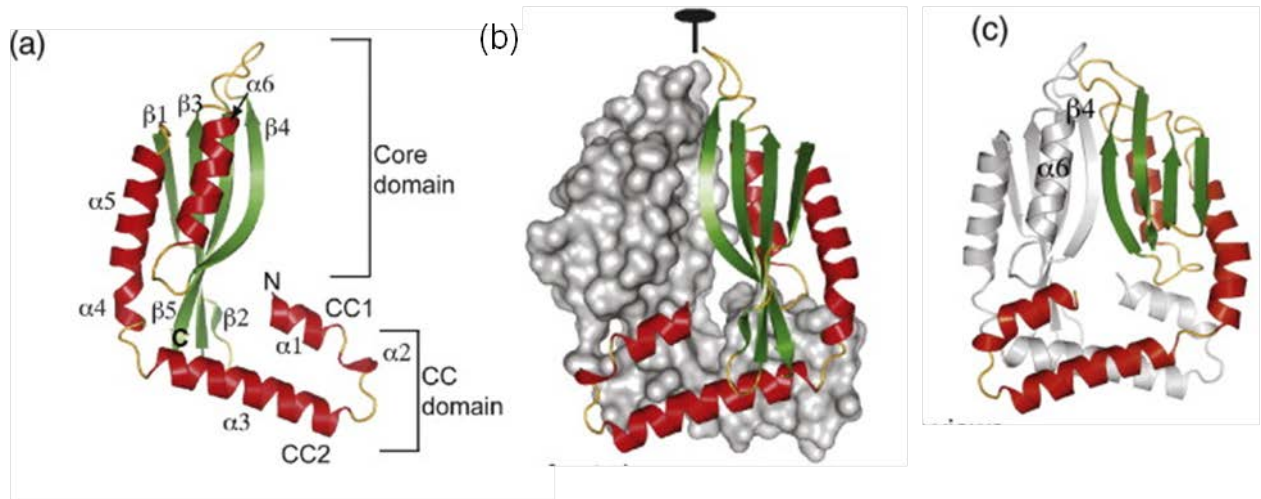


FIGURE II.19 : Structure du dimère des régions périplasmiques de PilO et modèle de la structure de la région périplasmique de PilN. (a) Monomère de PilO ($\Delta 68$) avec le domaine de type ferrédoxine (ici core domain) et le domaine coil-coiled (CC domain). La position de l'hélice $\alpha 1$ est suggérée comme fausse car la grande partie N-terminale de cette hélice a été déléetée. (b) Dimère de PilO avec un monomère en représentation de surface et un monomère en représentation Ribbon. (c) Dimère théorique des régions périplasmiques de PilO/PilN. (Sampaleanu *et al.*, 2009).

certaine quantité d'OutMpéri dans la cellule puisque ce dérivé interfère avec les interactions de double-hybride. En effet, l'homodimérisation de Cya::OutLpéri est diminuée quand OutMpéri est coexprimée. L'homodimérisation d'OutLpéri et son interaction avec OutMpéri semblent donc peu ou pas compatibles.

La triple fusion avec la GST fusionnée entre le sous-domaine T25 et OutLpéri a permis d'étudier l'effet d'une dimérisation forcée d'OutLpéri sur l'interaction OutLpéri/OutMpéri. Nous n'avons pas de moyen de vérifier si OutLpéri de cette fusion s'est réellement dimérisé et si l'interface de ce dimère est la même que dans T25::OutLpéri. Cette triple fusion T25::GST::OutLpéri n'est pas stable quand elle est exprimée seule. Par contre, quand elle a été coexprimée avec T18::OutLpéri, une grande quantité des deux fusions ont été visibles. Ceci suggère que T18::OutLpéri apporte une protection à T25::GST::OutLpéri, probablement par leur interaction. Or, T25::GST::OutLpéri devrait former un dimère et donc s'apporter elle-même cette protection. Ce dernier point favoriserait l'hypothèse d'une « fausse » interface de l'homodimère d'OutLpéri créée grâce à la dimérisation de la GST. L'activité β -galactosidase du couple T18::OutLpéri/ T25::GST::OutLpéri est similaire à celle du couple T18::OutLpéri/ T25::OutLpéri. Or la quantité de fusions dans ce dernier couple est très faible. On peut donc penser que l'activité β -galactosidase de T18::OutLpéri/ T25::OutLpéri est forte par rapport à la quantité de fusions. Au contraire, dans le couple T18::OutLpéri/ T25::GST::OutLpéri, la quantité de fusions est bien plus élevée mais aboutit à une activité faible. Nous suggérons donc qu'il y a une compétition entre le dimère « forcé par la GST » et T18::OutLpéri. Nous avons observé que la triple fusion T25::GST::OutLpéri interagit moins fortement avec T18::OutMpéri que la simple fusion T25::OutLpéri. L'homodimérisation d'OutLpéri ne semble donc pas compatible avec l'interaction OutLpéri/OutMpéri.

Nous avons pu en conclure que le même site ou deux sites chevauchants seraient impliqués dans l'homodimérisation de la région périplasmique d'OutL et son interaction avec la région périplasmique d'OutM. Nos résultats sont donc plus cohérents avec le modèle de PilO/ PilN, les homologues structuraux de GspM et GspL des systèmes de biogénèse des pili de type IV (Sampaleanu *et al.*, 2009). Le dimère formé par la région périplasmique de PilO présente plusieurs interfaces d'interactions : entre les domaines de type ferrédoxine, entre les régions coiled-coil (alors que dans OutM, cette région correspond à la longue hélice $\alpha 0$) et entre le domaine de type ferrédoxine et le domaine coiled-coil (Figure II.19). L'hélice $\alpha 2$ et surtout le brin $\beta 4$ ($\beta 3$ dans GspM) du domaine de type ferrédoxine sont impliqués dans

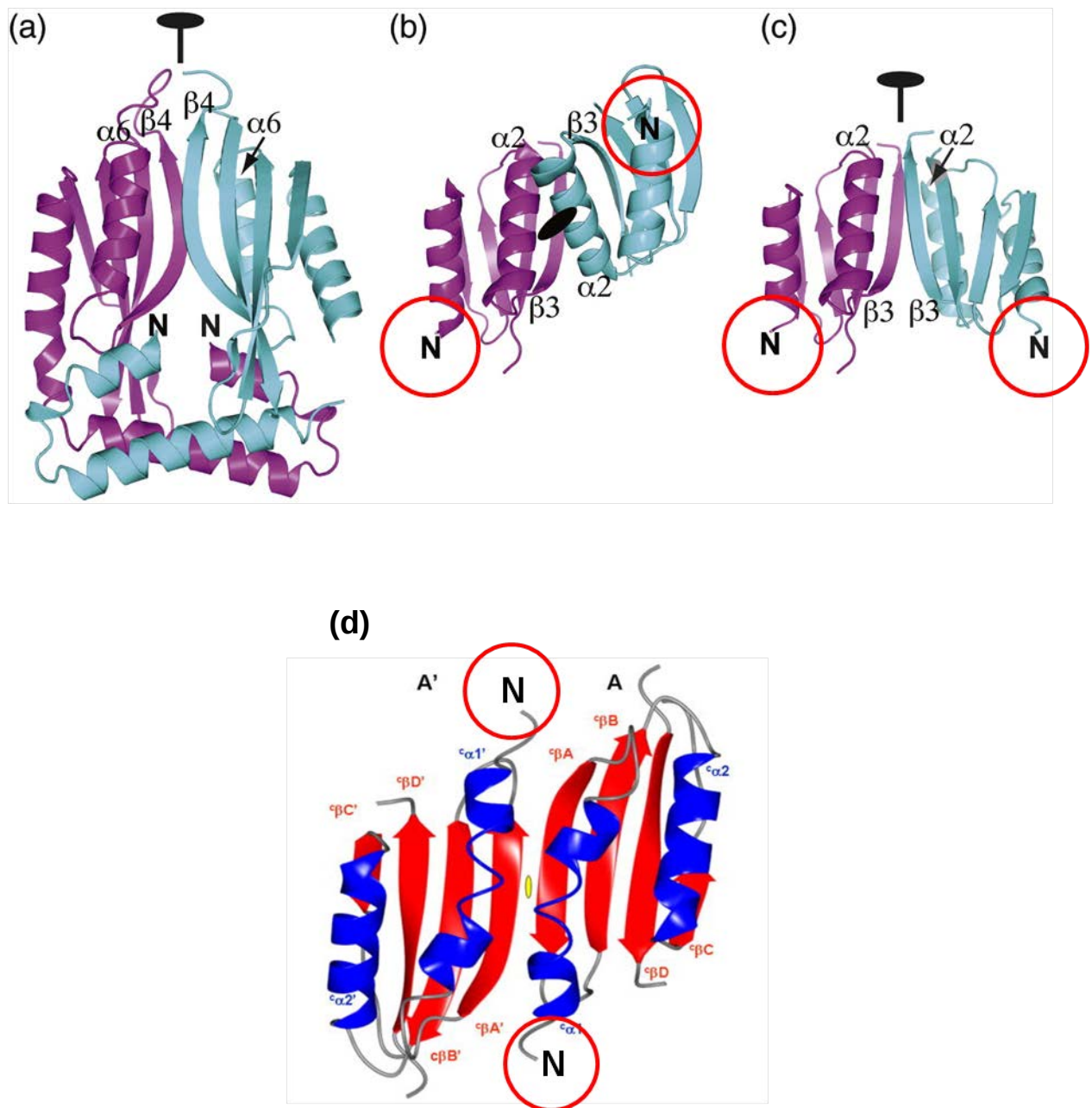


FIGURE II.20 : Structure du dimère des régions périplasmiques de PilO (a), d'EpsM (b), d'EpsM réorienté selon la structure de PilO (c), et structure du dimère des régions périplasmiques d'EpsL. (Sampaleanu *et al.*, 2009 ; Abendroth *et al.*, 2009).

l'interface de deux de ces domaines. A partir de cette structure, un modèle de la région périplasmique de PilN (GspL Δ cyt) a été créé. Cette région présente les mêmes éléments de la structure secondaire et la même interface d'interaction que PilO. De plus, la modélisation d'un hétérodimère PilN/ PilO suggère qu'il aurait la même interface que PilO/ PilO. Ceci nous laisse penser que l'homo- et l'hétérodimérisation du domaine de type ferrédoxine de GspM et GspL s'effectuent par le même site. Cette hypothèse semble être probable car i) les interfaces décrites dans cette étude sont plus larges et plus compactes que celles proposées pour EpsLpéri et EpsMpéri (Abendroth *et al.*, 2004 ; 2009), ii) la région de PilO cristallisée est plus grande que celles d'EpsLpéri et EpsMpéri et prennent en considération la région située juste après le TMS, iii) dans la version actuelle du PDB d'EpsLpéri (code PDB : 2W7V), l'homodimère est formé par la face opposée à celle publiée précédemment, c'est-à-dire par le brin β 3 et l'hélice α 2 (Abendroth *et al.*, 2009).

Les deux dimères des régions périplasmiques d'EpsL et EpsM semblent d'autant plus improbables au sein du système de sécrétion qu'ils devraient prendre un positionnement bizarre. En effet, comme on peut le voir sur la figure II.20 (b et d), les deux dimères présentent leur extrémité N-terminale sur des faces opposées. En prenant en compte que les deux protéines sont insérées dans la membrane interne par le TMS, cela signifierait soit qu'une protéine d'OutM et OutL sur deux fait un coude de 180°, soit que la région périplasmique d'OutM et d'OutL entre le TMS et le domaine de type ferrédoxine fait un coude de 90°, mettant les domaines de type ferrédoxine parallèles à la membrane cytoplasmique et dans un sens inverse (180°) l'un par rapport à l'autre. Trois prolines sont présentes à la fin de l'hélice α 0 d'OutM (qui est la continuité de l'hélice transmembranaire) mais une seule est présente dans cette région d'OutL. Beaucoup plus simplement, en réorientant EpsM selon la structure de PilO, les extrémités N-terminales des protomères d'EpsM sont réorientées sur la même face (Figure II.20.c).

Pour rechercher les résidus impliqués dans l'homodimérisation d'OutM, nous nous étions appuyés sur les données structurales d'EpsM. Puisque les expériences de double et triple-hybride bactérien sont plus cohérents avec le modèle de PilO, l'implication de cette interface dans la dimérisation d'OutMpéri par cette interface est actuellement étudiée au laboratoire. Les données structurales disponibles sur PilO suggèrent que l'homodimère de PilOpéri est formé par l'hélice α 2 et le brin β 4 (β 3 dans GspM). Les substitutions de cystéine ont donc été

introduites à la place de résidus du brin $\beta 3$ d'OutM et combinées avec celles de l'hélice $\alpha 2$ (L122 et A126). L'analyse de ces mutants est en cours.

Des problèmes techniques nous empêchent de conclure sur la compatibilité des homo- et hétérodimérisations de ces protéines. Pour contourner le problème d'une faible réactivité des anticorps anti-OutM, nous avons également tenté de visualiser OutM et ses mutants par l'étiquette Histidine qui a été fusionnée en N-terminal d'OutM lors du clonage d'*outM* dans le plasmide Δ HB (pT7-6 avec le promoteur *pelC*). Malheureusement, la protéine ne répond pas aux anticorps anti-HisTag testés. De nouveaux anticorps anti-OutM seront prochainement produits mais nous n'avons pas d'assurance qu'ils seront plus réactifs que les premiers. Une alternative serait d'utiliser l'approche de cystein-bonding avec la région périplasmique d'OutL. La formation d'un dimère par création d'un pont disulfure pourra être visualisée par les anticorps anti-OutL dont la réactivité semble plus élevée.

TABLEAU III.1

Plasmides utilisés dans ce chapitre

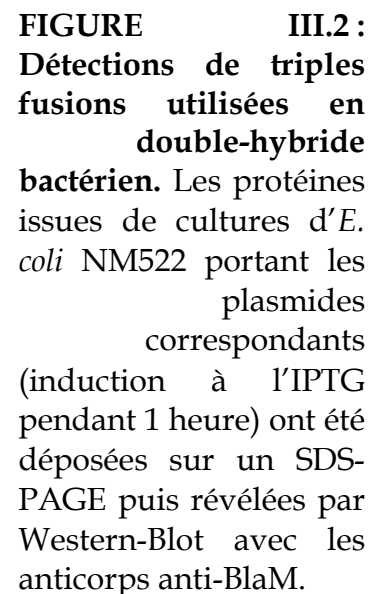
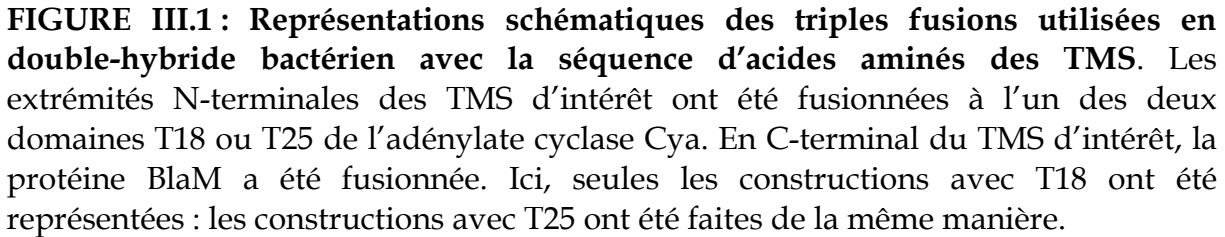
Plasmide	Caractéristiques	Référence
Vecteurs de double-hybride bactérien		
pUT18C Cm ^R C:Blam	pUT18C Cm ^R portant le fragment du gène <i>outC</i> qui code pour le TMS (aa 2-47) fusionné au gène T25 en 5' et à <i>blaM</i> en 3'	Ce travail
pUT18C Cm ^R Cmut:Blam	pUT18C Cm ^R portant le fragment du gène <i>outC</i> qui code pour le TMS (aa 2-47) muté en R15V, Q29L, R36A (Cmut) fusionné au gène T18 en 5' et à <i>blaM</i> en 3'	Ce travail
pUT18C Cm ^R M:Blam	pUT18C Cm ^R portant le fragment du gène <i>outM</i> qui code pour le TMS (aa 3-41) fusionné au gène T18 en 5' et à <i>blaM</i> en 3'	Ce travail
pUT18C Cm ^R L:Blam	pUT18C Cm ^R portant le fragment du gène <i>outL</i> qui code pour le TMS (aa 244-273) fusionné au gène T18 en 5' et à <i>blaM</i> en 3'	Ce travail
pUT18C Cm ^R Tc :Blam	pUT18C Cm ^R portant le fragment du gène <i>tetA</i> qui code pour le TMS (aa 4-34) fusionné au gène T18 en 5' et à <i>blaM</i> en 5'	Ce travail
pKT25 C:Blam	pKT25 portant le fragment du gène <i>outC</i> qui code pour le TMS (aa 2-47) fusionné au gène T25 en 5' et à <i>blaM</i> en 3'	Ce travail
pKT25 Cmut:Blam	pKT25 portant le fragment du gène <i>outC</i> qui code pour le TMS (aa 2-47) muté en R15V, Q29L, R36A (Cmut) fusionné au gène T18 en 5' et à <i>blaM</i> en 3'	Ce travail
pKT25 M:Blam	pKT25 portant le fragment du gène <i>outM</i> qui code pour le TMS (aa 3-41) fusionné au gène T18 en 5' et à <i>blaM</i> en 3'	Ce travail
pKT25 L:Blam	pKT25 portant le fragment du gène <i>outL</i> qui code pour le TMS (aa 244-273) fusionné au gène T25 en 5' et à <i>blaM</i> en 3'	Ce travail
Vecteurs cassettes de résistance		
pYZ5	Cassette de résistance à l'ampicilline Amp (<i>blaM</i>)	Broome-Smith <i>et al.</i> , 1990
pCmr3*	Cassette de résistance au chloramphenicol Cm (<i>cat</i>)	Laboratoire
pUT18C Cm ^R	pUT18C portant le gène <i>cat</i> (Cm ^R) cloné à la place de <i>blaM</i>	Ce travail
pACYC184	Gènes de résistance au Cm et à la tétracycline Tc (<i>tet</i>)	Rose <i>et al.</i> , 1988

Chapitre III : études des interactions entre les segments transmembranaires d'OutC, OutL et OutM par adaptation de la technique du double-hybride bactérien

Les résultats présentés dans le chapitre I suggèrent des interactions au sein des couples de protéines OutL Δ c/ OutL Δ c, OutC/ OutC, OutC/ OutL Δ c, OutC/ OutM et OutL/OutM. La dissection de ces protéines a démontré les interactions entre les régions périplasmiques de certains de ces couples, à savoir OutLpéri/ OutLpéri, OutMpéri/ OutMpéri et OutLpéri/ OutMpéri.

Les interactions OutC/ OutL Δ c et OutC/ OutM ne seraient donc pas conduites par les régions périplasmiques de ces protéines. Néanmoins, il est possible que la dissection des protéines affectent le repliement de la région périplasmique et empêche son interaction dans le DHB. Il est aussi probable que la partie restante de ces protéines (le segment transmembranaire) soit le moteur des interactions protéine-protéine. En effet, une implication directe du segment transmembranaire (TMS) d'OutC dans l'homodimérisation d'OutC a déjà été démontrée précédemment (Login and Shevchik, 2006).

Dans les fusions avec les protéines Out entières, les régions périplasmiques pouvaient masquer l'effet des TMS. Il fallait donc trouver un système permettant d'étudier spécifiquement ces petits segments intégrés dans la membrane interne. Il existe des adaptations de double-hybride pour l'analyse des interactions des TMS : i) le double-hybride levure pour protéines membranaires où les deux sous-domaines de l'ubiquitine sont utilisés comme intermédiaires (Lentze and Auerbach, 2008) et ii) la technique TOXCAT, basée sur la reconstitution de l'activité de la protéine régulatrice ToxR, qui a servi à démontrer des interactions entre certains TMS eucaryotes ou procaryotes (Russ and Engelman, 1999). La première technique utilise un organisme différent de notre modèle : la levure. La deuxième s'applique chez *E. coli* mais l'inconvénient principal est que l'activateur des gènes rapporteurs reste fusionné aux TMS d'intérêt. Il faut donc que l'ADN s'accroche à l'activateur reconstitué, lui-même accroché à la membrane interne. Cette contrainte spatiale pourrait influencer l'expression du gène rapporteur et/ou les interactions TMS/TMS analysées



par cette technique. C'est pourquoi nous avons décidé d'adapter la technique du double-hybride bactérien.

Cette nouvelle technique, dérivée du double-hybride bactérien de Karimova (Karimova *et al.*, 1998), a été mise au point durant ce travail de thèse. Son principe est schématisé dans la figure 47 (Matériels et méthodes). Au N-terminus du segment TM, sont fusionnés T18 ou T25, tandis qu'au C-terminus, BlaM, la β -lactamase, est fusionnée (voir Matériel et Méthodes). Les fusions traductionnelles avec BlaM sont couramment utilisées pour vérifier la topologie ou la translocation de protéines membranaires ou périplasmiques. L'insertion correcte du segment TM induit le passage de BlaM fusionnée dans le périplasma, ce qui donne une résistance à l'ampicilline. Ces protéines hybrides ont été appelées triples fusions. La représentation schématique des triples fusions avec le domaine T18 est présentée dans la figure III.1.

III.A) Localisation des triples fusions

La fusion traductionnelle de trois séquences codantes permet la création d'une protéine hybride T18:: ou T25::TMS::BlaM. La fusion avec BlaM permet de vérifier une localisation correcte dans la membrane interne et d'estimer la stabilité des fusions. Dans un premier temps, nous avons vérifié la stabilité et la quantité des triples fusions dans une souche *E. coli* NM522. Sur Western-blot, les fusions sont visibles en quantités à peu près égales et nous n'observons pas de produits de dégradation importants (Figure III.2).

III. A. 1) Vérification de la localisation des triples fusions par les tests de résistance à l'ampicilline

Si les triples fusions Cya::TMS::BlaM sont correctement localisées dans la membrane interne (N-in, C-out), leur expression doit conférer la résistance à l'ampicilline. En effet, BlaM est une β -lactamase périplasmique qui a besoin de la formation de ponts disulfure intramoléculaires pour être active. Dans le cas où BlaM est dans le cytoplasme, les cellules ne pourront croître qu'en masse sans former de colonies isolées, là où la lyse des premières

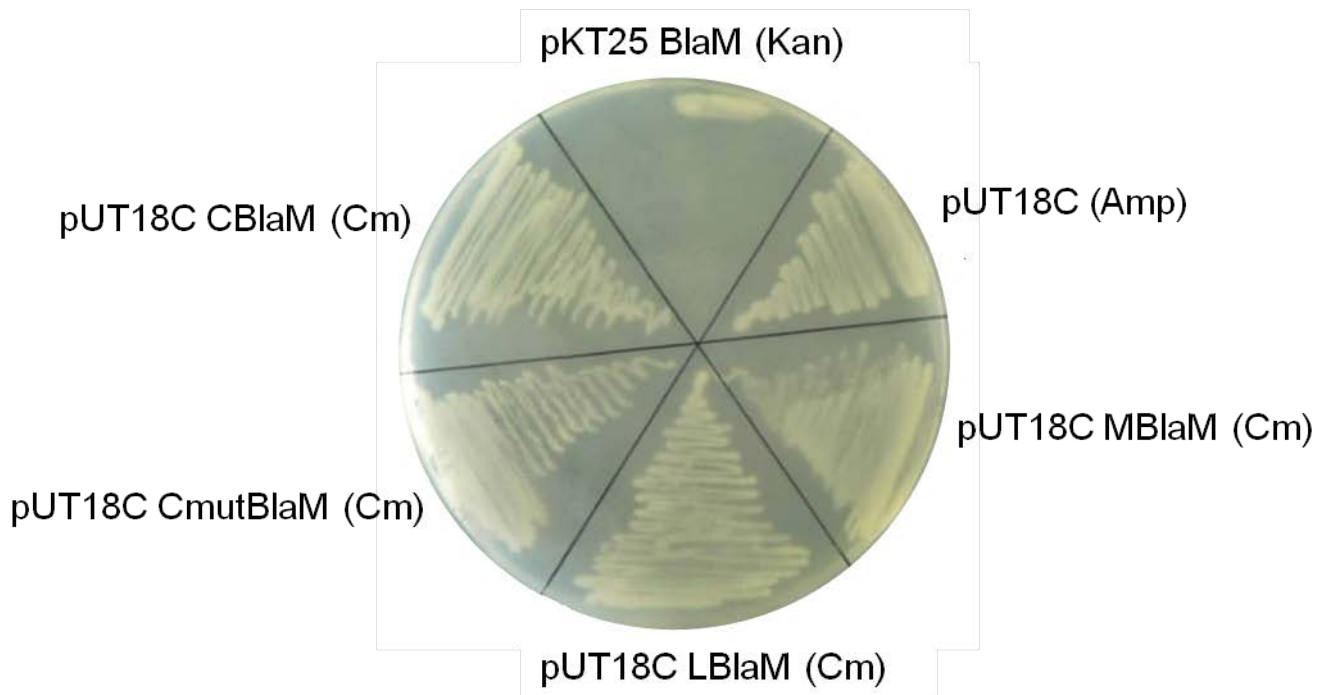


FIGURE III.3: Test de résistance à l'ampicilline des triples fusions T18::TMS::BlaM. Les boîtes GL contiennent 50 µg/ mL d'ampicilline. La souche NM522 a été transformée avec les plasmides pUT18C portant à la place de *blaM* le gène de résistance au chloramphénicol (*cat*) et exprimant l'une des triples fusions T18::TMS::BlaM. Les lettres L, M et C correspondent aux TMS des protéines correspondantes. Dans le témoin positif, pUT18C, le gène *blaM* entier est exprimé à partir de son propre promoteur. Dans le témoin négatif, pKT25 BlaM, la fusion T25::BlaM est cytoplasmique.

cellules a permis la libération de l'enzyme. Le vecteur de double-hybride pUT18C possède le gène de résistance à l'ampicilline. Pour pouvoir visualiser l'effet de la β -lactamase fusionnée à la protéine d'intérêt, le gène de résistance à l'ampicilline a été remplacé par le gène de résistance au chloramphénicol dans ce plasmide.

Un témoin négatif a aussi été construit : T25::BlaM. Cette fusion ne comportant pas de TMS est cytoplasmique. Sur le test de résistance sur boîtes contenant 50 μ g/ mL d'ampicilline ($\frac{1}{2}$ de la concentration habituelle), les cellules portant une triple fusion forment des colonies isolées. Les cellules portant la fusion T25::BlaM sont résistantes en masse uniquement (Figure III.3). Ces résultats montrent que les triples fusions sont intégrées correctement dans la membrane interne et orientées N-in C-out.

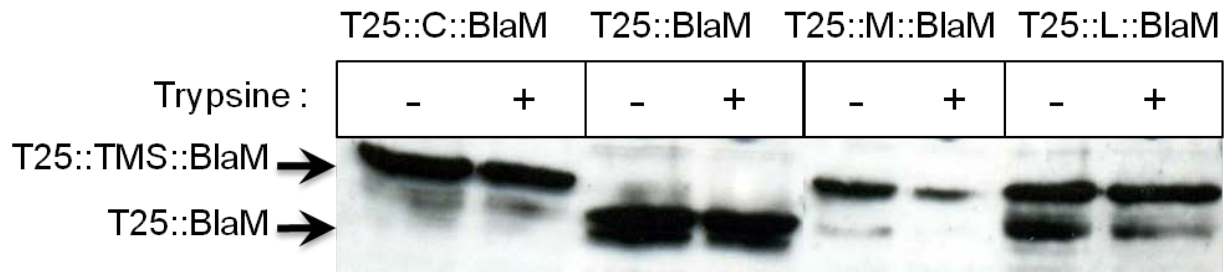
III. A. 2) Vérification de la localisation des triples fusions par accessibilité à la protéolyse dans les sphéropastes

Cette expérience a été réalisée pour vérifier l'insertion correcte des triples fusions dans la membrane interne par l'accessibilité des fusions à la protéolyse dans les sphéropastes. La formation de sphéropastes de bactéries permet la perméabilisation de la membrane externe par traitement au lysozyme (voir matériels et méthodes). De ce fait, les régions périplasmiques de protéines bitopiques de la membrane interne seront accessibles aux protéases. Nous avons analysé la localisation des triples fusions chez *E. coli* NM522. Correctement localisée, la protéine BlaM sera exposée dans le périplasme mais attachée à la membrane interne grâce à la fusion avec le TMS.

L'ajout aux suspensions de sphéropastes d'une protéase, la trypsine, cause la dégradation des protéines périplasmiques ou exposées dans le périplasme. Les protéines cytoplasmiques ne seront pas accessibles à la trypsine et leur présence pourra être visualisée par Western-blot.

Nous avons testé 4 fusions : T25::C_{TMS}::BlaM, T25::L_{TMS}::BlaM, T25::M_{TMS}::BlaM et T25::BlaM par cette approche. La dernière fusion sert de témoin négatif (Figure III.4). Après l'obtention de sphéropastes par action du lysozyme, une solution de trypsine leur a été ajoutée et nous avons observé la progression de l'action de la protéase sur les diverses fusions. Les échantillons ont été prélevés à t=0, t=3 et t=15 (en minutes). Du Triton X-100 a été ajouté dans un quatrième échantillon pour lyser les sphéropastes et rendre l'intégralité des

A.



B.

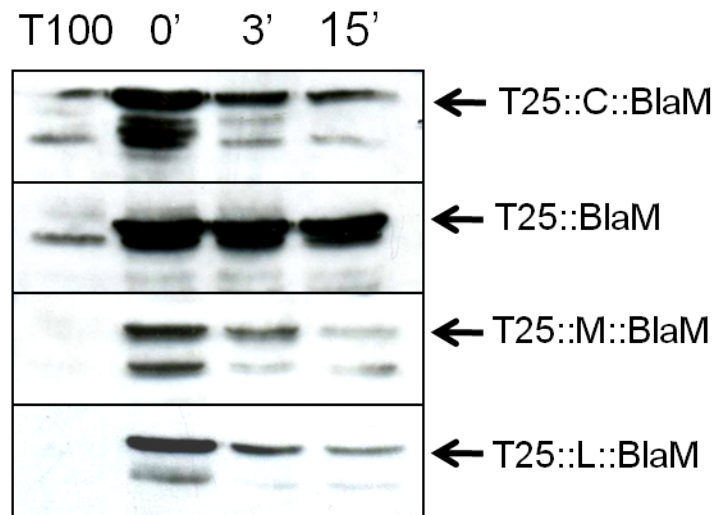


FIGURE III. 4 : Sensibilité des triples fusions à la trypsine. (A) Les cellules NM522 exprimant les triples fusions (indiquées en haut) ont été exposées (+) ou non (-) à l'action de la trypsine pendant 15 minutes et analysées par Western-blot avec les anticorps anti-BlaM. (B) Les mêmes cellules ont été converties en sphéroplastes puis traitées avec la trypsine le temps indiqué en haut et analysées par WB avec les anticorps anti-BlaM. T100 : dans cet échantillon, du Triton X100 a été ajouté avant la protéase.

protéines accessibles à la protéase. En parallèle, un échantillon de cellules non traitées au lysozyme a été prélevé à $t=15$ après ajout de trypsine. L'arrêt de l'action de la trypsine s'est fait grâce au PMSF et un cocktail d'inhibiteurs de protéases. L'analyse des échantillons par Western-blot montre que :

- ✓ Les triples fusions Cya::TMS::BlaM ne sont pas accessibles à la trypsine dans les cellules intactes (Figure III.4.A).
- ✓ Additionnée au triton X-100, la trypsine dégrade la totalité ou presque des fusions (Figure III.4.B, piste T100).
- ✓ Les sphéroplastes non traités à la trypsine présentent une quantité de BlaM importante quelle que soit la fusion (Figure III.4.B, piste 0').
- ✓ Les triples fusions sont dégradées assez rapidement sous l'action de la trypsine (Figure III.4.B, pistes 3' et 15').
- ✓ T25::BlaM ne subit pas de dégradation (Figure III.4.B).

On peut en conclure que BlaM est exposée dans le périplasme dans les fusions T25::C_{TMS}::BlaM, T25::L_{TMS}::BlaM, T25::M_{TMS}::BlaM tout en restant fusionnée au TMS (selon la taille visible en Western-blot) et la fusion T25::BlaM est localisée dans le cytoplasme. Les fusions sont correctement localisées dans la membrane interne en prenant une conformation N-in C-out.

III.B) Etude des interactions entre segments transmembranaires en double-hybride bactérien

Les premiers dosages de séries contenant une triple fusion T18::TMS::BlaM ont montré que le niveau de base de l'activité β -galactosidase observé avec ces fusions était sensiblement augmenté (~400 UA contre ~200 UA pour les cellules qui ne possèdent que le plasmide pUT18C). Ceci est probablement dû à l'utilisation du chloramphénicol avec les bactéries possédant les plasmides pUT18C Cm^R. Il faut aussi noter que les bactéries possédant les

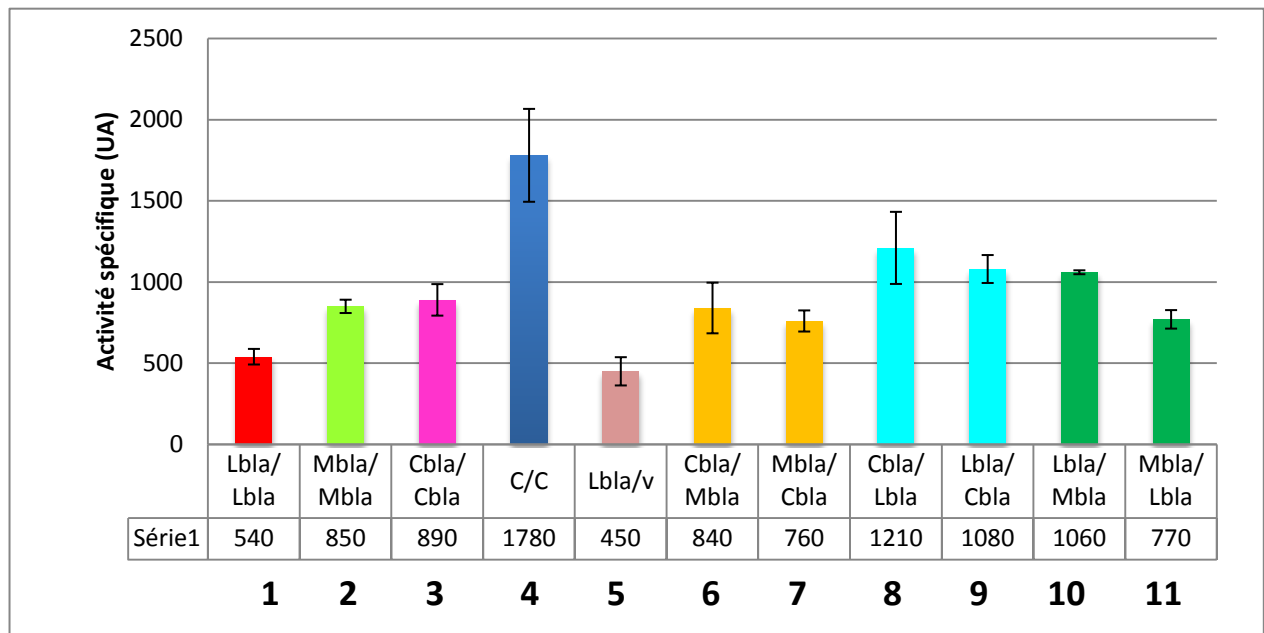


FIGURE III. 5 : Analyse des TMS d'OutC, M et L en double-hybride bactérien. Diagramme de séries représentatives de dosages de l'activité β -galactosidase. Pour chaque couple, plusieurs séries de transformations ont été faites, suivies de deux à quatre séries de dosages de la β -galactosidase. Le vecteur vide est représenté par v. Le couple dans lequel il est présent est un témoin négatif. Lbla/Lbla signifie T18::L_{TMS}::BlaM/T25::L_{TMS}::BlaM et ainsi de suite pour les autres combinaisons.

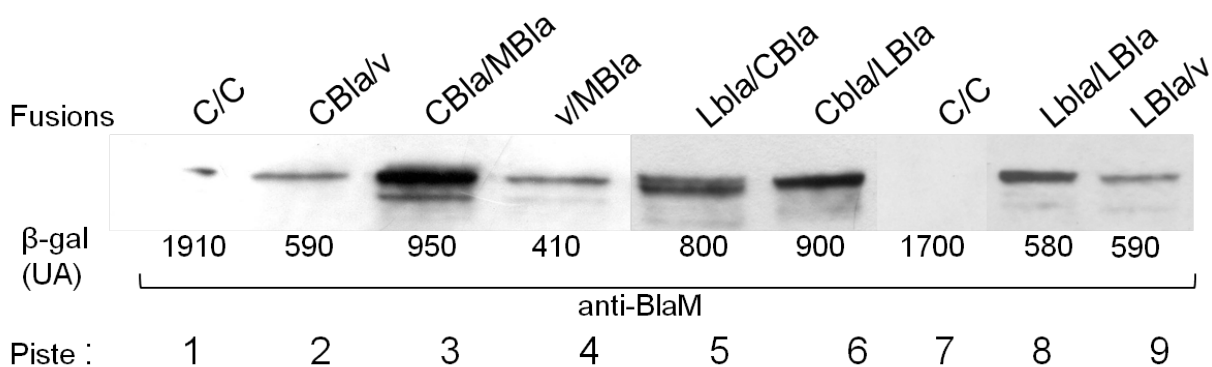


FIGURE III. 6 : Expression de triples fusions lors d'expériences de double-hybride bactérien. Les cellules d'*E. coli* DHP1 exprimant les combinaisons de triples fusions Cya::TMS::BlaM ont été cultivées 20h à 30°C puis utilisées pour les dosages de β -galactosidase et pour une analyse des protéines par WB avec les anticorps anti-BlaM. Les anticorps anti-BlaM permettent de détecter toutes les triples fusions sur SDS-PAGE. Les bandes présentées sur cette figure correspondent bien aux triples fusions étant donné leur taille apparente dans le gel. La différence de taille entre les fusions

avec T18 et T25 est très faible, c'est pourquoi deux triples fusions peuvent apparaître en une seule large bande ou deux bandes très proches
triples fusions ont crû moins rapidement sur le milieu Mac Conkey Amp/ Cm. C'est pourquoi tous les témoins servant à comparer les couples de triples fusions sont des couples T18::TMS::BlaM/ v. Sur boîtes Mac Conkey, ces témoins négatifs apparaissent légèrement plus roses.

III. B. 1) TMS d'OutC, OutM et OutL

III. B. 1. 1) Les TMS d'OutC, OutM et OutL sont-ils impliqués dans l'homodimérisation ?

Tout d'abord, nous avons cherché à savoir si les segments TM peuvent conduire l'homodimérisation de ces trois protéines. D'après les résultats de dosages, présentés dans la figure III.5, colonne 3, il y a une interaction entre deux TMS d'OutC. Puisque la région périplasmique d'OutC n'est pas capable de dimériser seule en DHB (Figure I.7), son implication dans la dimérisation de la protéine entière semble être peu probable. Cependant, l'activité de la β -galactosidase de T18::C_{TMS}::BlaM/ T25::C_{TMS}::BlaM (Figure III.5, colonne 3) est deux fois inférieure à celle du couple OutC/OutC (colonne 4). BlaM pourrait provoquer un obstacle stérique gênant l'interaction entre les TMS d'OutC. Il est aussi possible que la quantité des triples fusions dans les cellules soit moins importante que celle des protéines entières (n'ayant pas d'anticorps contre Cya, nous n'avons pas pu comparer). Néanmoins, on peut suggérer que les TMS seraient responsables de l'homodimérisation d'OutC.

L'activité de la β -galactosidase du couple de TMS d'OutM (Figure III.5, colonne 2) est égale à celle des TMS d'OutC (colonne 3). Les activités de ces deux couples sont deux fois inférieures à celle du témoin positif T18::OutC/ T25::OutC mais deux fois supérieures au témoin négatif T18::L_{TMS}::BlaM/ v (Figure III.5). Nous avons montré une interaction T18::Mpéri/ T25::Mpéri (Chapitre I.B.1.1). Il semble donc que les régions périplasmiques mais également les segments transmembranaires sont capables de dimériser en DHB. Au vu de ces résultats, il est difficile d'expliquer pourquoi OutM entière ne dimérise en DHB (Chapitre I.A.1.2).

L'activité β -galactosidase observée avec le couple T18:: L_{TMS} ::BlaM/ T25:: L_{TMS} ::BlaM (colonne 1) est à peine supérieure au témoin négatif (colonne 5, Figure III.5). La différence d'activité entre ce couple et le témoin négatif n'est pas assez importante pour être prise en considération. Le TMS d'OutL ne semble donc pas être impliqué dans l'auto-association d'OutL.

III. B. 1. 2) Interactions entre les segments transmembranaires d'OutC, OutM et OutL

Nous avons ensuite recherché les interactions entre les TMS de ces trois protéines. L'activité de la β -galactosidase observée avec le couple T18:: L_{TMS} ::BlaM/ T25:: M_{TMS} ::BlaM (Figure III.5, colonne 10) est plus de deux fois supérieure au témoin négatif (colonne 5). Celle de T18:: M_{TMS} ::BlaM/ T25:: L_{TMS} ::BlaM est un peu moins élevée mais reste tout de même bien supérieure au témoin négatif (Figure III.5, colonne 11). Ceci indique une interaction entre les TMS d'OutL et OutM. Là encore, l'interaction entre ces deux protéines semblent être conduite à la fois par les régions périplasmiques (Chapitre I.B.1.2) et par les TMS.

Lorsque les TMS d'OutC et OutM ont été coexprimés ensemble en DHB, l'activité de la β -galactosidase a été environ deux fois supérieure au témoin négatif (Figure III.5, colonnes 6 et 7). Les valeurs de la β -galactosidase observées avec les TMS d'OutC et OutL ont été 2 à 3 fois supérieures au témoin négatif T18:: L_{TMS} ::BlaM/ v (Figure III.5, colonnes 8 et 9). Le TMS d'OutC interagirait donc avec les TMS d'OutM et d'OutL. Les résultats obtenus précédemment avec les protéines entières OutC, OutL Δ c et OutM suggèrent de fortes interactions dans les combinaisons OutC/ OutM et OutC/ OutL (Figure I.3). Cependant, en double-hybride bactérien, les régions périplasmiques isolées de ces protéines ne semblent pas interagir dans ces deux couples (Figure I.7). Les interactions OutC/ OutM et OutC/ OutL seraient donc conduites par les TMS.

Afin de vérifier que la différence de valeur entre divers couples de fusions n'est pas due à une stabilité (ou production) différente, nous avons systématiquement contrôlé la quantité de fusions lors des expériences de DHB par Western-blot (Figure III.6). Toutes les triples fusions ont été visibles par Western-blot avec les anticorps anti-BlaM. Selon les couples, les deux triples fusions peuvent apparaître en deux bandes distinctes très proches (c'est le cas de

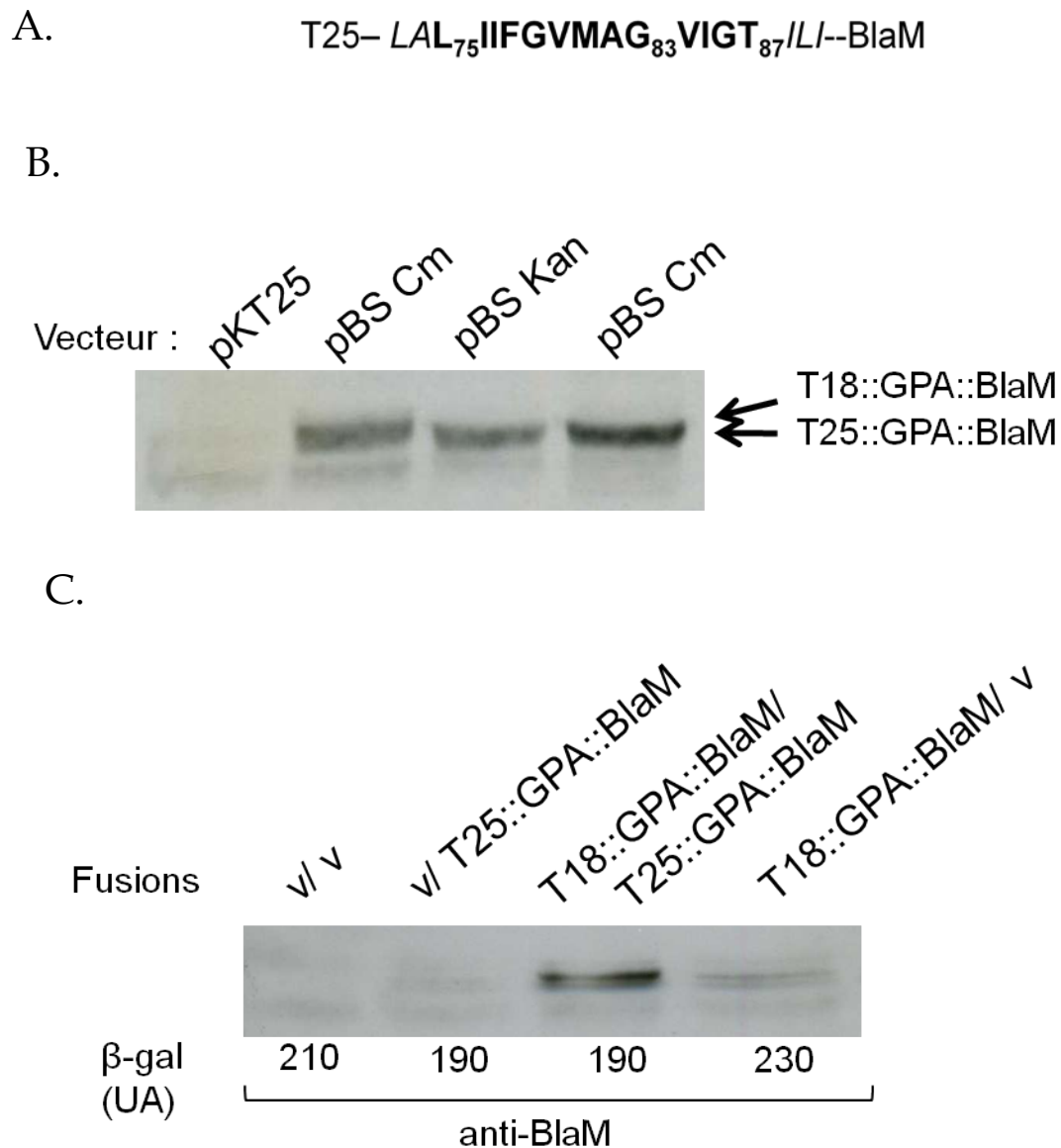


FIGURE III. 7 : Utilisation du TMS de GPA dans le DHB. (A) Séquence de GPA utilisée pour les fusions. Les résidus en italique sont les résidus ajoutés pour la création d'un site de restriction XbaI en 5' et d'un site KpnI en 3' de la séquence nucléotidique. Le TMS est représenté par la séquence en gras. Cette séquence a été utilisée auparavant dans le système TOXCAT (Russ and Engelman, 1999). (B) Détection des triples fusions Cya::GPA::BlaM exprimées à partir du plasmide pBluescript. Les protéines issues de cultures d'*E. coli* NM522 portant les plasmides correspondants ont été analysées par WB avec les anticorps anti-BlaM. (C) Expression des triples fusions Cya::GPA::BlaM exprimées à partir de plasmides multicopies pBluescript en DHB. Les cellules *E. coli* DHP1 exprimant les combinaisons des fusions indiquées en haut ont été cultivées 20h à 30° puis utilisées pour les dosages de la β-galactosidase (indiqués en bas) et pour une analyse des protéines par WB. Les plasmides sont pBS Cm/ pBS Kan.

T18::L_{TMS}::BlaM/ T25::C_{TMS}::BlaM) (Figure III.6, piste 5) ou une seule bande plus intense (T18::C_{TMS}::BlaM/ T25::L_{TMS}::BlaM) (Figure III.6, piste 6). Dans ce dernier cas, on peut vérifier la présence de chaque fusion grâce à l'analyse des témoins négatifs. Il s'agit d'une triple fusion avec le vecteur vide comme par exemple le couple v/ T25::M_{TMS}::BlaM (Figure III.6, pistes 2, 4 et 9). De tels contrôles nous permettent de vérifier la présence (et la quantité) de chaque fusion. Ainsi, les fusions Cya::L_{TMS}::BlaM sont toutes les deux stables comme le montre cette bande épaisse T18::L_{TMS}::BlaM/ T25::L_{TMS}::BlaM qui fait le double de T18::L_{TMS}::BlaM/ v (Figure III.6, pistes 8 et 9). On peut donc en conclure que les faibles valeurs de β -galactosidase observées avec le couple de fusions T18::L_{TMS}::BlaM/ T25::L_{TMS}::BlaM ne sont pas dues à leur faible production mais à l'absence d'interaction.

III. B. 2) Test de fiabilité de la technique du DHB adapté aux études de TMS

III. B. 2. 1) Utilisation du TMS de la glycophorine A

Afin de vérifier la fiabilité de la technique du double-hybride bactérien adapté aux TMS, nous avons voulu la tester avec certains TMS déjà étudiés auparavant. Tout d'abord, nous avons choisi le TMS paradigme de la glycophorine A (GPA). La glycophorine A est une protéine transmembranaire eucaryote, plus précisément une sialoglycoprotéine de la membrane des érythrocytes (globules rouges). Elle forme un dimère stable (résistant au SDS) par l'intermédiaire de son unique TMS (Lemmon *et al.*, 1992). Les mécanismes moléculaires conduisant la dimérisation du TMS de cette protéine ont fait l'objet de multiples études (Langosch *et al.*, 1996 ; Russ and Engelman, 1999 ; Dawson *et al.*, 2003 ; Zhou *et al.*, 2001). Il a été notamment démontré que le motif G-XXX-G (où G est une glycine et X un autre résidu) est indispensable à la dimérisation du TMS de GPA (Johnson *et al.*, 2006). Nous avons donc voulu vérifier si la dimérisation du TMS de GPA peut être détectée par la technique du DHB que j'ai mise en œuvre. La séquence d'ADN codant la GPA a été synthétisée et utilisée pour la construction d'une triple fusion Cya::GPA_{TMS}::BlaM (Figure III.7.A). En parallèle, nous avons construit une triple fusion avec le TMS de GPA portant une mutation ponctuelle G83I qui empêche la dimérisation (Langosch *et al.*, 1996).

Les tests de sensibilité à l'ampicilline ont montré que les bactéries *E. coli* portant un plasmide avec la fusion T25::GPA_{TMS}::BlaM ont été incapables de former des colonies isolées. Lorsque nous avons tenté de visualiser les fusions par Western-blot, seule la fusion T18::GPA_{TMS}::BlaM a été détectée en très faible quantité (non montré). Pour exclure une possibilité d'apparition de mutations secondaires lors de la construction de cette triple fusion avec GPA, la séquence de la triple fusion entière a été vérifiée et aucune mutation n'a été détectée.

Il semblait que T18::GPA_{TMS}::BlaM était peu stable et T25::GPA_{TMS}::BlaM complètement dégradée. Nous avons donc essayé de stabiliser cette dernière fusion par allongement du linker entre T25 et GPA_{TMS}::BlaM par insertion de 4 résidus mais la nouvelle fusion n'a pas été visible par Western-blot. Le plasmide pKT25 (origine de répllication p15A) est un plasmide à moyen nombre de copies (une quinzaine) (Karimova *et al.*, 1998). Nous avons donc fait exprimer les fusions à partir du promoteur de pBluescript (pBS), un plasmide à grand nombre de copies. Les colonies portant le plasmide pBS Kan^R T25::GPA_{TMS}::BlaM ainsi construit ont présenté une résistance à l'ampicilline jusqu'à 50 ng/ mL (par comparaison, les colonies portant pBS T18::GPA_{TMS}::BlaM ont présenté une résistance jusqu'à 100 ng/ mL). Néanmoins, les deux fusions ont été visibles par Western-blot dans la souche *E. coli* (Figure III.7.B).

Les tests de double-hybride bactérien ont donné des résultats négatifs avec le couple T18::GPA_{TMS}::BlaM/ T25::GPA_{TMS}::BlaM (exprimés à partir de pBS Cm^R T18::GPA_{TMS}::BlaM et pBS Kan^R T25::GPA_{TMS}::BlaM). L'analyse des différentes combinaisons par Western-blot a mené à la conclusion que T25::GPA_{TMS}::BlaM est instable (Figure III.7.C). En l'absence de l'un des deux partenaires, nous n'avons pas pu vérifier la dimérisation du TMS de GPA dans le système du DHB.

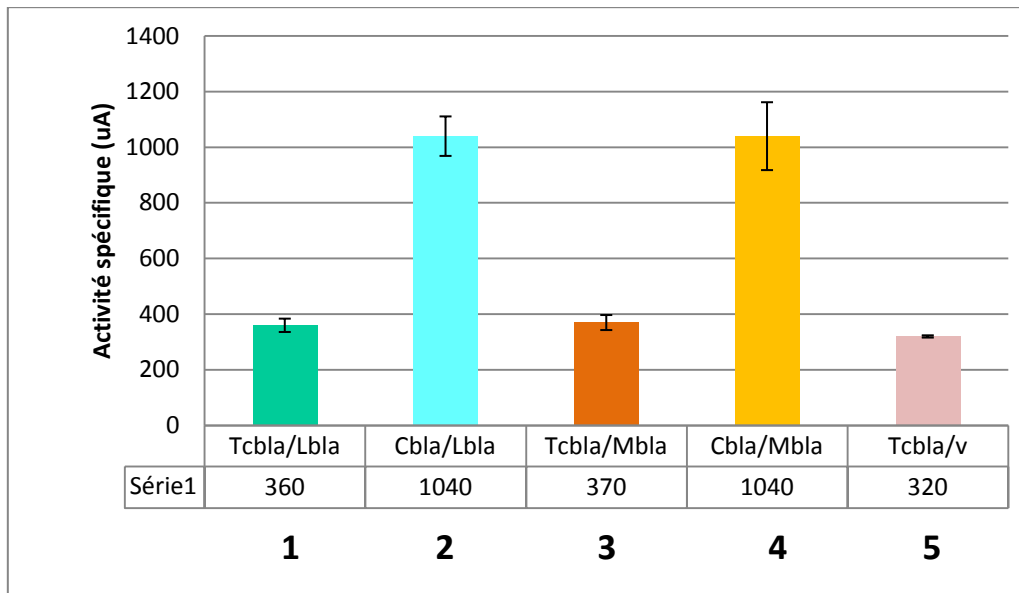
III. B. 2. 2) Utilisation du TMS de TetA

Nous avons alors voulu tester la fiabilité du DHB adapté aux TMS avec un TMS qui ne dimérise pas, comme témoin négatif. En effet, il semblait assez étonnant que presque toutes les combinaisons des fusions Cya::TMS::BlaM que nous avons testé aient donné des valeurs positives de β -galactosidase (Figure III.5). TetA est une protéine membranaire qui possède 14 TMS et qui donne la résistance à la tétracycline. Le premier TMS n'est pas capable de

A.

T25– *DLN*₄NALIVILGTVTLDAVGIGLVMPVLPGLLRD₃₅--BlaM

B.



C.

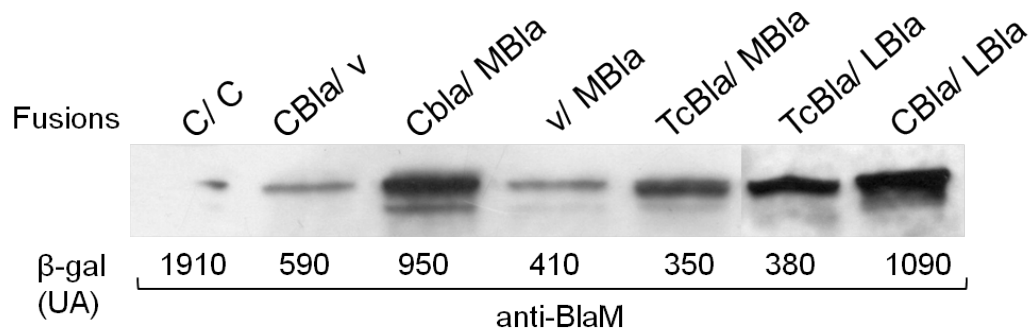


FIGURE III. 8 : Utilisation du TMS de TetA comme témoin négatif dans le double-hybride bactérien. (A) Séquence du premier TMS de TetA utilisée pour les fusions. Les résidus en italique sont les résidus modifiés pour la création d'un site de restriction BamHI. La séquence en gras est le TMS. (B) Diagramme de séries représentatives de dosages de l'activité β-galactosidase. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne de 2 à 4 mesures indépendantes d'une série de transformation. La première lettre correspond aux fusions des protéines Out correspondantes avec T18, la seconde aux fusions avec T25. Le vecteur vide est représenté par v. (C) Expression des triples fusions lors des expériences de DHB. Les cellules d'*E. coli* DHP1 exprimant les combinaisons de triples fusions Cya::TMS::BlaM ont été cultivées 20h à 30°C puis utilisées pour les dosages de β-galactosidase et pour une analyse des protéines par WB avec les anticorps anti-BlaM.

dimériser et a donc été utilisé comme témoin négatif dans les études d'interaction des protéines de la membrane interne (Bleves *et al.*, 1999). La séquence utilisée est présentée dans la figure III.8.A. T18 et T25 ont été fusionnés au N-terminus du premier TMS de TetA et BlaM a été fusionné au C-terminus de ce TMS. Les triples fusions obtenues ont été appelées T18::T_CTMS::BlaM et T25::T_CTMS::BlaM. Seuls les résultats avec T18::T_CTMS::BlaM ont été présentés ici (Figure III.8.B). Les fusions sont visibles par immunodétection avec les anticorps anti-BlaM et leur quantité semble stable dans toutes les combinaisons (Figure III.8.C).

Les activités de la β -galactosidase de T18::T_CTMS::BlaM/ T25::L_{TMS}::BlaM (Figure III.8.B, colonne 1) et T18::T_CTMS::BlaM/ T25::M_{TMS}::BlaM (colonne 3) sont égales au témoin négatif (colonne 5). Elles sont trois fois inférieures à celles des couples T18::C_{TMS}::BlaM/ T25::L_{TMS}::BlaM et T18::C_{TMS}::BlaM/ T25::M_{TMS}::BlaM, utilisés ici comme témoins positifs (colonnes 2 et 4).

Ces résultats suggèrent que les interactions décelées entre les TMS d'OutC, OutL et OutM par cette technique de DHB adaptée sont bien spécifiques des protéines étudiées.

Toutefois, les dosages de la β -galactosidase des combinaisons contenant la fusion T25::T_CTMS::BlaM ont donné des résultats variables, négatifs à positifs. Les quantités de fusions T25::T_CTMS::BlaM sur les Western-blot sont comparables aux autres triples fusions (non montré). A cause d'une forte variabilité des valeurs de l'activité de la β -galactosidase observée avec cette fusion, je n'ai pas présenté ces résultats.

III. B. 3) Application de la technique : étude d'un mutant d'OutC

Le double-hybride bactérien adapté à l'étude des segments transmembranaires a été utilisé pour rechercher les interactions entre les segments transmembranaires d'OutC, OutL et OutM. F. Login avait mis en évidence lors de sa thèse au laboratoire que la triple mutation R15V, Q29L, R36A dans le TMS d'OutC bloque la fonctionnalité et la dimérisation de la protéine (Login and Shevchik, 2006). Ces trois résidus sont placés sur la même face de l'hélice α transmembranaire (voir aussi projection hélicoïdale Figure III.14). Pour compléter

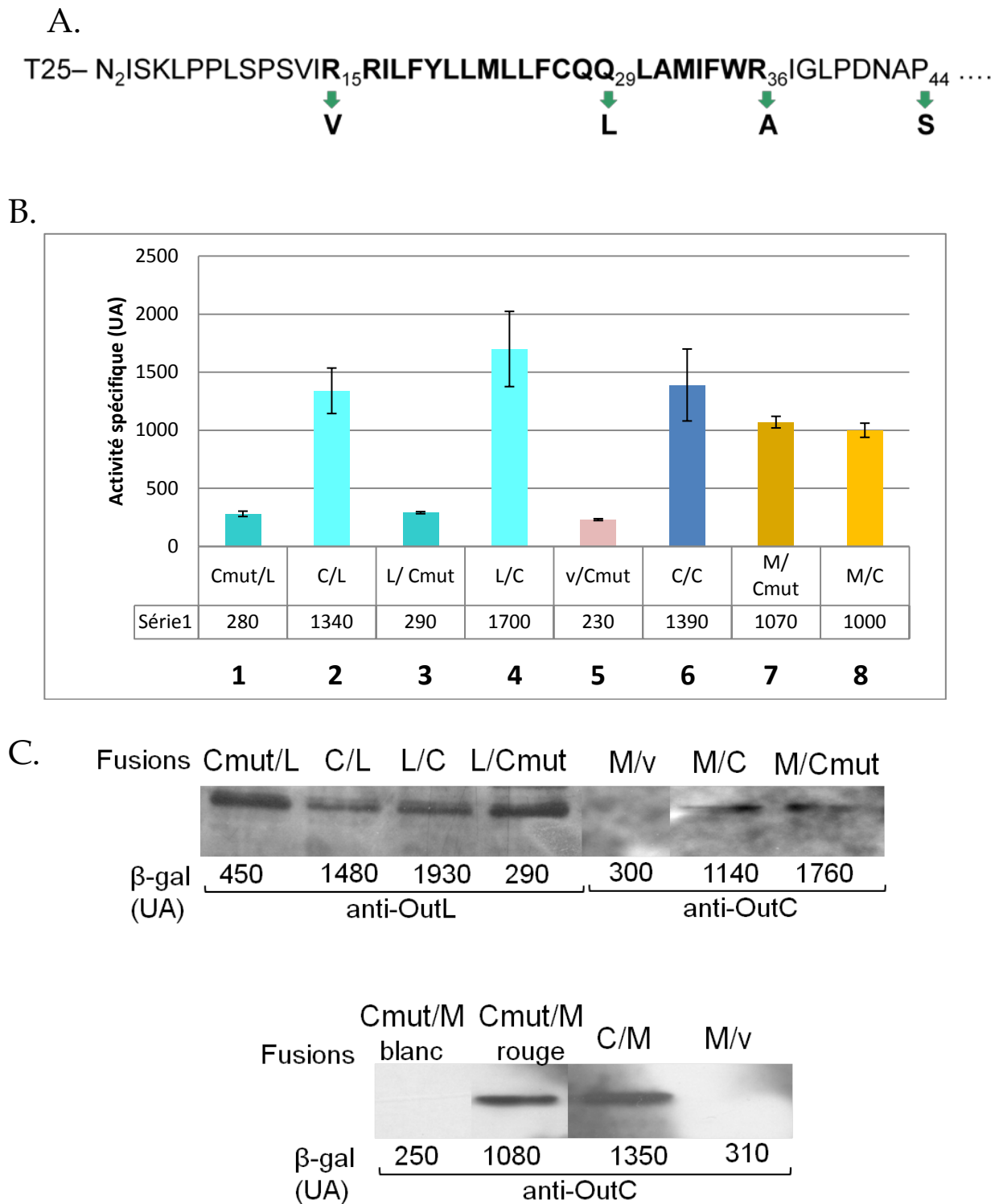


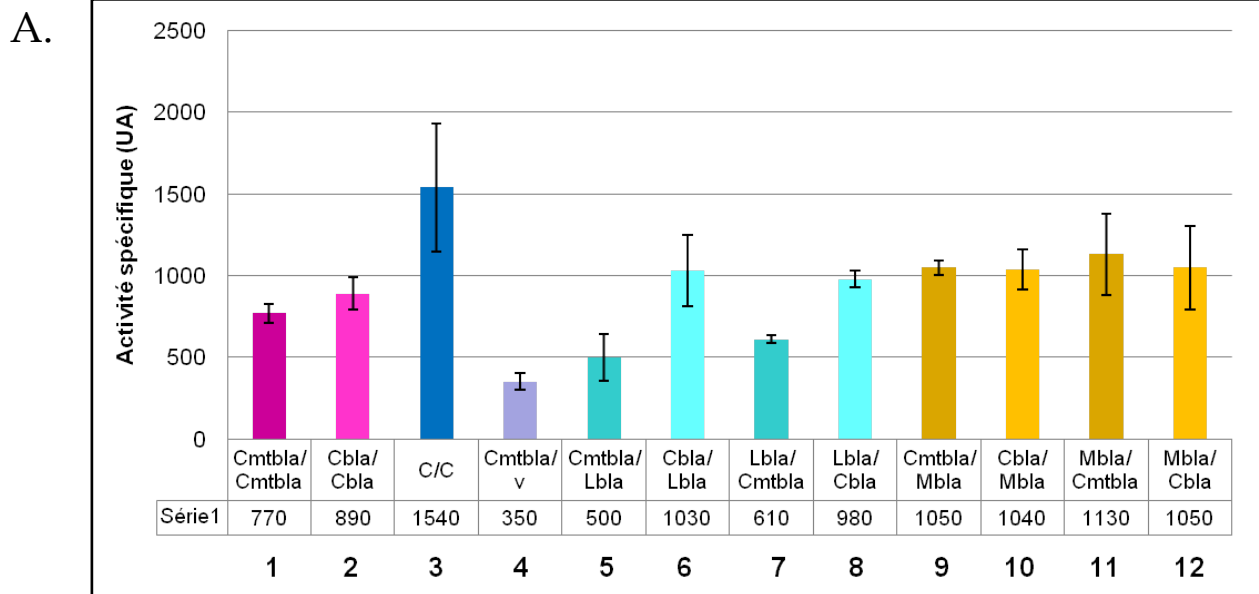
FIGURE III. 9 : Effet de la triple mutation dans le TMS d'OutC sur les interactions des protéines entières. (A) Séquence du TMS d'OutC (en gras). Les flèches montrent les substitutions pour créer les mutants d'OutC Cmut et Cqmut. (B) Diagramme d'une série représentative de dosages de la β-galactosidase. (C) Expression des fusions Cya avec les protéines entières lors d'expériences de DHB et analyse des quantités de fusions par WB. Les valeurs d'activité de la β-galactosidase sont indiquées en bas. Les précisions blanc/ rouge sont la couleur des colonies analysées.

cette étude, nous avons voulu analyser l'effet de cette triple mutation dans le TMS d'OutC sur les interactions avec OutM et OutL. La protéine OutC entière portant la triple mutation, appelée Cmut, a été fusionnée à T18 et T25 (Figure III.9.A).

Les colonies transformées avec le couple T18::OutCmut/ T25::OutCmut ont été très hétérogènes sur boîtes Mc Conkey maltose. Systématiquement, nous avons observé sur la même boîte des colonies blanches et rouges. Le séquençage de l'ADN plasmidique issu de ces deux types de colonies n'a révélé aucune mutation supplémentaire dans *outC*. L'un ou l'autre fusion coexprimée avec T18 ou T25 seul ne donne que des colonies blanches, phénotype attendu pour un témoin négatif. Les colonies coexprimant T18::OutCmut et T25::OutCmut semblent donc subir un stress provoquant des mutations extérieures au gène *outC*. Nous n'avons donc pas pu exploiter les dosages issus de ce couple.

Les bactéries transformées avec le couple T18::OutCmut/ T25::OutM présentent également ce double phénotype, nous n'avons donc pas poursuivi l'analyse de cette combinaison. En revanche, T18::OutM/ T25::OutCmut ne provoque pas de stress cellulaire : un seul phénotype, des colonies rouges, apparaît sur les boîtes Mc Conkey Maltose. Le dosage de l'activité β -galactosidase de ce couple a été fait en parallèle avec celui de T18::OutM/ T25::OutC. Le même niveau d'activité β -galactosidase a été observé avec les deux couples OutM/ OutC ou OutM/ OutCmut (Figure III.8.B, colonnes 7 et 8). La triple mutation dans OutC ne semble donc pas influencer l'interaction OutM/ OutC.

A quoi le phénomène de stress cellulaire et l'apparition de multiples mutations secondaires (« stress induced mutagenesis ») est-il dû ? Les couples Cmut/v et v/Cmut sont des témoins négatifs, les colonies attendues sont donc blanches. Il est impossible de savoir s'il y a apparition de mutations secondaires dans ces cas. La formation des colonies blanches apparaît dans le sens T18::OutCmut / T25::OutM, alors que ces deux protéines interagissent, causant l'apparition de colonies rouges. C'est pourquoi on peut penser que c'est l'expression de la fusion T18::OutCmut ou le plasmide pUT18C Cmut qui provoquent ce stress. Le séquençage de l'ADN plasmidique de T18::OutCmut issu de ces deux types de colonies n'a révélé aucune mutation supplémentaire dans *outC*. Nous avons analysé les fusions par Western-blot avec les anticorps anti-OutC. Il s'avère que dans les colonies blanches, la fusion T18::Cmut n'est pas visible (Figure III.9.C, en bas). Dans les colonies rouges, en revanche, T18::OutCmut dans le couple OutCmut/ OutM apparaît en quantité égale à T18::OutC dans le couple OutC/ OutM. Il semble donc que la coexpression de T18::OutCmut avec



B.

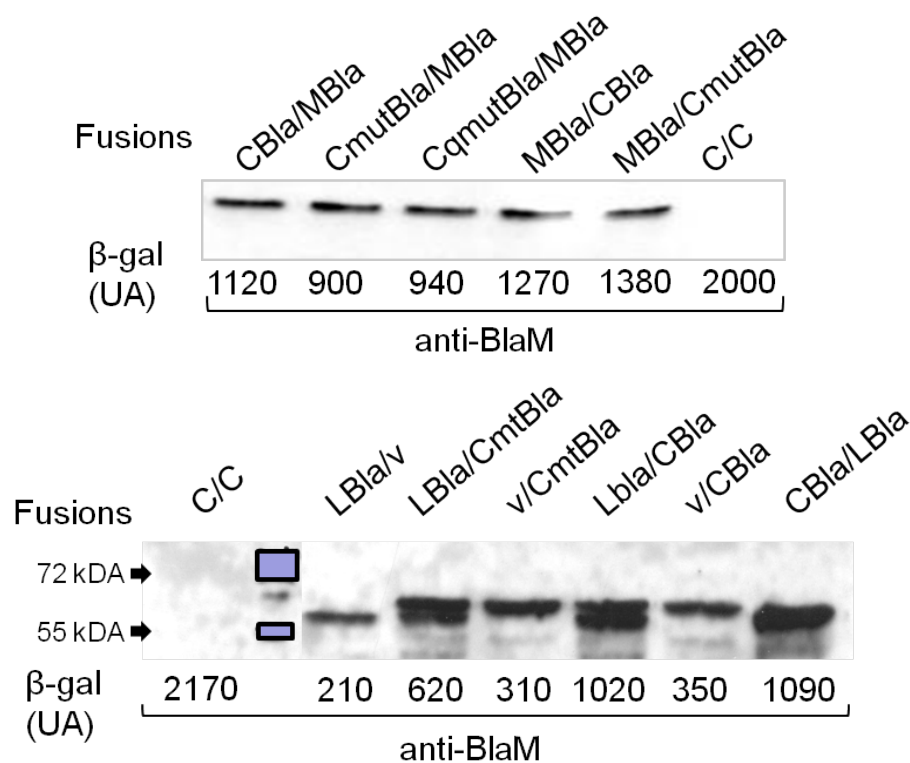


FIGURE III.10: Effet de la triple mutation dans le TMS d'OutC sur les interactions des triples fusions Cya::TMS::BlaM. (A): Diagrammes de séries représentatives de dosages de l'activité β-galactosidase. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne de 2 à 4 mesures indépendantes d'une série de transformation. Les premiers termes des couples correspondent aux fusions des protéines Out correspondantes avec T18, les seconds aux fusions avec T25. Le vecteur vide est représenté par v. (B) Expression des triples fusions Cya::TMS::BlaM lors d'expériences de DHB et analyse des quantités de triples fusions par WB.

T25::OutCmut ou avec T25::OutM favorise l'apparition de mutations secondaires diminuant ou arrêtant l'expression de T18::OutCmut.

Lorsque la fusion avec OutC mutée a été coexprimée avec Cya::OutLΔc (T18::Cmut/ T25::OutLΔc et T18::OutLΔc/ T25::Cmut), un seul phénotype (colonies blanches) a été observé sur boîtes Mac Conkey. Les valeurs de l'activité β-galactosidase observées avec ces couples (Figure III.9.B, colonnes 1 et 3) sont égales à celle du témoin négatif (colonne 5) et 4 fois inférieures à celles observées avec OutC (colonnes 2 et 4). La présence de la triple mutation dans OutC semble rompre l'interaction OutL/OutC.

Les Western-blots avec les anticorps anti-OutC montre que la quantité d'OutC et OutCmut (co-exprimées avec les fusions Cya::OutM) sont similaires (Figure III.9.C) et la quantité de fusions Cya::LΔc est même plus importante en présence du triple mutant (Figure III.9.C, en haut). On peut donc proposer que l'effet délétère de la triple mutation sur l'interaction OutL/ OutC et pas sur OutM/ OutC n'est pas dû à une diminution de la quantité de fusions mais bien de la rupture de l'interaction elle-même. Cependant, compte-tenu des phénotypes bizarres observés avec certains couples comportant Cmut, il faut considérer ces résultats avec précaution.

Nous avons ensuite construit les triples fusions Cya::TMS::BlaM portant le TMS muté d'OutC. La coexpression de ces fusions avec les autres triples fusions (comportant le TMS d'OutL ou OutM) n'a pas provoqué l'apparition de phénotypes « mélangés » sur boîtes Mac Conkey. Lorsque les fusions portant le TMS muté d'OutC (CmutBlaM) ont été co-exprimées ensemble dans la même cellule, la valeur de l'activité de la β-galactosidase a été légèrement inférieure à celle du couple de TMS d'OutC sauvage (Figure III.10.A, colonnes 1 et 2). La coexpression des triples fusions du TMS d'OutM avec celles du TMS d'OutC muté donnent des activités tout à fait égales à celles avec le TMS sauvage d'OutC (Figure III.10.A, colonnes 9 et 10 avec colonnes 11 et 12). La triple mutation n'a pas d'effet visible sur l'homodimérisation des TMS d'OutC et l'interaction entre les TMS d'OutC et OutM.

En revanche, la coexpression des fusions du TMS d'OutL avec celles du TMS d'OutC muté a provoqué une diminution de l'activité de la β-galactosidase (Figure III.10.A, colonnes 5 et 7 avec colonnes 6 et 8). Comme avec les fusions portant la protéine entière OutCmut et OutLΔc (Figure III.9.B), il y a une chute de l'expression des gènes rapporteurs. Néanmoins, l'activité de la β-galactosidase des couples T18::Cmut::BlaM/ T25::L_{TMS}::BlaM et

T18::L_{TMS}::BlaM/ T25::Cmut::BlaM ne descendent pas au niveau du témoin négatif (Figure III.10.A, colonnes 5 et 7 avec 4). On peut en conclure que la triple mutation dans le TMS d'OutC affecte l'interaction entre les TMS d'OutC et OutL.

Il est intéressant de dire que lors des constructions de triples fusions, une mutation spontanée P44S a été introduite par hasard lors de la mutagenèse dirigée dans Cya::Cmut_{TMS}::BlaM. Cette mutation est localisée juste après la région prédite du TMS (Figure III.9.A). Le quadruple mutant d'OutC Cya::Cqmut_{TMS}::BlaM est aussi stable que les autres triples fusions (Figure III.10.B). Les tests de double-hybride sur boîtes Mac Conkey maltose et dosages de l'activité β -galactosidase ont été faits mais ce quadruple mutant réagit exactement comme le triple mutant Cmut dans l'homodimérisation du TMS d'OutC, et les interactions avec les TMS d'OutL et OutM (non montré). Ceci montre que n'importe quelle mutation dans le TMS ou les régions proches n'affecte pas les interactions analysées.

L'analyse de toutes ces combinaisons par Western-blot a montré que l'introduction de la triple mutation dans OutC n'affecte pas la quantité de la fusion T18::Cmut_{TMS}::BlaM (Figure III.10.B, en haut) et T25::Cmut_{TMS}::BlaM (Figure III.10.B, en bas). Nous pouvons donc en conclure que la diminution de l'activité β -galactosidase observée avec les fusions du TMS d'OutL coexprimées avec celles du TMS d'OutCmut (Figure III.10.A, colonnes 5 et 7) par rapport à celles coexprimées avec les fusions du TMS d'OutC (colonnes 6 et 8) n'est pas due à une diminution de la quantité de l'un des partenaires mais bien à la diminution de la force d'interaction.

III. B. 4) Discussion et conclusion

Les interactions mises en évidence entre protéines entières OutC, OutL et OutM ont été précisées grâce à la dissection de ces protéines et l'utilisation de leurs régions isolées dans les expériences de DHB. Nous avons découvert plusieurs interactions entre les TMS de ces trois protéines par le double-hybride bactérien adapté à l'étude des TMS. Ce nouvel outil pourra être utilisé pour analyser les interactions entre les TMS d'autres protéines bitopiques de la membrane interne. La vérification de la localisation correcte des triples fusions se fait grâce à la présence de BlaM en C-terminal du segment d'intérêt. Les bactéries portant une triple fusion correctement insérée dans la membrane interne (avec BlaM dans le périplasme)

acquièrent une résistance à l'ampicilline. La localisation peut également être vérifiée par Western-blot par l'accessibilité de la fusion à l'action de la trypsine dans des sphéroplastes.

Afin de tester la fiabilité de cette technique, nous avons voulu l'employer avec deux autres TMS : le TMS de GPA et le premier TMS de TetA. La dimérisation de GPA par son TMS a servi à valider la technique TOXCAT (Russ and Engelman, 1999). Pour construire la triple fusion avec le TMS de GPA, nous avons fait synthétiser la séquence d'ADN codant le TMS en la bordant de sites de restriction puis l'avons fusionnée aux domaines de *cya* en 5' et à *blaM* en 3'. Malheureusement, les résultats issus de l'utilisation de ce TMS n'ont pas pu être exploités à cause d'une très faible production de la fusion T25::GPA_{TMS}::BlaM. En effet, les protéines issues d'une culture d'*E. coli* DHP1 (utilisée pour le double-hybride bactérien) transformées avec les plasmides pBluescript portant les fusions T18::GPA_{TMS}::BlaM et/ ou T25::GPA_{TMS}::BlaM ont été à peine visibles sur Western-blot. Ceci est cohérent avec les valeurs d'activité de la β -galactosidase négatives. Les fusions de T18 et T25 avec le mutant non-dimérique de GPA (G83I) avaient été faites mais, sans la dimérisation de GPA, n'ont été d'aucune utilité. Une très faible production de la triple fusion T25::GPA_{TMS}::BlaM peut être due à une faible stabilité. Nous avons tenté de limiter les encombrements stériques en allongeant le linker entre T25 et GPA_{TMS} et d'augmenter l'expression de la fusion en la mettant sur un plasmide à grand nombre de copies. Ces tentatives ont échoué. Une autre explication possible à la faible production de cette fusion pourrait être une traduction inefficace. Nous avons choisi les triplets de bases nucléotidiques en fonction de la liste d'apparition des triplets chez les entérobactéries (ecohigh.cod 1983). Par exemple, la leucine est codée par les triplets CUG, CUA, CUU, CUC. Les pourcentages d'apparition de chacun de ces triplets correspondent à 83%, 0%, 4% et 7%. Nous avons donc choisi le triplet CUG pour la leucine. Cependant, la traduction de ce peptide n'est peut-être pas efficace. Toutefois, l'explication d'une mauvaise stabilité de la fusion T25::GPA_{TMS}::BlaM me paraît plus convaincante. En effet, la séquence du TMS de GPA telle que nous l'avons utilisée dans le DHB est la même que celle utilisée auparavant lors des tests TOXCAT (Russ and Engelman, 1999). Cependant cette séquence semble être un peu courte par rapport aux TMS habituels de la membrane cytoplasmique bactérienne (18 à 23 résidus). De plus, du côté N-terminal de ce TMS, il n'y a pas d'acides aminés chargés positivement (souvent des arginines ou lysines) constituant un signal N-in pour les TMS de la membrane interne. De plus, les acides aminés aromatiques tryptophane, tyrosine et phénylalanine qui sont souvent localisés à la face externe de la membrane interne ne sont pas présents à cet endroit dans le TMS de GPA. Tous ces

facteurs réunis nous font penser à un problème de localisation des fusions qui résulterait en la dégradation de GPA_{TMS}.

Le premier TMS de TetA ne dimérise pas et a été utilisé comme TMS « neutre » dans des travaux antérieurs (Bleves *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 2004). Nous l'avons donc utilisé pour vérifier la spécificité des interactions observées entre les TMS du T2SS. La présence de la triple fusion T18::Tc_{TMS}::BlaM avec les TMS d'OutC, OutL ou OutM donne une activité de la β -galactosidase toujours négative, alors que les fusions sont bien visibles par Western-blot. La fusion T25::Tc_{TMS}::BlaM provoque des résultats variables, tantôt négatifs, tantôt positifs. Cette triple fusion avec le TMS de TetA a montré que les interactions entre TMS du T2SS sont bien spécifiques mais a également montré que cette technique a des limitations (résultats variables avec certaines fusions, instabilité ou faible production avec d'autres).

Les triples fusions portant les TMS d'OutC, OutL et OutM sont quant à elles correctement localisées et les résultats de dosages sont reproductibles. Il semble donc que la technique soit fiable mais certaines triples fusions peuvent être instables, éventuellement à cause d'encombrements stériques provoqués par la fusion de Cya en N-terminal et BlaM en C-terminal ou à cause de leur incorporation peu efficace dans la membrane interne. La vérification systématique de la quantité des fusions par Western-blot (avec les anticorps anti-BlaM) nous a permis d'écarter les données concluant à une absence d'interaction alors que l'une des deux fusions est absente.

Les expériences que j'ai réalisées avec le DHB adapté aux TMS montrent que six des sept couples de TMS testés interagissent entre eux. Nous avons pu suggérer grâce à ce travail que deux régions d'OutM, sa région périplasmique et son TMS, sont capables d'interagir avec elles-mêmes. Le fait qu'OutM entière ne dimérise pas en DHB, contrairement à son TMS et sa région périplasmique, reste inexpliqué. Les fusions d'OutM entière sont probablement moins stables à cause d'encombrements stériques.

D'après nos travaux, la dimérisation d'OutC en DHB n'est conduite que par les TMS tandis que la dimérisation d'OutL Δ c n'est conduite que par les régions périplasmiques : les TMS ne semblent pas interagir entre eux. Enfin, l'interaction entre OutL et OutM en DHB survient grâce aux régions périplasmiques et aux TMS de ces deux protéines.

Ensuite, les TMS des couples OutC/ OutL et OutC/ OutM sont capables d'interagir entre eux. Comme cela a été montré dans le chapitre I.B, il n'y a pas d'interactions entre les régions périplasmiques de ces couples. Le TMS d'OutC interagit avec celui d'OutL et celui d'OutM mais conduit également son homodimérisation. Le TMS d'OutC serait donc directement impliqué dans les trois interactions, avec lui-même et avec le TMS des deux autres composants du T2SS OutL et OutM. En même temps, sa région périplasmique semble être impliquée dans d'autres interactions. La région périplasmique d'OutC contient un domaine HR et un domaine PDZ. Ce dernier domaine a été décrit comme intervenant dans les interactions protéine/protéine (Jelen *et al.*, 2003). F. Login a montré dans ses travaux de thèse que le domaine PDZ d'OutC interagit avec une faible affinité avec certaines des exoprotéines (non publié) et un peptide du domaine HR est directement impliqué dans l'interaction avec 2 sous-domaines de la région périplasmique d'OutD (Login *et al.*, 2010). OutC pourrait être le lien entre i) le point de départ de la sécrétion, qui est la reconnaissance d'exoprotéines dans le périplasme, ii) la sécrétine OutD située dans la membrane externe et iii) les deux composants OutL et OutM qui font partie de la plateforme de la membrane interne. L'étude par double-hybride bactérien de l'effet d'une triple mutation R15V, Q29L, R36A dans le TMS d'OutC semble aller dans ce sens. En effet, les trois résidus mutés sont importants dans l'interaction des TMS d'OutC et d'OutL : l'activité de la β -galactosidase chute de moitié dans le couple OutCmut/ OutL par rapport à OutC/ OutL. Ces expériences ont également montré que la triple mutation R15V, Q29L, R36A n'a pas d'incidence sur l'interaction des TMS d'OutC et d'OutM. Ceci nous laisse fortement supposer que la surface d'interaction de l'hélice transmembranaire d'OutC avec celle d'OutL n'est pas la même qu'entre les hélices transmembranaires d'OutM et OutC.

Les résultats de double-hybride bactérien sont-ils cohérents avec les analyses d'OutC, OutL et OutM par pull down effectuées au laboratoire ? L'interaction entre les TMS d'OutM et OutL, repérée lors de nos expériences de double-hybride bactérien, n'a pas été trouvée par F. Login dans ses expériences de pull-down : His₆-OutL se fixe uniquement sur la matrice GST::OutMpéri et pas sur GST::OutMTMS. En revanche, ces expériences de pull-down suggèrent aussi qu'OutC/ OutL et OutC/ OutM interagissent entre elles via leur TMS mais pas par leur région périplasmique, ce qui est cohérent avec mes tests de double-hybride bactérien. De plus, ces expériences *in vitro* montrent que l'accrochage d'His₆-OutM sur OutC R15V/Q29L/R36A diminue de 15% uniquement avec le triple mutant par rapport à OutC sauvage, tandis que la diminution équivaut à 43% avec His₆-OutL. Ces résultats concordent

avec mes résultats obtenus en double-hybride bactérien : la triple mutation dans le TMS d'OutC affecte fortement son interaction avec le TMS d'OutL, mais pas celle avec le TMS d'OutM. Néanmoins, le triple mutant d'OutC ne dimérise plus *in vitro*, comme cela a été montré en pull-down (Login and Shevchik, 2006), alors que cette mutation ne semble pas avoir un effet négatif prononcé sur cette homodimérisation en double-hybride bactérien. Il est difficile de trancher pour l'une ou l'autre conclusion, étant donné les limitations de chaque technique. Une troisième approche serait nécessaire pour conclure sur l'effet de cette triple mutation sur l'homodimérisation du TMS d'OutC.

En pull-down, His₆-OutM ne se fixe pas sur GST::OutM_{TMS} (Thèse de F. Login). Mais la quantité de His₆-OutM fixée sur GST::OutM est 2 fois plus élevée que celle fixée sur GST::OutMpéri. La région périplasmique est donc suffisante à la dimérisation d'OutM *in vitro* mais le TMS d'OutM semble renforcer cette homodimérisation. Cependant, l'analyse par filtration sur gel montre qu'OutMpéri est monomérique et OutM entière dimérique *in vitro* (Thèse de F. Login). Ces derniers résultats sont incohérents avec les données de la littérature : les régions périplasmiques d'homologues d'OutM, EpsM et PilO, forment des homodimères stables *in vitro* (Johnson *et al.*, 2007 ; Sampaleanu *et al.*, 2009)

Pour le dimère d'OutC, la délétion du TMS empêche toute interaction de la partie restante (région périplasmique) *in vitro* (Login *et al.*, 2006), ce qui est cohérent avec mes résultats de DHB. Enfin, en pull-down, la région cytoplasmique et la région périplasmique d'OutL dimérisent chacune indépendamment. Mais une fusion de la GST avec le TMS d'OutL seul n'a pas été construite ; son implication dans l'homodimérisation de la protéine n'a donc pas pu être déterminée.

Dans les travaux précédents sur des protéines homologues d'OutC, OutL et OutM, le remplacement du TMS de XcpP (GspC) par le premier TMS de TetA a montré que le TMS est nécessaire à la fonctionnalité de XcpP (Bleves *et al.*, 1999). La mutagenèse par insertion de peptides dans XcpZ (GspM) avait permis de détecter trois régions potentiellement impliquées dans les interactions avec XcpY (GspL) puisque l'insertion de tétra ou pentapeptides dans ces régions de XcpZ a provoqué la dégradation de XcpY (Figure I.15.C) (Robert *et al.*, 2002). Deux de ces régions se trouvent dans la région périplasmique et ont été discutées dans le chapitre I. La troisième se trouve à la fin du TMS de XcpZ (GspM), entre les résidus 45 et 58. Nous avons montré une interaction directe des TMS d'OutL et OutM, ce qui est cohérent avec les résultats ci-dessus. D'autre part, les auteurs d'une étude sur EpsL de *V.*

Motif	Occurrences	Expected	STD	P value	Ratio
WxxW	419	303	16	0	1.38
QxxW	161	183	14	0.024915	0.88
WxxS	775	800	27	0.179367	0.97
YxxY	721	597	22	9.99E-16	1.21
QxxY	200	263	14	1.08E-10	0.76
YxxS	1187	1128	32	0.010048	1.05
FxxF	4879	4878	66	0.9886	1.00
QxxF	682	682	26	0.9865	0.99
FxxS	3510	3324	44	3.71E-09	1.05

FIGURE III. 11 : Nombre attendu de motifs contenant des résidus aromatiques et nombre d'apparitions dans une base de données de TMS bactériens. STD : standard deviation. Les motifs WxxW et YxxY sont sur-représentés dans les TMS par rapport à leur probabilité d'apparition (d'après Sal-Man *et al.*, 2007).

cholerae ont suggéré une interaction entre le TMS d'EpsL (ou les régions proches) avec EpsM (Sandkvist *et al.*, 2000). Nous avons montré que la région périplasmique proche du TMS d'OutL n'est pas impliquée dans une interaction avec OutMpéri (Chapitre I.B.2) et par contre que les TMS d'OutL et OutM peuvent interagir en DHB. Dans EpsL, la région indispensable pour la stabilité d'EpsM comprenait 40 résidus adjacents au TMS qui seront localisés dans le cytoplasme. Bien que l'on ne puisse pas exclure qu'une interaction pourrait intervenir entre les régions cytoplasmiques d'OutL et d'OutM, seuls les 5 résidus en N-terminal du TMS d'OutL et 13 des 16 résidus cytoplasmiques d'OutM sont présents dans nos constructions. Il semble donc bien que les TMS soient le moteur des interactions intervenant dans ces régions. En considérant ces résultats obtenus dans *V. cholerae*, il pourrait être intéressant d'utiliser dans les expériences de DHB les TMS d'OutL et OutM allongés du début de la région périplasmique jusqu'au domaine du type ferrédoxine. En effet, la première hélice α de la région périplasmique des deux protéines est considérée par certains programmes (comme Jpred) comme la prolongation de l'hélice α transmembranaire. Ainsi l'utilisation de ces régions des deux protéines ensemble pourrait éventuellement mettre en évidence de nouvelles interactions ou mieux visualiser celles déjà observées.

Les travaux de Lee et collaborateurs (2001) ont montré que dans un mutant *xpsN* (*gspC*), la quantité de XpsL et XpsM était fortement diminuée, suggérant la protection de ces deux protéines par XpsN, puis ces auteurs ont montré que XpsL et XpsM apparaissaient en quantité égale dans un mutant *xpsN* complémenté par XpsN ou XpsN_{TMS} et ne sont plus détectables quand le TMS de XpsN est remplacé par le premier TMS de TetA. Enfin, XpsL et XpsM ont été co-éluées avec XpsN_{TMS} (Lee *et al.*, 2004). Ceci suggérait l'importance de la présence du TMS de GspC pour la stabilisation de GspL et GspM et nos résultats montrant une interaction directe *in vivo* entre les TMS d'OutC, OutL et OutM corroborent ces données.

Pourquoi trois couples apparaissent-ils positifs en double-hybride (CmutBlaM/ CmutBlaM, LBlam/ MBlam et MBlam/ MBlam) tandis que les expériences de pull-down ne suggèrent pas d'interaction entre ces TMS? Des limitations propres à chacune de ces techniques pourront en être la cause. Par exemple, dans le cas du pull-down, l'utilisation de protéines isolées et purifiées en présence d'un détergent. Néanmoins, concernant une interaction entre les TMS d'OutL et OutM, l'analyse des régions d'EpsL stabilisant EpsM a suggéré que le TMS d'EpsL était impliquée dans une interaction (Sandkvist *et al.*, 2000). Les résultats de double-hybride semblent donc plus cohérents avec ces données que ceux de pull-

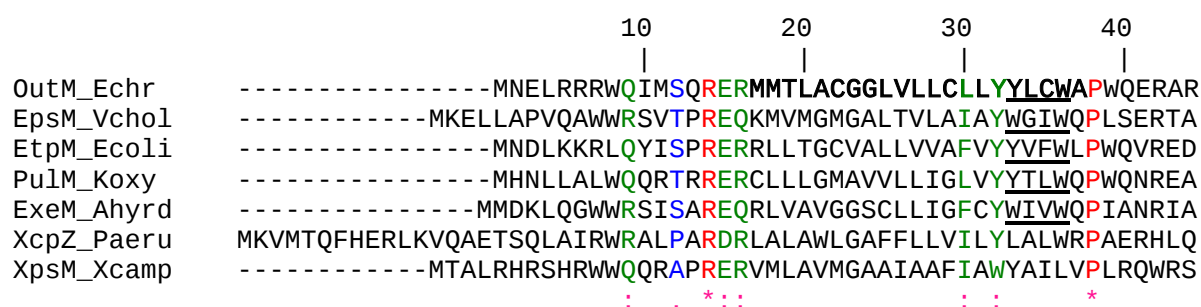


FIGURE III. 12 : Alignement de la région contenant le TMS de 7 membres de la super-famille GspM (par CLUSTALW). En gras : TMS d'OutM. Sont montrés *Erwinia chrysanthemi*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Xanthomonas campestris*. Souligné : présence d'un motif résidu aromatique-X-X-aromatique.

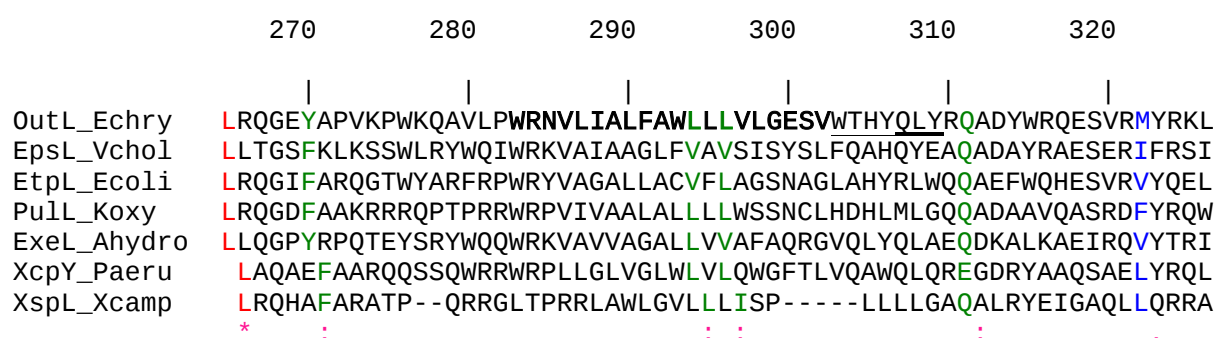


FIGURE III. 13 : Alignement de la région contenant le TMS de 7 membres de la super-famille GspL (par CLUSTALW). En gras : TMS d'OutL. Sont montrés *Erwinia chrysanthemi*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Xanthomonas campestris*.

down. Les expériences de pull-down n'ont pas permis de détecter une interaction directe entre les TMS d'OutM mais les résultats avec la protéine entière suggèrent leur implication dans la dimérisation. Quant au couple CmutBlaM/ CmutBlaM, l'analyse des différentes données ne me permet pas de pencher pour l'une ou l'autre conclusion. La triple mutation bloque la sécrétion de pectinases, donc le système de sécrétion (Login and Shevchik, 2006). Cela démontre clairement que la fonctionnalité de la protéine mutée est complètement bloquée. Puisque OutCmut n'est plus capable de dimériser, au moins *in vitro*, nous avons suggéré que la dimérisation d'OutC est indispensable à la fonctionnalité du T2SS. Cependant, comme le triple mutant perd fortement sa capacité à interagir avec OutL, la sécrétion peut aussi être bloquée à cause de cette perte d'interaction entre les TMS d'OutC et OutL. Dans tous les cas, ces résultats démontrent l'importance des interactions entre TMS des protéines de la membrane interne du T2SS, prouvant ainsi que les TMS ne sont pas seulement des points d'ancrage à la membrane.

Nous avons détecté, grâce à l'adaptation de la technique du double-hybride bactérien, une homodimérisation du TMS d'OutM. Or, la capacité du TMS d'EpsM (homologue d'OutM chez *V. cholerae*) à dimériser a été montrée récemment par Sal-Man et associés (Sal-Man *et al.*, 2007) par la technique TOXCAT. Le principe de cette technique a été expliqué auparavant (introduction chapitre III). Les auteurs ont mis à jour un nouveau mécanisme d'interaction entre 2 hélices α transmembranaires : résidu aromatique-X-X-aromatique (Figure III.11). Dans EpsM, il existe un motif W-G-I-W à la fin du TMS. Lorsque les deux résidus aromatiques sont remplacés par une alanine, l'activité du rapporteur ToxR devient nulle. Ces deux acides aminés seraient donc indispensables à la dimérisation d'EpsM. Il faut néanmoins émettre certaines réserves sur cette suggestion. Premièrement, le remplacement d'un seul W par A ne change pas la force d'interaction des TMS d'EpsM. Deuxièmement, il n'est pas correct de remplacer les résidus hydrophobes d'un TMS par un résidu dit « inerte » comme l'alanine. Il aurait fallu remplacer le tryptophane par une leucine par exemple. Par alignement de séquence, nous avons vu dans OutM un motif Y³³-L-C-W³⁶ (Figure III.12). Ce motif n'est pas un double tryptophane séparé par deux résidus quelconques comme dans EpsM. Le nombre attendu et le nombre d'occurrences d'un motif Y-X-X-W dans les TMS de la famille GspM n'a pas été présenté (Figure III.11) mais Sal-Man et collègues ont montré que la mutation ponctuelle du premier tryptophane en tyrosine dans le TMS d'EpsM n'affecte aucunement la force d'interaction. Un motif résidu aromatique-X-X-aromatique est également présent au même endroit chez trois autres proches homologues d'EpsM (Figure III.12). Lors

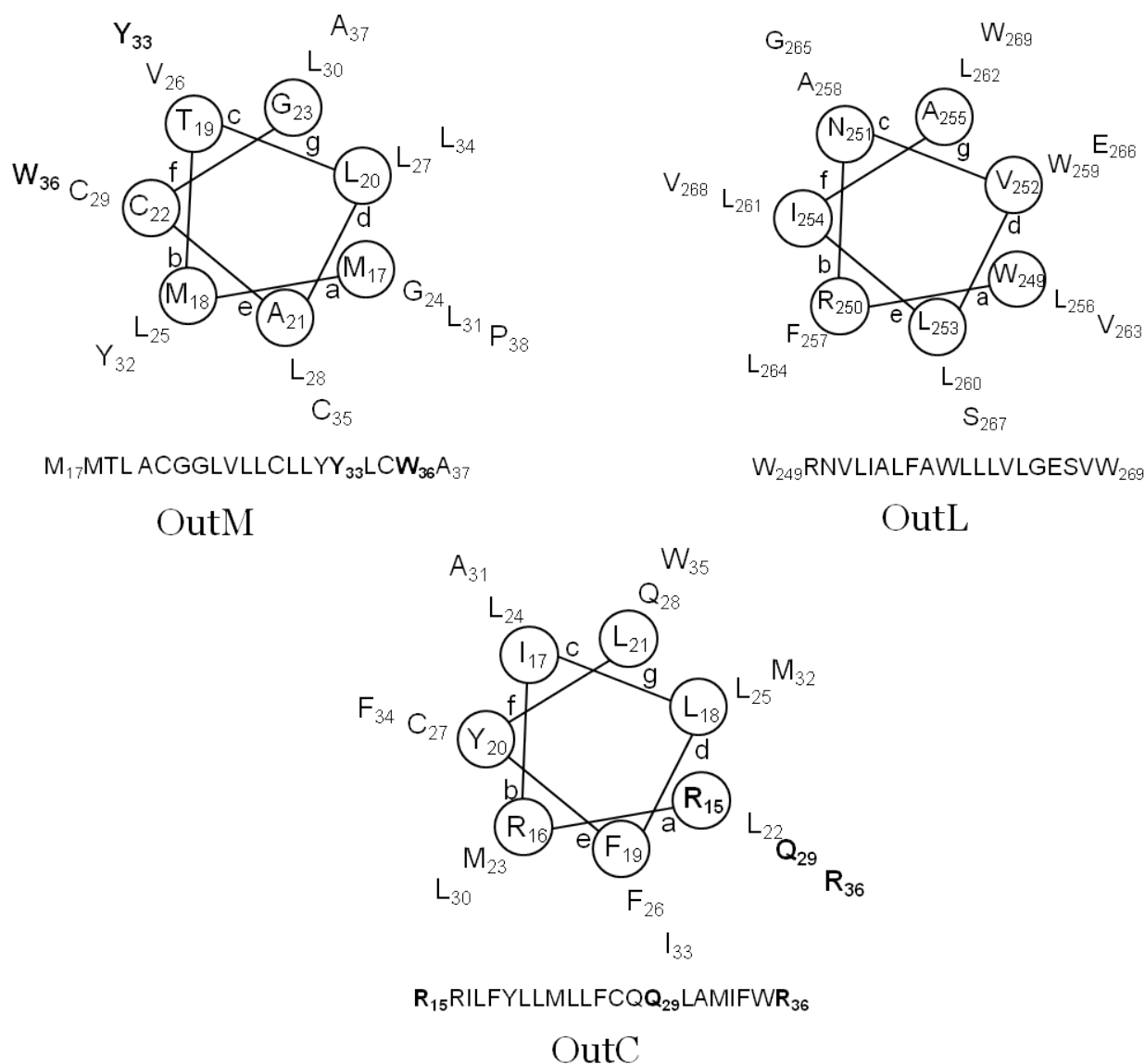


FIGURE III. 14 : Projection hélicoïdale des hélices α des TMS d'OutM, OutL et OutC. Les résidus en gras dans le TMS d'OutM représentent le motif résidu aromatique-X-X-aromatique. Les résidus en gras dans le TMS d'OutC représentent les trois résidus mutés dans le mutant Cmut.

de ma thèse, les triples fusions d'OutM ont été construites de telle manière que ce motif Y³³-L-C-W³⁶ est présent. Il est donc peut être impliqué dans l'interaction comme dans EpsM. Cette hypothèse est renforcée par la présence d'un motif W-X-X-W ou Y-X-X-W dans plusieurs homologues d'OutM. De plus, le résidu Y³² est très conservé parmi tous les membres de la famille GspM présentés dans la figure III.12 et pourrait jouer un rôle important : les résidus Y³²Y³³XXW³⁶ sont localisés sur la même face large de l'hélice α transmembranaire et peuvent donc constituer une interface hydrophobe lors de l'homodimérisation du TMS d'OutM (Figure III.14).

Dans les constructions T25::OutMpéri et T18::OutMpéri, les domaines de Cya ont été fusionnés au 37^{ème} acide aminé d'OutM. C'est à partir du 38^{ème} acide aminé d'OutM que commence le dérivé périplasmique utilisé dans le DHB. Le motif Y-L-C-W n'est donc pas présent dans cette fusion. L'homodimérisation de la région périplasmique d'OutM n'est donc bien due qu'au motif de type ferrédoxine (voir chapitre I.B.2.1).

Les régions cytoplasmiques d'OutL sont capables de dimériser (Py *et al.*, 1999), ainsi que les régions périplasmiques (ce travail et Py *et al.*, 1999) mais, d'après nos résultats, le TMS isolé n'est pas capable de dimériser. De toutes les combinaisons de triple fusions testées, T18::L_{TMS}::BlaM/ T25::L_{TMS}::BlaM est la seule à ne pas réagir. En amont et en aval du TMS, les régions d'OutL sont capables de dimériser. L'absence d'homodimérisation du TMS d'OutL pourrait laisser plus de flexibilité aux multimérisations (au moins dimérisation) des régions solubles, qui pourraient avoir une implication fonctionnelle différente et/ ou ne pas se produire en même temps. Ceci semble probable étant donné que le TMS d'OutL serait impliqué dans les interactions avec les TMS d'OutC et OutM.

En cohérence avec mes résultats, la projection hélicoïdale de l'hélice transmembranaire d'OutL (Figure III.15) n'a mis en évidence aucun motif connu pour induire l'homodimérisation d'un TMS, motif G-XXX-G (Kim *et al.*, 2005), motifs leucine zipper (Gurezka *et al.*, 1999), association des hélices transmembranaires via des résidus polaires (Zhou *et al.*, 2001 ; Gratkowski *et al.*, 2001) et résidu aromatique-X-X-aromatique (Sal-Man *et al.*, 2007). Ces points sont un argument pour valider le fait que les TMS d'OutL ne seraient pas capables de dimériser au sein de la machinerie de sécrétion, comme ils ne le sont pas en DHB. En revanche, la projection hélicoïdale de l'hélice transmembranaire d'OutM (Figure III.15) montre que les résidus aromatiques décrits plus haut, Y³²Y³³XXW³⁶ sont placés sur la même interface. Cette interface contient également deux cystéines C22 et C29. Dans les

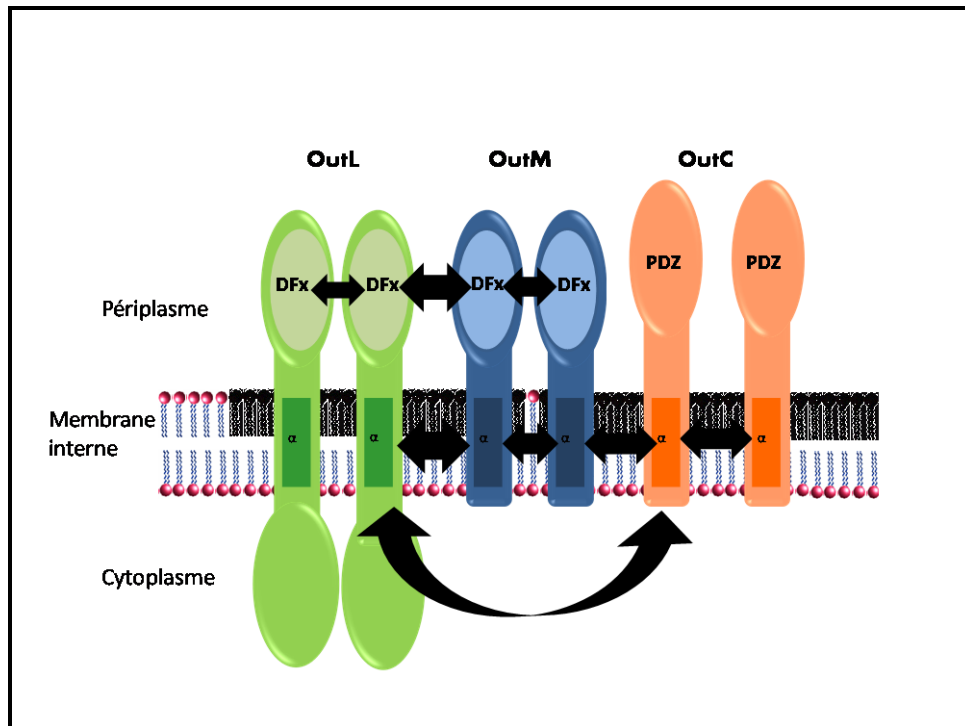


FIGURE III. 15 : Représentation schématique récapitulative des interactions décelées par double-hybride bactérien entre les protéines OutC, OutL et OutM du système de sécrétion de type II d'*E. chrysanthemi*. Les flèches symbolisent les interactions et leur épaisseur la force d'interaction. Sont représentées les interactions décelées entre les régions périplasmiques et entre les TMS des trois protéines.

conditions de cross-linking oxydatif *in vitro* et dans la souche *E. coli* NM522, un dimère d'OutM a été observé (Travaux non publiés du laboratoire). Une troisième cystéine naturelle C35 est située sur une autre face du TMS d'OutM et pourrait aussi être impliquée dans la formation d'un pont disulfure intermoléculaire avec le TMS d'OutM ou d'un autre composant du T2SS. Une étude par mutagenèse dirigée serait indispensable pour établir lequel de ces trois résidus cystéine du TMS d'OutM est situé à l'interface d'interaction M_{TMS}/M_{TMS} . Par ailleurs, le cystéine-scanning dans le TMS d'OutC et d'OutL permettra aussi d'éclaircir les mécanismes moléculaires d'interactions et d'établir les interfaces d'interaction entre ces TMS. Dans une autre interface de l'hélice transmembranaire d'OutM, trois leucines superposées ($L^{20}L^{27}L^{34}$) forment très probablement un motif leucine zipper, et pourraient être impliquées dans une interaction du TMS d'OutM avec lui-même ou avec le TMS d'un autre composant du T2SS.

Il a été montré que deux composants du T2SS localisés dans la membrane interne, OutL et OutF, interagissent avec l'ATPase cytoplasmique OutE (Py *et al.*, 2001). L'activité d'OutE est significativement augmentée lorsqu'une petite partie de la région cytoplasmique d'OutL interagit avec les phospholipides de la membrane interne (Camberg *et al.*, 2007). Nous avons mis en évidence plusieurs autres interactions entre OutC, OutL et OutM (Récapitulatif figure III.15). Nous connaissons maintenant un bon nombre d'interactions dans le périplasme, dans la membrane cytoplasmique et dans le cytoplasme. Il existe donc un fort réseau d'interactions entre les protéines du T2SS. Le T2SS sécrète spécifiquement les pectinases et doit se mettre en route en leur présence. Nous pensons qu'un signal doit être transmis du périplasme (reconnaissance des pectinases) au cytoplasme (pour l'activation de l'ATPase OutE). Les changements conformationnels induits par l'interaction entre OutC, OutD et les pectinases pourraient donc être transmis via les TMS des protéines de la membrane interne (OutC, OutL et OutM). Ceci conduirait à l'activation de l'ATPase OutE. Cet « engrenage » impliquerait des changements conformationnels (rotation, glissement, ou autre ?), des interactions transitoires et une ordonnance bien précise de ces interactions.

Dans la pléiade d'interactions mises à jour, certaines pourront être transitoires et d'autres permanentes, mais lesquelles ? Même si une activité β -galactosidase forte peut correspondre à la même interaction dans le système de sécrétion, la technique du double-hybride bactérien ne nous permet pas de dire si cette même interaction est aussi forte au sein du T2SS et si cette interaction sera affectée (renforcée ou diminuée) en présence d'autres composants du

système. La technique du pull-down ne peut pas non plus répondre à ces questions, car les deux ou trois protéines à étudier sont isolées de leur environnement naturel, dotées de tags d'affinité et mises en présence de détergents. Lors du processus de sécrétion, certaines interactions protéines-protéines bipartitaires peuvent être renforcées ou interrompues par une autre protéine. Mes travaux de thèse ont mis à jour un de ces phénomènes, qui fera l'objet du chapitre IV.

TABLEAU IV.1

Plasmides utilisés dans ce chapitre

Plasmide	Caractéristiques	Référence
Vecteurs de double-hybride bactérien		
pUT18C Cpéri-Dpéri	pUT18C portant 'outC tronqué (aa 40-272) fusionné en 5' au gène T18 suivi de 'outD' tronqué (aa 28-285)	Laboratoire
pKT25 Cpéri-Dpéri	pKT25 portant 'outC tronqué (aa 40-272) fusionné en 5' au gène T18 suivi de 'outD' tronqué (aa 28-285)	Laboratoire
pUT18C Dpéri	pUT18C portant 'outD' tronqué (aa 28-285) fusionné en 5' au gène T18	Laboratoire
Vecteurs de co-purification		
pGE6X Cpéri-Dpéri	pGE6X portant 'outC tronqué (aa 40-272) fusionné en 5' au gène GST suivi de 'outD' tronqué (aa 28-285)	Login <i>et al.</i> , 2010
PGE6X CΔBX-DΔC	pGE6X portant 'outC tronqué (aa 139-272) fusionné en 5' au gène GST suivi de 'outD' tronqué (aa 28-112)	Login <i>et al.</i> , 2010
pGE6X CΔBX-DΔNS	pGE6X portant 'outC tronqué (aa 139-272) fusionné en 5' au gène GST suivi de 'outD' tronqué (aa 116-285)	Login <i>et al.</i> , 2010
pGE6X CΔBX-DΔC-DΔNS	pGE6X portant 'outC tronqué (aa 139-272) fusionné en 5' au gène GST suivi de 'outD' tronqué (aa 28-112, 116-285)	Login <i>et al.</i> , 2010
pACYC GST::Lpéri	GST::Lpéri de pGEX Lp, cloné dans pACYC, Tet ^R	Ce travail

Chapitre IV : étude du phénomène de dissociation du complexe OutCpéri/ OutDpéri par OutLpéri

A) Phénomène en double-hybride bactérien

IV. A. 1) Premières observations

Il a été récemment montré que les régions péripasmiques d'OutC et OutD interagissaient entre elles (Login *et al.*, 2010). Ces deux protéines seraient responsables de la spécificité du système : contrairement aux autres composants du T2SS, elles ne peuvent pas être remplacées par un homologue sans affecter la fonctionnalité du système. Les régions péripasmiques d'OutC et d'OutD semble être impliquées dans la reconnaissance des protéines à sécréter (Bouley *et al.*, 2001). Selon notre hypothèse de travail, cette reconnaissance des exoprotéines dans le périplasme sera le déclencheur d'une cascade d'interactions aboutissant à l'activation de l'ATPase OutE. N'ayant trouvé aucune interaction entre OutCpéri et OutLpéri ou OutMpéri, nous avons suggéré qu'une interaction simultanée des deux protéines OutC et OutD avec OutL ou OutM pouvait être le lien entre l'interaction avec les pectinases et la transduction du signal.

Pour tester cette hypothèse, nous avons construit des plasmides qui co-expriment la région N-terminale d'OutD (dépourvue du peptide signal) avec les fusions Cya::OutCpéri : pUT18C::Cpéri-Dpéri et pKT25::Cpéri-Dpéri (Tableau IV.1 ; Figure IV.1 ; Figure IV.2). En utilisant ces constructions, nous avons voulu voir si la présence d'OutDpéri allait influencer les interactions potentielles d'OutCpéri (Cya::OutCpéri) avec les régions péripasmiques d'OutL et d'OutM.

Etonnamment, la coexpression d'OutDpéri avec T18::OutCpéri a conduit à une forte augmentation de l'expression des gènes rapporteurs (observés sur boîtes Mac Conkey maltose et par les dosages de l'activité de la β -galactosidase). En effet, comme on peut le voir sur la figure IV.3, l'activité de base de cette combinaison T18::Cpéri-Dpéri/ v correspond à celle d'une interaction alors qu'elle devait être un témoin négatif comme v/ T25::Lpéri (Figure IV.3, colonnes 3 et 6). Les autres témoins négatifs, une fusion avec un vecteur vide, donnent

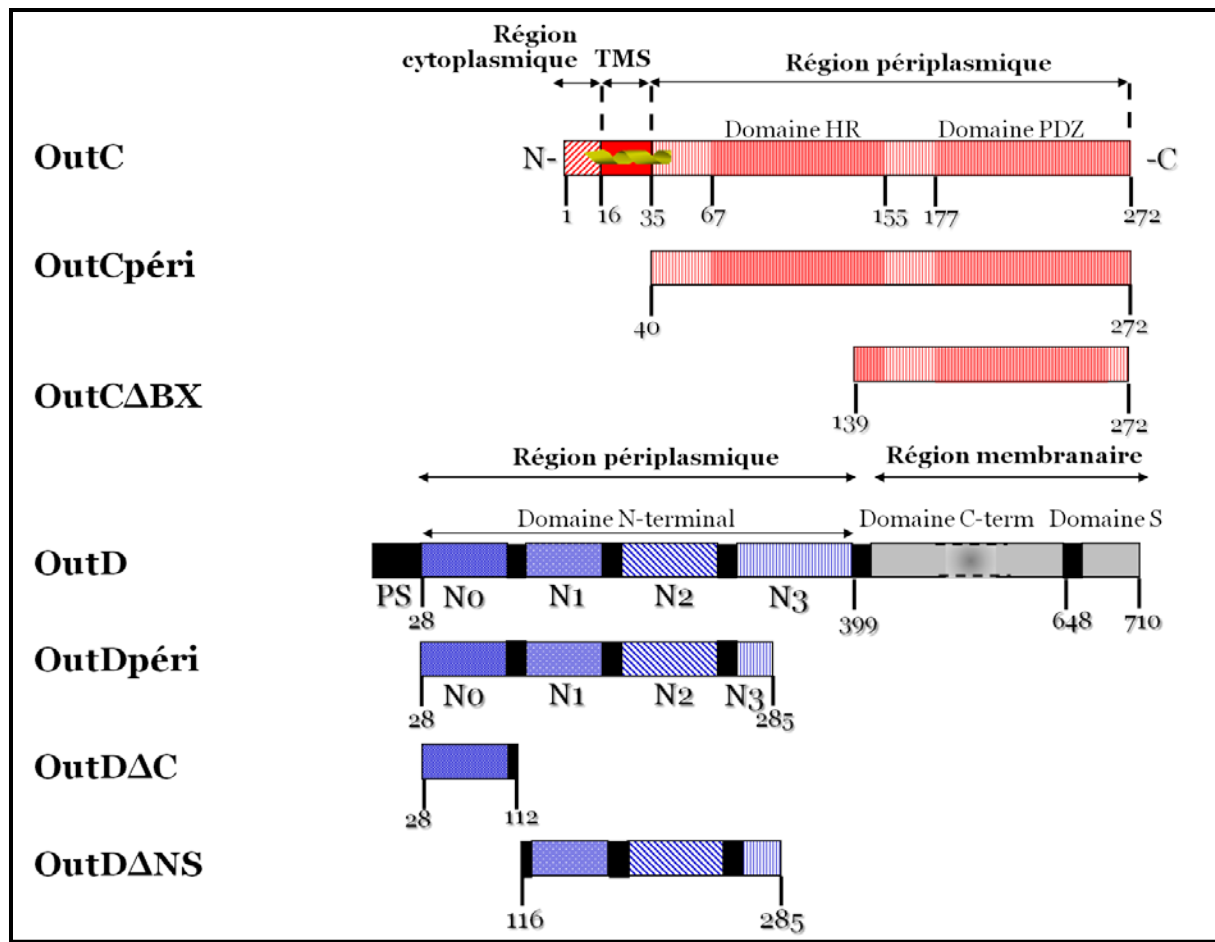


FIGURE IV.1 : Représentation schématique d'OutC et OutD et de leurs dérivés utilisés dans cette étude. PS : peptide signal.

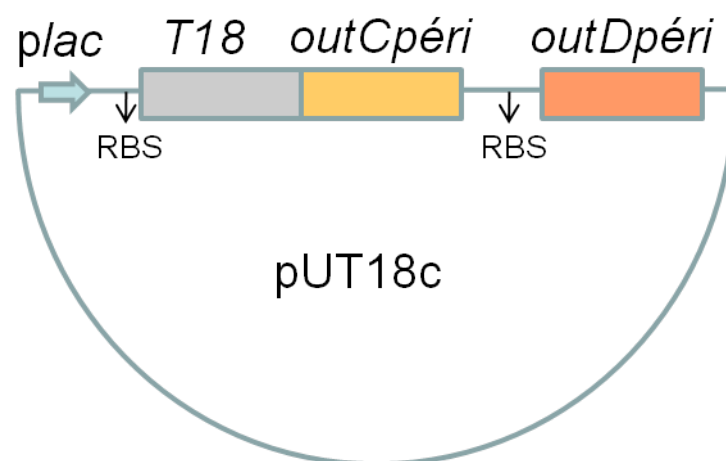


FIGURE IV.2 : Représentation schématique de la construction des fusions T18::OutCpéri co-exprimé avec OutDpéri. Les fusions sont sous le contrôle du promoteur *plac*. RBS : Ribosome binding site (site de fixation du ribosome).

une activité β -galactosidase de base, aux alentours de 200 UA comme on peut le voir avec v/T25::OutLpéri (Figure IV.3, colonne 6). Cette activité élevée observée avec T18::OutCpéri-OutDpéri/v est récurrente dans toutes les séries de transformations. Les combinaisons de cette fusion avec T25::OutMpéri et T25::OutLpéri-OutMpéri présentent également une activité β -galactosidase élevée (Figure IV.3, colonnes 4 et 5). En revanche, l'activité β -galactosidase du couple T18::OutCpéri-OutDpéri/ T25::OutLpéri est beaucoup moins importante : il y a une diminution de cette forte activité de base (Figure IV.3, colonne 2).

L'analyse par Western-blot des échantillons correspondants à ces dosages a révélé que la quantité de T18::OutCpéri ainsi que celle d'OutDpéri était fortement diminuée en présence de T25::Lpéri par rapport à la présence de T25 seul, T25::OutMpéri ou T25::OutLpéri-OutMpéri (Figure IV.4). Pourtant, dans cette série de transformation, la quantité de T25::OutLpéri ne semble pas être grande car la protéine n'a été visible que lorsqu'elle a été co-exprimée avec OutMpéri. Ceci est cohérent avec ce qui a été observé précédemment (Figure I.8) : cette fusion n'est visible que co-exprimée avec OutMpéri. Ainsi, malgré sa présence en faible quantité, OutLpéri entraîne la diminution de la quantité d'OutCpéri et OutDpéri, qui est probablement la cause majeure de la diminution de l'activité β -galactosidase.

De manière surprenante, la fusion OutCpéri-OutDpéri réalisée avec T25 (T25 ::Cpéri-Dpéri) n'a pas provoqué une activité de β -galactosidase de base élevée. De plus, la coexpression de T18::OutLpéri n'a pas affecté l'activité de la β -galactosidase dans ces expériences de triple-hybride.

IV. A. 2) Précision de la région d'OutLpéri impliquée

Plusieurs constructions d'OutL, générées précédemment, ont été testées avec T18::OutCpéri-OutDpéri afin de définir, si possible, une région d'OutL provoquant la diminution de la quantité de T18::OutCpéri co-exprimé avec OutDpéri (Figure IV.5). Étonnamment, dans cette série, les valeurs d'activité de la β -galactosidase sont beaucoup plus élevées, y compris pour le témoin positif OutC/ OutC. Ceci peut s'expliquer par les quantités de fusions observées par Western-blot (Figure IV.6). En effet, dans cette série de transformation, T18::OutCpéri et OutDpéri apparaissent en très grande quantité. La fusion T25::OutLpéri n'apparaît pas uniquement lorsqu'elle est co-exprimée avec OutMpéri : elle est aussi bien visible exprimée seule. Le dérivé OutLAB1 et la fusion GST::OutLpéri sont

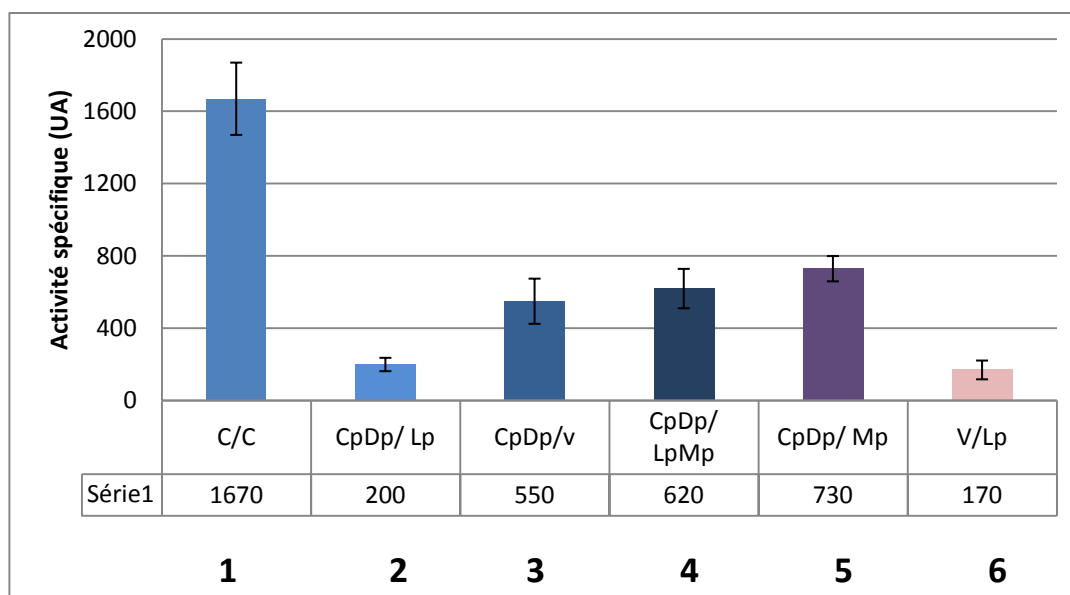


FIGURE IV.3 : Analyse des interactions entre les régions périplasmiques d'OutL ou d'OutM et celle d'OutC co-exprimé avec OutDpéri en triple-hybride bactérien. Diagramme d'une série représentative de dosages de l'activité β -galactosidase. Pour chaque couple, plusieurs séries de transformations ont été faites, suivies de 2 à 4 séries de dosages de l'activité β -galactosidase. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne des mesures indépendantes d'une série de transformation. Les premiers termes des couples correspondent aux fusions avec T18, les seconds aux fusions avec T25. Le vecteur vide est représenté par V.

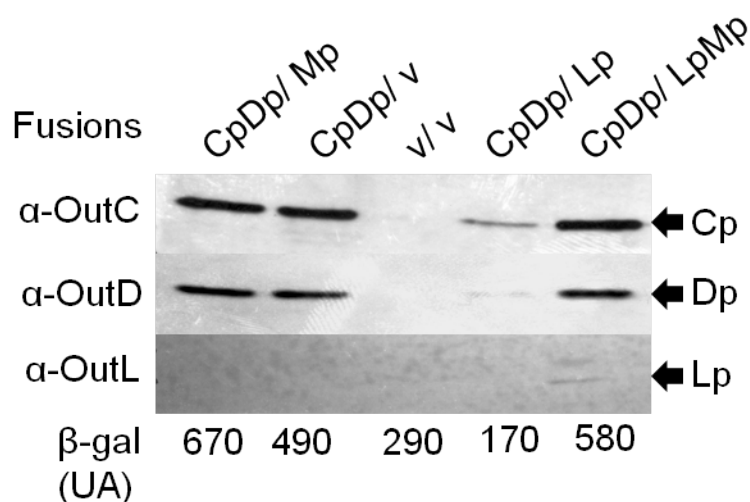


FIGURE IV.4 : Expression des différentes combinaisons de fusions contenant T18::OutCpéri-OutDpéri en double-hybride bactérien. Les cellules d'*E. coli* DHP1 exprimant les différentes combinaisons ont été cultivées 20h à 30°C puis utilisées pour les dosages de β -galactosidase et pour une analyse des protéines par WB avec les anticorps anti-OutD, anti-OutC et anti-OutL. Les valeurs d'activité de la β -galactosidase correspondantes sont indiquées en bas.

également présents en grande quantité. Dans ces conditions, les variations de quantité de fusions sont plus difficiles à détecter. Néanmoins, on observe une forte diminution de la quantité d'OutDpéri en présence de T25::OutLpéri et une faible diminution de T18::OutCpéri (Figure IV.6).

La construction T25::OutLΔB1 possède la deuxième hélice α de la région périplasmique d'OutL et le domaine de type ferrédoxine. L'activité β -galactosidase du couple T18::OutCpéri-OutDpéri/ T25::OutLΔB1 est équivalent à T18::Cpéri-Dpéri/ v (Figure IV.5, colonnes 6 et 3). Sur Western-blot, la quantité de T18::OutCpéri ne diminue pas en présence d'OutLΔB1 et OutDpéri diminue en présence d'OutLΔB1 (par rapport celle observée avec le vecteur vide) (Figure IV.6). La première hélice α de la région périplasmique d'OutL, délétée dans cette construction, ne semble pas nécessaire à l'effet de diminution de la quantité d'OutCpéri et OutDpéri d'après les dosages de la β -galactosidase mais la quantité d'OutDpéri est tout de même affectée par la présence de cette fusion.

La construction T25::LΔF::BlaM est un dérivé d'OutLpéri dans laquelle le domaine de type ferrédoxine a été remplacée par BlaM. Il ne reste que les deux premières hélices α d'OutLpéri. L'activité β -galactosidase de T18::OutCpéri-OutDpéri/ T25::LΔF::BlaM est légèrement diminuée par rapport à l'activité de base élevée de T18::Cpéri-Dpéri/ v (Figure IV.5, pistes 7 et 3). La quantité d'OutCpéri et OutDpéri semble légèrement diminuée (Figure IV.6). La région d'OutL contenant les hélices α_a et α_b serait nécessaire mais ne semble pas suffisante pour diminuer la quantité d'OutCpéri et d'OutDpéri.

Dans la triple fusion T25::GST::OutLpéri, la présence de la GST devrait renforcer la dimérisation d'OutLpéri. La fusion est sensible à la dégradation car de nombreux produits de dégradation apparaissent en Western-blot mais la quantité de fusion T25::GST::OutLpéri est tout de même fortement produite (Figure IV.6). L'activité β -galactosidase du couple T18::OutCpéri-OutDpéri/ T25::GST::OutLpéri est trois fois inférieure à celle de T18::OutCpéri-OutDpéri/ v (Figure IV.5, colonnes 3 et 8). Même si l'activité de la β -galactosidase est encore deux fois supérieure au témoin négatif v/T25::GST::OutLpéri (Colonnes 8 et 10), la diminution de l'activité de la β -galactosidase avec T25::GST::OutLpéri est encore plus forte qu'avec T25::OutLpéri (Figure IV.5, colonnes 2 et 8). Par Western-blot, les quantités de T18::OutCpéri et OutDpéri détectées sont diminuées en présence de GST::OutLpéri, comme avec OutLpéri (Figure IV.6).

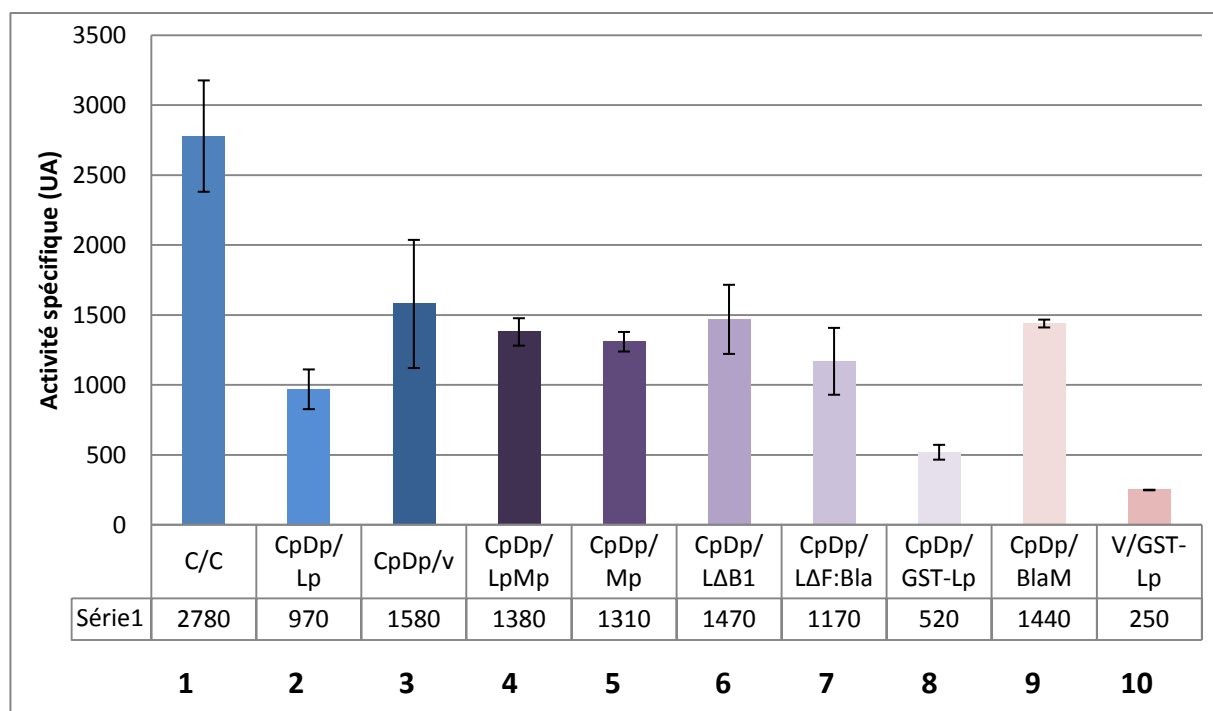


FIGURE IV.5 : Analyse des interactions entre les régions périplasmiques d'OutL et ses dérivés avec celle d'OutC co-exprimé avec OutDpéri en triple-hybride bactérien. Diagramme d'une série représentative de dosages de l'activité β -galactosidase. Pour chaque couple, plusieurs séries de transformations ont été faites, suivies de 2 à 4 séries de dosages de l'activité β -galactosidase. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne des mesures indépendantes d'une série de transformation. Les premiers termes des couples correspondent aux fusions avec T18, les seconds aux fusions avec T25. Le vecteur vide est représenté par V.

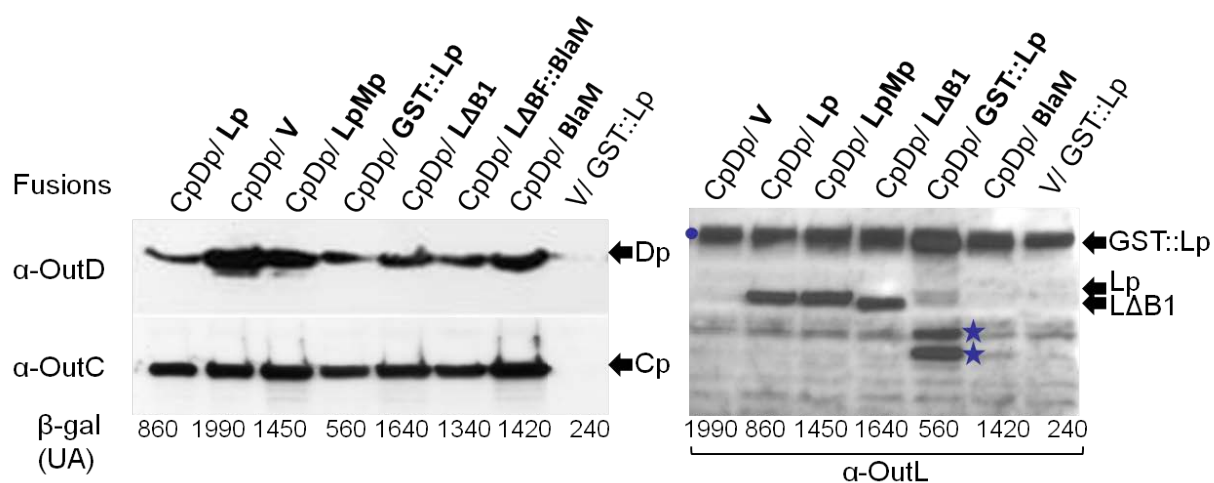


FIGURE IV.6 : Expression des différentes combinaisons de fusions contenant T18::OutCpéri-OutDpéri en double-hybride bactérien. Comparaison des quantités de fusions T18::OutCpéri, OutDpéri et T25::OutLpéri (et ses dérivés), révélées en Western-blot par les anticorps anti-OutD, anti-OutC, anti-OutL. Les bandes aspécifiques dues aux anti-corps anti-OutL sont signalées par ●. Les produits de dégradation de la fusion T25::GST::OutLpéri sont signalés par ★.

La construction T25::BlaM, coexprimée avec T18::Cpéri-Dpéri, nous a permis de vérifier la spécificité des phénomènes observés ci-dessus. Effectivement, avec T25::BlaM, il n'y a pas de diminution de l'activité de la β -galactosidase (Figure IV.5, piste 9). Il n'y a pas non plus de diminution de la quantité de T18::OutCpéri et OutDpéri en présence de T25::BlaM (Figure IV.6). La diminution des quantités de ces protéines tronquées (OutCpéri, OutDpéri) dans d'autres couples est donc bien due à la présence d'un dérivé d'OutL.

IV. A. 3) OutLpéri a-t-elle un effet sur OutCpéri ou sur OutDpéri ?

L'interaction d'OutL avec l'une ou l'autre protéine ou les deux protéines ensemble pourrait affecter l'interaction entre OutC et OutD et rendre ces protéines accessibles aux protéases. Les deux protéines du complexe OutCpéri/ OutDpéri, OutDpéri semble diminuer le plus en présence d'OutLpéri mais les deux sont affectées. Nous avons donc cherché à savoir si la diminution de la quantité de ces protéines était due plutôt à l'effet d'OutLpéri sur OutCpéri ou sur OutDpéri. Pour cela, les fusions d'OutCpéri ou OutDpéri ont été coexprimées avec celles d'OutLpéri et OutMpéri.

La figure IV.7.A présente les valeurs d'activité de la β -galactosidase de ces combinaisons. L'activité β -galactosidase du couple T18::OutCpéri/ T25::OutLpéri est plus faible que celle du témoin négatif T18::OutCpéri/v (Figure IV.7.A, Cp/Lp avec Cp/v). Sur le Western-blot correspondant, OutCpéri apparaît en faible quantité (Figure IV.7.B). En revanche, nous avons remarqué que la quantité de T18::OutCpéri dans le couple OutCpéri/ OutMpéri est toujours deux ou trois fois plus importante que dans n'importe quel autre couple, alors que l'activité β -galactosidase d'OutCpéri/ OutMpéri est équivalente au témoin négatif (Figure IV.7.A et B). La coexpression d'OutMpéri avec la fusion T25::OutLpéri ne semble pas avoir d'incidence sur l'activité de la β -galactosidase ou sur la quantité de fusions observées avec le couple OutCpéri/ OutLpéri. En conclusion, la co-expression d'OutMpéri avec OutCpéri augmente la quantité de cette dernière sans influencer visiblement les valeurs de la β -galactosidase observées avec ce couple, tandis qu'OutLpéri ne semble pas avoir d'effet sur la quantité d'OutCpéri.

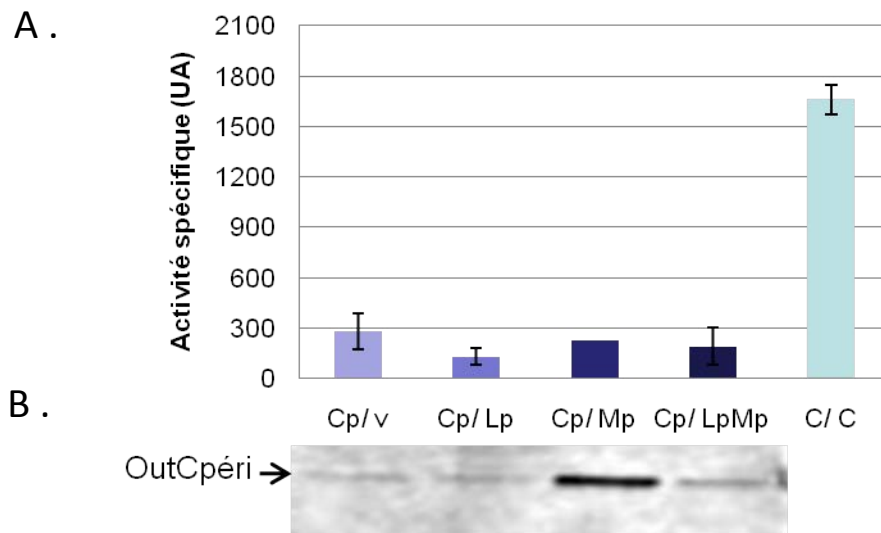


FIGURE IV.7 : Diagramme des activités β -galactosidase avec T18::Cpéri observées dans différentes combinaisons et la quantité de protéines correspondante détectée par Western-blot. (A) Diagramme des moyennes de 2 à 4 séries de dosage de l'activité de la β -galactosidase, à partir d'une série de transformation, des combinaisons avec T18::OutCpéri observées et (B) quantité de protéines correspondantes sur WB. Le premier terme correspond à une fusion avec T18, le second avec T25. Les abréviations p et v signifient respectivement péri et vecteur vide. Les Western-blot ont été révélés avec les anticorps anti-OutC.

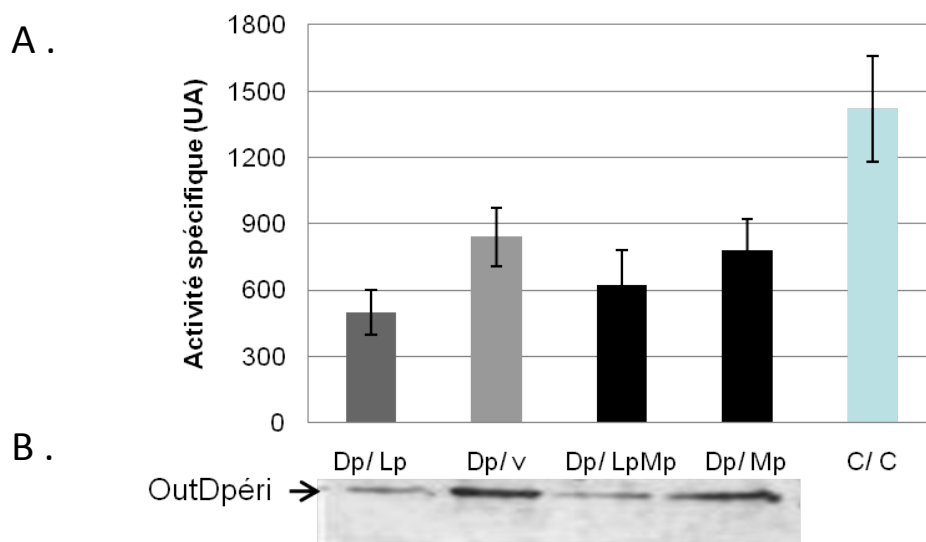


FIGURE IV.8 : Diagramme des activités β -galactosidase observées avec T18::Dpéri et la quantité de protéines correspondante par Western-Blot. (A) Diagramme des moyennes de 2 à 4 séries de dosage de l'activité de la β -galactosidase, à partir d'une série de transformation, des combinaisons avec T18::OutDpéri observées et (B) quantité de protéines correspondantes sur WB. Le premier terme correspond à une fusion avec T18, le second avec T25. Les abréviations p et v signifient respectivement péri et vecteur vide. Le Western-blot a été révélé avec les anticorps anti-OutD

De même, plusieurs séries de transformation ont été faites avec des combinaisons faisant intervenir OutDpéri. Les dosages de l'activité β -galactosidase ont montré que l'activité du témoin négatif OutDpéri/v est fortement supérieure à celle observée habituellement (Figure IV.8.A). Par rapport à ce témoin négatif, aucune interaction n'a été décelée entre OutDpéri et OutLpéri, OutMpéri ou encore OutLpéri-OutMpéri. La quantité d'OutDpéri observée par Western-blot dans les couples OutDpéri/OutMpéri et OutDpéri/v est similaire (Figure IV.8.B). Il n'y aurait donc pas de protection d'OutDpéri par OutMpéri. En revanche, la quantité d'OutDpéri est deux fois moins importante dans les couples OutDpéri/ OutLpéri et OutDpéri/OutLpéri-OutMpéri par rapport à OutDpéri/v (Figure IV.8.B). OutLpéri semble donc provoquer en partie la dégradation d'OutDpéri.

L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'OutLpéri peut exercer un effet négatif sur le complexe OutCpéri-OutDpéri en provoquant une baisse de la stabilité d'OutDpéri essentiellement.

IV.B) Phénomène en pull-down

Ensuite, nous avons voulu examiner si l'effet négatif d'OutLpéri sur le complexe OutCpéri-OutDpéri pourrait être visualisé par une autre approche. Le GST pull-down permet de co-purifier deux ou plusieurs protéines dont l'une, fusionnée à la GST, est la matrice d'affinité et retient ses partenaires. L'interaction d'OutCpéri et OutDpéri semble être plus efficace lorsque les deux protéines sont co-exprimées à partir du même plasmide (Login *et al.*, 2010). Nous avons donc utilisé le plasmide pGE6X Cpéri-Dpéri, dans lequel OutDpéri est co-exprimé avec OutCpéri fusionnée à la GST (Figure IV.1). Seule, OutLpéri est très sensible à la dégradation, en double-hybride bactérien et en pull-down (Chapitre I). Comme cela a été montré dans le chapitre II, la fusion de la GST en N-terminal d'OutLpéri permet la stabilisation de la protéine. Un plasmide pACYC GST::Lpéri a donc été construit et exprimé dans les cellules portant le plasmide pGEX GST::Cpéri-Dpéri. Comme contrôles, chacun des deux plasmides a été combiné avec un vecteur vide.

La co-purification de GST::OutCpéri et OutDpéri montre qu'OutDpéri est retenu par la matrice d'affinité GST::OutCpéri (Figure IV.9). En présence de GST::OutLpéri, la quantité d'OutDpéri n'a pas diminué. Il semble donc que la co-expression de GST::OutLpéri avec

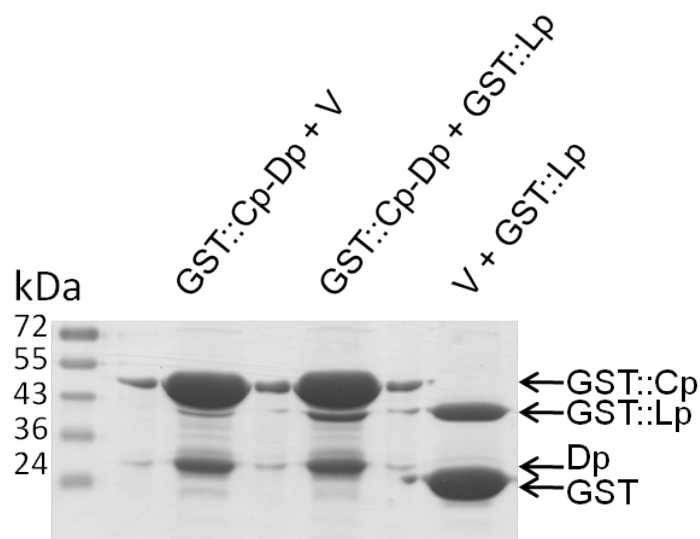


FIGURE IV.9 : Analyse de la copurification d'OutDpéri sur GST::OutCpéri en présence ou absence de GST::OutLpéri. La GST, GST:: OutCpéri (Cp) et GST::OutLpéri (Lp) ont été accrochées sur la résine de glutathion sepharose et OutDpéri (Dp) a été copurifiée avec GST-Cp. Les protéines non fixées ont été éliminées par lavages. Les protéines accrochées ont été éluées par le tampon de charge pour SDS-PAGE. Les éluats ont été séparés par SDS-PAGE et colorés au bleu de coomassie.

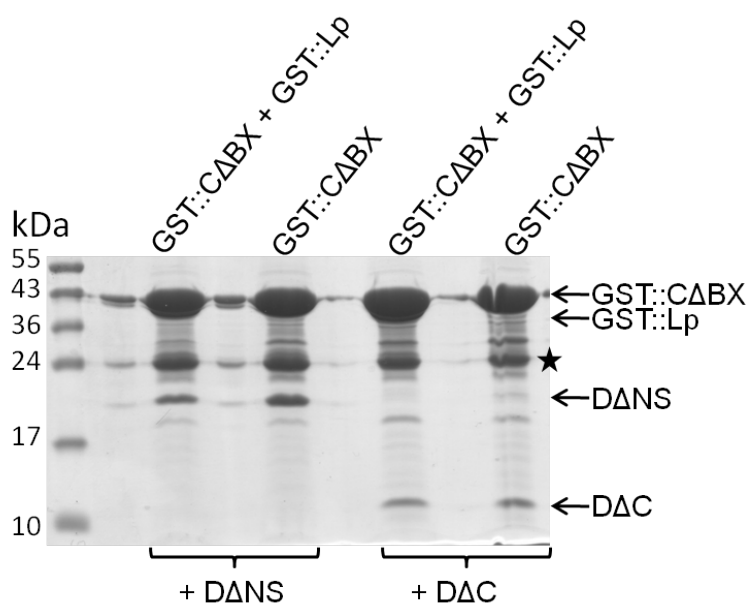


FIGURE IV.10 : Analyse de la copurification d'OutDANS et OutDAC sur GST::CABX, en présence ou absence de GST::Lpéri. GST::CABX et GST::Lpéri ont été accrochées sur la résine de glutathion sepharose et OutDANS ou OutDAC ont été copurifiées avec les matrices. Les protéines non fixées ont été éliminées par lavages. Les protéines accrochées ont été éluées par le tampon de charge pour SDS-PAGE. Les éluats ont été séparés par SDS-PAGE et colorés au bleu de coomassie. Les produits de dégradation des fusions, qui correspondent à la GST seule, sont signalés par ★.

GST::Cpéri-OutDpéri n'a pas d'effet sur l'efficacité de la co-purification de ces dernières dans ce test. Néanmoins, la quantité de GST::OutLpéri est très inférieure à la quantité de GST::OutCpéri fixé sur la matrice.

Un deuxième test de pull-down, avec les régions d'OutC et d'OutD directement impliquées dans l'interaction OutC/OutD, a été fait. La région d'OutC comprenant la fin du domaine HR et le domaine PDZ, qui correspond à la construction OutCΔBX, est suffisante à l'interaction avec deux régions d'OutD, le domaine N0 et les domaines N1, N2 et N3', qui correspondent respectivement aux constructions OutDAC et OutDANS (Figure IV.1) (Login *et al.*, 2010). La co-purification de GST::OutCΔBX et d'OutDANS en présence ou en absence de GST::OutLpéri a permis de conclure qu'il n'y avait pas diminution de la quantité d'OutDANS fixé sur la matrice d'affinité, c'est-à-dire GST::OutCΔBX (Figure IV.10). En effet, si la quantité d'OutDANS semble un peu supérieure en l'absence de GST::OutLpéri, c'est aussi parce que la quantité de GST::CΔBX est plus importante dans cet échantillon. La bande correspondant à la fusion GST::OutLpéri se confond avec GST::OutCΔBX et la quantité de GST::OutCΔBX dans les deux cas semble être similaire à cause de la proximité des deux bandes (Figure IV.10). Cependant, un Western-blot avec les anti-corps anti-OutC n'ayant pas été fait, il est difficile de conclure. De même, la co-purification d'OutDAC avec GST::OutCΔBX en présence ou en absence de GST::OutLpéri suggère qu'il n'y a pas diminution de la quantité d'OutDAC en présence de GST::OutLpéri (Figure IV.10).

Un troisième test de pull-down a été réalisé avec en supplément une co-purification de GST::OutCΔBX avec les deux dérivés d'OutD ensemble, OutDAC et OutDANS. Dans ce cas, les trois protéines, GST::OutCΔBX, OutDAC et OutDANS ont été coexprimées à partir du même plasmide (Login *et al.*, 2010). Lorsque les trois dernières protéines ont été copurifiées sur la résine, la présence du quatrième partenaire, GST::OutLpéri, n'a pas causé d'effet sur l'efficacité de la co-purification (Figure IV.11, les deux dernières pistes). Cependant, une légère diminution de la quantité d'OutDANS a été observée en présence de GST::OutLpéri (Figure IV.11, deux pistes du milieu). Cette légère diminution est aussi apparue au test précédent, lorsque OutDANS a été copurifiée avec GST::OutCΔBX (Figure IV.10). Néanmoins, dans ces tests, les quantités des matrices sont légèrement différentes, ce qui ne nous a pas permis de conclure avec certitude si la coexpression de GST::OutLpéri avec GST::OutCpéri-OutDpéri affecte leur interaction.

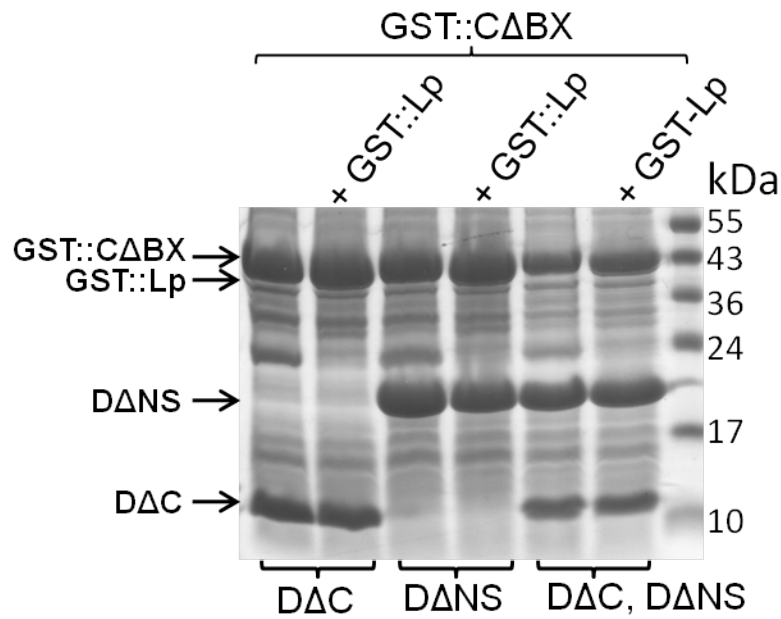


FIGURE IV.11 : Analyse de la copurification d'OutDANS, OutDAC et {OutDANS, OutDAC} sur GST::CΔBX en présence ou absence d'OutLpéri. GST::CΔBX et GST::Lp ont été accrochées sur la résine de glutathion sepharose et DΔNS ou DΔC ou DΔC-DΔNS ont été copurifiées avec les matrices. Les protéines non fixées ont été éliminées par lavages. Les protéines accrochées ont été éluées par le tampon de charge pour SDS-PAGE. Les éluats ont été séparés par SDS-PAGE et colorés au bleu de coomassie.

IV.C) Discussion et conclusion

Les résultats présentés dans ce chapitre et les études antérieures (Login *et al.*, 2010) laissent suggérer que la coexpression d'OutDpéri avec OutCpéri conduit à une stabilisation mutuelle de ces deux protéines et donc à l'augmentation significative de leurs quantités (Figures IV.3 et IV.5). Dans les expériences de double-hybride bactérien, cette forte augmentation de la quantité de T18::OutCpéri conduit à son tour à une augmentation de l'expression des gènes rapporteurs. La coexpression d'un troisième (ou quatrième partenaire) avec ces deux protéines coexprimées (T18::OutCpéri-OutDpéri), soit T25::OutMpéri soit T25::OutLpéri-OutMpéri, n'a pas d'effet apparent sur la quantité de T18::OutCpéri et d'OutDpéri, ni sur l'activité de la β -galactosidase. Cependant, la co-expression de T25::OutLpéri avec T18::OutCpéri-OutDpéri a conduit à une diminution importante des quantités de T18::OutCpéri et d'OutDpéri laissant envisager une déstabilisation du complexe OutCpéri-OutDpéri et donc une dégradation plus importante de ces protéines (Figure IV.4).

L'utilisation de divers dérivés tronqués d'OutLpéri dans ces expériences n'a pas permis de déterminer clairement une région d'OutL directement impliquée dans ce phénomène (valeurs d'activité de la β -galactosidase proches dans les couples CpDp/Lp, CpDp/L Δ B1 et CpDp/L Δ F::BlaM ; Figure IV.5). Néanmoins, l'effet négatif sur OutCpéri-OutDpéri semble accentué en présence de la fusion GST::OutLpéri. La GST forme des dimères stables (McTigue *et al.*, 1995). Nous avons utilisé cette propriété pour favoriser la dimérisation d'OutLpéri et pour augmenter la quantité d'OutLpéri fusionnée en C-terminal de la GST. Deux possibilités peuvent être envisagées : i) l'augmentation de la quantité d'OutLpéri permet une meilleure efficacité de son action sur le couple OutCpéri/ OutDpéri ou ii) la dimérisation forcée d'OutLpéri par la GST favorise la dégradation des protéines du couple OutCpéri/ OutDpéri.

L'observation que T25 ::OutLpéri seule, mais pas coexprimée avec OutMpéri, provoque une forte diminution de la quantité et de l'activité de la β -galactosidase d'OutCpéri/ OutDpéri est très intéressante. Elle rejoint les études du chapitre II, suggérant que l'homo et l'hétérodimérisation d'OutLpéri et OutMpéri sont peu ou pas compatibles. Bien que T25::OutLpéri soit produite en plus grande quantité en présence d'OutMpéri, elle ne semble pas être disponible pour exercer un effet négatif sur les protéines OutCpéri et OutDpéri. Il est possible qu'OutMpéri couvre le ou les sites d'interaction d'OutLpéri avec OutCpéri et/ou

OutDpéri ou provoque des changements conformationnels dans OutLpéri incompatibles avec cette interaction.

La coexpression de T25::OutLpéri avec T18::OutDpéri seule a résulté en la diminution de la quantité de ce dernier, et la présence d'un quatrième partenaire, OutMpéri, n'a pas annulé cet effet (Figure IV.8.B). De manière intéressante, la coexpression T25::OutMpéri avec T18::OutCpéri ou T18::OutDpéri augmente la quantité de ces dernières protéines. OutMpéri semble exercer un effet opposé à OutLpéri sur OutDpéri et OutCpéri. Ceci suggère d'une part que la présence d'OutLpéri suffit à induire un effet négatif sur OutDpéri isolée et d'autre part qu'OutMpéri aurait un effet protecteur sur OutCpéri ou OutDpéri isolées.

Pour conclure, nous préférons garder une certaine réserve quant à la nature exacte de ce phénomène, parce que la forte activité β -galactosidase due à la coexpression d'OutCpéri et OutDpéri à partir du même vecteur n'a été visible qu'avec le plasmide pUT18C mais pas avec pKT25. De plus, dans les expériences de pull-down, la présence de GST::OutLpéri n'a pas eu d'effet spectaculaire sur la copurification d'OutDpéri avec GST::OutCpéri. Néanmoins, lorsque les deux régions d'OutD (représentées par OutDAC et OutDANS) directement impliquées dans l'interaction avec OutCpéri ont été analysées, la présence de GST::OutLpéri semble provoquer un faible effet négatif sur OutDANS mais pas sur OutDAC. Cependant, la difficulté que nous avons eu à avoir les mêmes quantités de matrices (GST::OutCpéri et GST::OutLpéri) rend difficile la conclusion de ces expériences. Les prochaines expériences seront donc des expériences de co-purification (pull-down) dans lesquelles les quantités de matrice devront être normalisées.

TABEAU V.1

Plasmides utilisés dans ce chapitre

Plasmide	Caractéristiques	Référence
Vecteurs de surproduction		
pGE6X LpMp	pGE6X portant 'outL tronqué (aa 265-400) fusionné en 5' au gène GST suivi de 'outM tronqué (aa 38-162)	Ce travail
pGE6X Lp-GST-Mp	pGE6X portant 'outL tronqué (aa 265-400) fusionné en 5' au gène GST suivi de la GST fusionné en 3' à 'outM tronqué (aa 38-162)	Ce travail
pGE6X Lp	pGE6X portant 'outL tronqué (aa 265-400) fusionné en 5' au gène GST	Login
pGE6X Mp	pGE6X portant 'outM tronqué (aa 38-162) fusionné en 5' au gène GST	Login

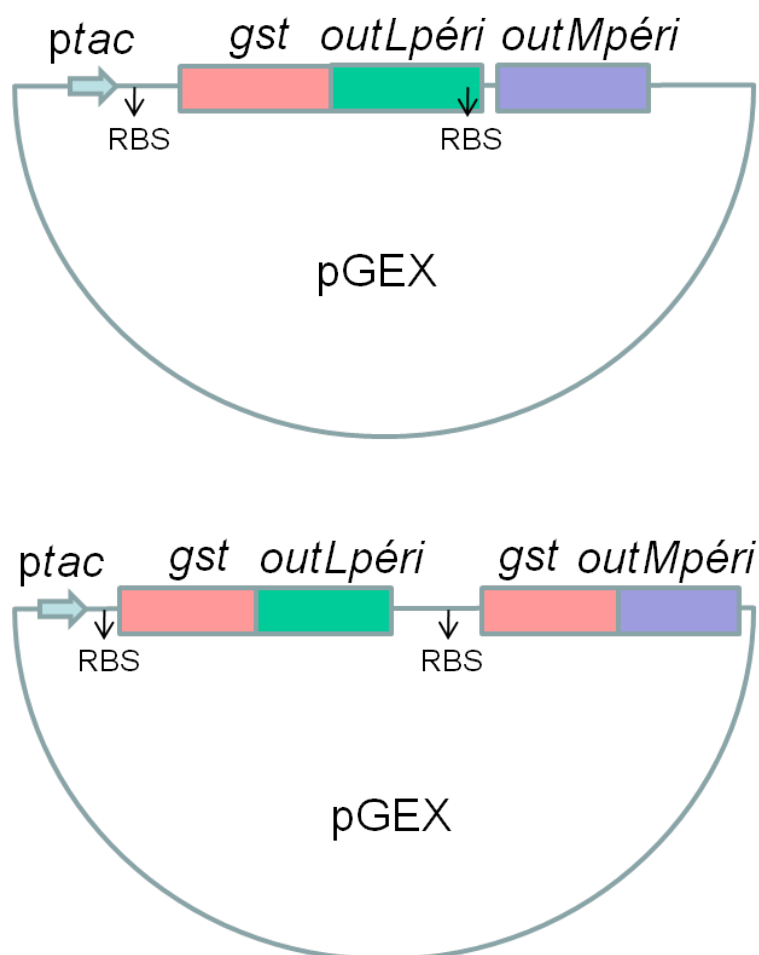


FIGURE V.1 : Représentation schématique de la construction des fusions d'OutLpéri et OutMpéri avec la GST. (A) Fusion GST::OutLpéri coexprimée avec OutMpéri ; (B) Fusion GST::OutLpéri coexprimée avec GST::OutMpéri. Les fusions sont sous le contrôle du promoteur *ptac*. RBS : Ribosome Binding Site (site de fixation du ribosome).

Chapitre V : Construction de dérivés d'OutL et d'OutM pour une analyse structurale

La cristallographie aux rayons X et la RMN (résonance magnétique nucléaire) sont deux méthodes pour résoudre la structure tridimensionnelle de protéines ou régions de protéines. Nous avons tenté, dans le chapitre II, de définir si les mêmes sites dans les régions périplasmiques d'OutL et OutM sont impliqués dans l'homodimérisation et l'hétérodimérisation de ces protéines. Si c'est le cas, il y aurait une compétition entre les homodimères et l'hétérodimère d'OutLpéri et OutMpéri. Les résultats présentés dans le chapitre II suggèrent qu'il y a compétition entre la formation des homodimères et hétérodimères d'OutLpéri et OutMpéri. De plus, une analyse de cystein-bonding de l'interface d'interaction d'OutMpéri/OutMpéri a été initiée pour répondre à cette question (Chapitre II.C.3). L'analyse structurale du complexe formé par OutLpéri/OutMpéri pourrait fournir davantage de réponses sur ces phénomènes. Pour obtenir la structure tridimensionnelle du complexe OutLpéri/ OutMpéri, un travail de purification des protéines a donc été entamé. Grâce à notre collaboration avec le laboratoire de cristallographie de l'Université Queen Mary (Londres), la détermination de la structure 3D de ce complexe pourra être faite par RMN et/ou cristallographie aux rayons X.

V. A) Principe de la cristallographie aux rayons X et de la RMN

La cristallographie aux rayons X permet de définir la structure tridimensionnelle d'une protéine présente dans les mailles de cristaux à l'atome près. En effet, les cristaux sont une matière solide, ordonnée et stable. L'obtention des cristaux de protéines se fait par l'abaissement graduel de la solubilité des protéines. Ceci entraîne un état de sursaturation, qui peut aussi résulter en précipité amorphe de protéines. L'état de sursaturation peut être obtenu par l'ajout en solution de sels, les polymères organiques ou les solvants organiques non dénaturants. De nombreux autres facteurs peuvent influencer la cristallisation de la protéine. La recherche de ces conditions est la difficulté majeure de la cristallographie. Des rayons X envoyés parallèlement ou en phase sur le cristal vont être diffractés sur les plans qu'ils vont rencontrer. Si les plans du cristal sont parallèles, ils vont diffracter en phase et l'angle de

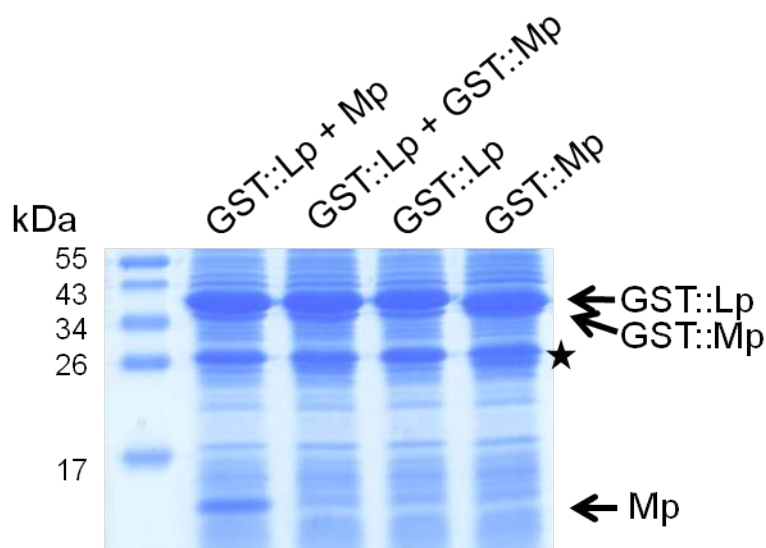


FIGURE V.1 : Surproduction de dérivés d'OutLpéri et OutMpéri fusionnés à la GST. Extraits cellulaires totaux d' *E. coli* BL21 produisant divers dérivés d'OutL et OutM mentionnés en haut et vérification de la quantité de fusions GST::OutLpéri, GST::OutMpéri, et OutMpéri par migration sur SDS-PAGE coloré au bleu de coomassie. ★ : produits de dégradation des fusions avec la GST.

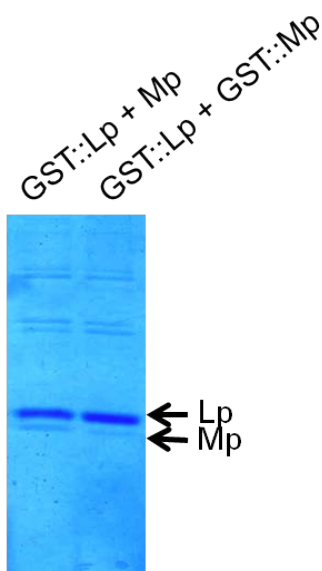


FIGURE V.2 : Co-purification d'OutLpéri et OutMpéri. Dans le premier puit, OutMpéri a été co-purifiée avec GST::OutLpéri sur glutathion-agarose. L'interaction entre OutLpéri et OutMpéri permet la rétention d'une certaine quantité d'OutMpéri. Dans le deuxième puit, GST::OutLpéri et GST::OutMpéri ont été coexprimées ensemble puis copurifiées sur glutathion-agarose. La quantité de protéines co-éluées après clivage de la GST par la PreScission protease a été vérifiée sur SDS-PAGE coloré au bleu de coomassie.

diffraction peut être mesuré. Ce phénomène permet de déduire un modèle de diffraction par rayon X par analyse de la densité des électrons. Un ordinateur interprète alors mathématiquement ce modèle et reconstruit la position des atomes pour finalement donner un modèle quasi exact de la structure de la molécule.

La RMN (résonance magnétique nucléaire) est une méthode d'étude des macromolécules biologiques en solution. Elle ne nécessite pas l'obtention de cristaux et permet d'étudier des protéines ou des acides nucléiques. Elle est basée sur les propriétés de résonance d'atomes placés dans un champ magnétique. Afin d'éviter les problèmes liés à la superposition des pics générés par les atomes d'hydrogène, la RMN hétéronucléaire (hydrogène/azote ou hydrogène/ azote/ carbone) est plus généralement utilisée. La HSQC (heteronuclear single quantum correlation) est une RMN hétéronucléaire avec marquage isotopique au ^{15}N et la HMQC (heteronuclear multiple quantum correlation) une RMN hétéronucléaire avec marquage isotopique au ^{15}N et ^{13}C . Par HSQC, il est possible de visualiser les résidus impliqués dans une interaction protéine/ protéine. Une seule des deux protéines est alors marquée au ^{15}N . L'interaction va provoquer au niveau du spectre de la protéine marquée des déplacements chimiques qui pourront être déterminés par superposition de spectres.

V.B) Co-purification des régions périplasmiques d'OutL et d'OutM

V.B.1) Approches choisies pour la co-purification d'OutLpéri et outMpéri

Dans une étude précédente du laboratoire, la purification d'OutL par chromatographie d'affinité sur métal ou glutathion s'est révélée être difficile en raison d'une faible solubilité et de l'instabilité d'OutL en l'absence d'OutM. Etant donné que les régions d'intérêt sont les régions périplasmiques de ces deux protéines, notre stratégie a été de co-purifier que les régions périplasmiques d'OutL et d'OutM.

Nous avons choisi de co-purifier OutMpéri avec OutLpéri fusionnée à la GST (Figure V.1.A) par chromatographie d'affinité avec une résine Glutathion Agarose (voir Matériels et méthodes). La GST a donc été fusionnée à l'extrémité N-terminale de la région périplasmique d'OutL (résidus 265 à 400). Afin de stabiliser ce dérivé, OutMpéri a été co-exprimée à partir

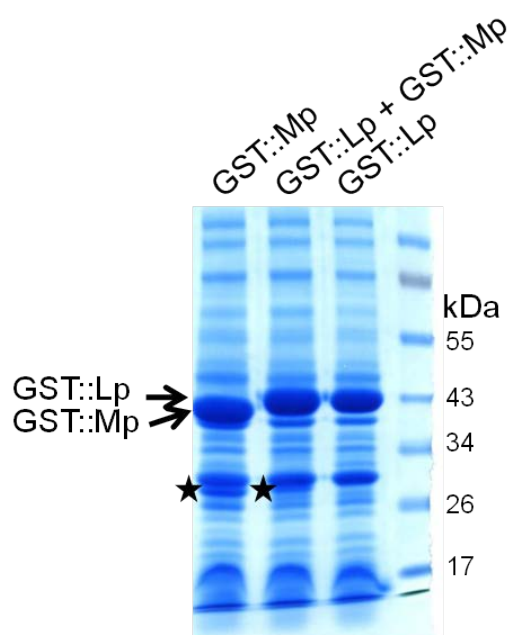


FIGURE V.3 : Surproduction d'OutLpéri et OutMpéri. Vérification de la quantité de fusions GST::OutLpéri et GST::OutMpéri par migration sur gradient d'acrylamide coloré au bleu de coomassie. ★ : produits de dégradation des fusions GST::OutMpéri.

du même vecteur. Dans cette approche, GST::OutLpéri va servir la matrice d'affinité ou d'appât à OutMpéri. Le clivage de la GST s'effectue par la PreScission protéase et devrait permettre de co-éluer les deux dérivés OutLpéri et OutMpéri.

En parallèle, une deuxième approche a été menée : pour favoriser une quantité équimolaire d'OutLpéri et d'OutMpéri, la GST a aussi été fusionnée à l'extrémité N-terminale de la région périplasmique d'OutM (résidus 38 à 162) (Figure V.1.B). Cette fusion a été co-exprimée à partir du même promoteur que la fusion GST::OutLpéri. Dans cette approche, les deux fusions vont se fixer sur le glutathion agarose en formant éventuellement un complexe, qui sera ensuite élué sous l'action de la PreScission protéase.

V.B.2) Résultats de la co-purification des fusions GST::OutLpéri et GST::OutMpéri

La surproduction de protéines a été faite dans la souche d' *E. coli* BL21 (DE3). Sur SDS-PAGE, les fusions GST::OutLpéri et GST::OutMpéri, ainsi que OutMpéri sont apparues en grande quantité (Figure V.1). Les deux fusions GST::OutLpéri et GST::OutMpéri peuvent être à peine distinguées, car leur poids moléculaire est proche (1,5 kDa de différence).

La co-purification d'OutLpéri et d'OutMpéri a donc été faite à partir de deux couples de protéines : GST::OutLpéri et OutMpéri d'une part, et de GST::OutLpéri et GST::OutMpéri d'autre part. Les résultats présentés dans la figure V.3 montrent que dans les deux cas, la quantité d'OutMpéri (~13 kDa) co-éluée avec OutLpéri (~14 kDa) après clivage de la GST est faible par rapport à la quantité d'OutLpéri.

Pour vérifier l'expression de GST::OutMpéri à partir de cette construction GST::OutLpéri-GST::OutMpéri, de nouvelles surproductions ont été analysées sur gel de gradient d'acrylamide, qui permet une meilleure séparation des protéines selon leur taille. Effectivement, le gradient d'acrylamide a permis de visualiser la différence de taille entre GST::OutMpéri et GST::OutLpéri (Figure V.4). Par comparaison avec une fusion GST::OutMpéri ou GST::OutLpéri, il semble que, dans la piste du milieu, la bande qui correspond à la fusion GST::OutLpéri est majoritaire mais descend plus bas que GST::OutLpéri seule. Ceci pourrait correspondre à une faible quantité de GST::OutMpéri. De plus, un produit de dégradation, identique à celui de la fusion GST::OutMpéri mais en

moindre quantité, est visible sur le gel (Figure V.4, étoiles). GST::OutMpéri serait donc exprimée.

V.C) Conclusion et discussion

La première approche utilisée (la co-purification d'OutMpéri par interaction avec la matrice GST::OutLpéri) a permis de co-purifier une quantité inégale d'OutLpéri et d'OutMpéri, indiquant l'absence d'un complexe stable entre ces deux protéines. La deuxième approche (la co-purification de deux protéines fusionnées à la GST par accrochage à la résine) n'a pas permis de purifier plus d'OutMpéri que la première approche. Pour écarter tout problème dû au clonage, les ADN codants pour les deux constructions GST::OutLpéri-OutMpéri et GST::OutLpéri-GST::OutMpéri ont été séquencées. Une substitution R75L a été détectée dans OutMpéri de la construction GST::OutLpéri-GST::OutMpéri. Selon la prédiction de structures secondaires, cette mutation est placée dans une région non structurée entre les hélices $\alpha 0$ et $\alpha 1$ de la région périplasmique d'OutM. Ce résidu n'est pas conservé parmi les homologues d'OutM. Il n'est donc pas certain que cette mutation ait un effet sur la structure de la protéine. Un défaut d'expression ou de traduction, ou encore la dégradation très importante de la fusion GST::OutMpéri peuvent aussi être mis en cause. En attendant de palier à ce problème, la construction GST::OutLpéri-OutMpéri a été envoyée au laboratoire de cristallographie de l'Université Queen Mary (Juin 2008) où l'analyse de ces régions sera faite par RMN ou cristallographie mais il est nécessaire de revoir les constructions afin d'obtenir une concentration équimolaire des deux dérivés. GST::OutLpéri et GST::OutMpéri étant présentes en grande quantité lorsqu'elles sont exprimées seules, nous pourrions tenter de les surexprimer puis les co-purifier par chromatographie d'affinité sur glutathion. Il est aussi possible de co-exprimer les deux fusions à la GST à partir du même vecteur, comme dans la figure V.1.B mais avec GST::OutMpéri en première position, car dans le vecteur pGEX GST::OutMpéri, GST::OutMpéri est fortement exprimée.

Perspectives

Le système de sécrétion de type II est l'un des systèmes de sécrétion les plus complexes en raison du nombre important de composants. Durant mon stage de master 2 et cette thèse, j'ai tenté de décrypter le fonctionnement des trois protéines bitopiques de la membrane interne OutC, OutL et OutM. Ces trois protéines présentent un intérêt particulier puisqu'elles relient l'ATPase du cytoplasme et la sécrétine de la membrane externe (interaction de GspE avec GspL, GspL avec GspM et GspC, GspC avec GspD). Essentiellement par la technique du double-hybride bactérien, j'ai pu montrer de multiples interactions entre ces protéines, notamment une interaction directe entre OutC/OutL et OutC/OutM. Ces résultats, additionnés aux expériences de pull-down effectuées pendant la thèse de F. Login, démontrent le réseau complexe d'interactions entre les protéines de la membrane interne. La dissection de ces protéines a permis de relever plusieurs points : i) la région périplasmique d'OutC n'interagirait pas directement avec d'autres composants de la de la plateforme de la membrane interne, OutL et OutM, et serait donc surtout impliquée dans la reconnaissance des exoprotéines et dans des interactions alternantes entre deux régions d'OutD ; ii) les régions périplasmiques d'OutL et OutM interagissant entre elles et avec elles-mêmes et ces interactions semblent être également alternantes ; iii) les régions périplasmiques d'OutM et d'OutL, sans interagir directement avec le complexe OutC/OutD, auraient peut-être un rôle dans la stabilisation/ déstabilisation du complexe respectivement, ce qui permettrait l'ouverture et la fermeture d'un passage pour les exoprotéines ; iv) les TMS de ces trois protéines interagissent entre eux et avec eux-mêmes à l'exception du TMS d'OutL qui ne semble pas dimériser : les TMS ont donc un rôle non négligeable au sein du T2SS.

Concernant les régions périplasmiques de ces protéines, la suite de ce travail pourra être une recherche plus approfondie de l'effet d'OutL_{péri} et OutM_{péri} sur le complexe OutC_{péri}/ OutD_{péri}. En effet, les résultats présentés dans cette thèse ne sont pas suffisants pour affirmer l'existence d'un tel phénomène (Chapitre IV). Qui plus est, OutL_{péri} ne semble pas influencer la stabilité du complexe OutC_{péri}/ OutD_{péri} dans les expériences de pull-down. Plusieurs techniques de détections d'interactions protéine-protéine ou de changements conformationnels pourraient être appliquées à cette problématique. Tout d'abord, des expériences de protéolyse limitée permettraient de détecter un changement conformationnel

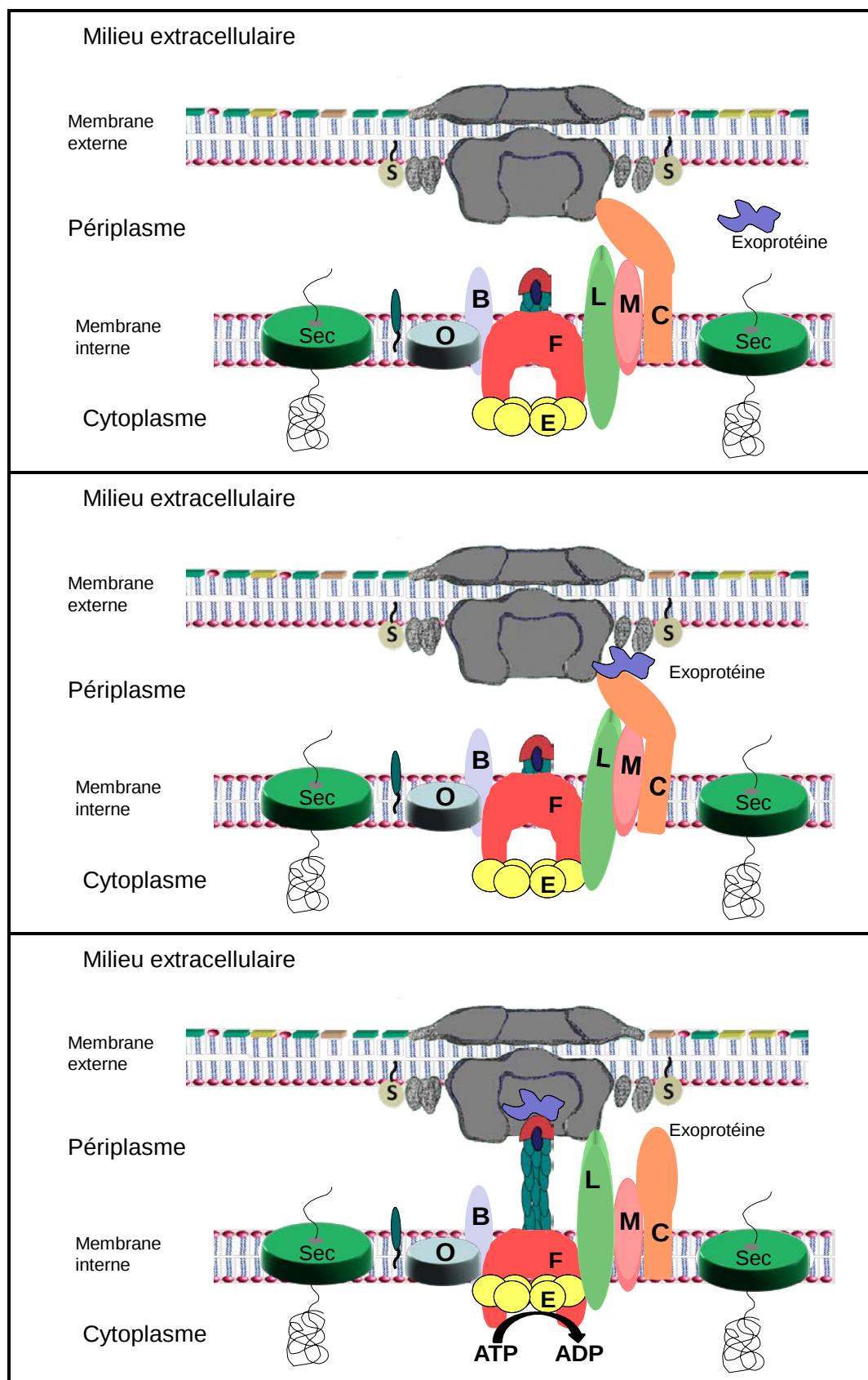


FIGURE 52 : Modèle du système de sécrétion de type II Out d'*E. chrysanthemi*. Le processus de sécrétion est déclenché par une cascade d'interactions qui aboutissent à l'activation de l'ATPase et l'élongation du pseudopilus.

entre OutC_{péri} et OutD_{péri} en présence ou en absence d'OutL_{péri}, par modification des sites accessibles à la protéase. Ces expériences peuvent facilement être mises en œuvre au laboratoire. Les interactions et les changements de conformations de ces protéines pourraient aussi être détectées *in vivo* par FRET (Fluorescence resonance energy transfer) ou *in vitro* par une technique biophysique telle que le marquage de spin suivi par spectroscopie RPE (site-directed spin labelling EPR). Cette dernière technique permet de visualiser les déplacements et l'orientation de protéines solubles ou membranaires grâce à un marquage d'une cystéine libre avec une sonde paramagnétique. Ces deux approches nécessiteraient une collaboration avec un laboratoire extérieur.

L'analyse des interactions entre les régions périplasmiques d'OutL et d'OutM effectuée par DHB (Chapitre II) a suggéré que l'homo- et l'hétérodimérisation de ces régions ne seraient pas compatibles. Ceci suggère que les mêmes sites ou les sites chevauchants dans ces protéines sont impliqués dans des interactions alternantes, homo- et hétérodimérisations, lors du processus de sécrétion. En nous appuyant sur les domaines structuraux disponibles, nous avons lancé une étude de type « cystein bonding » afin de tester cette hypothèse *in vivo* chez *E. chrysanthemi* (voir la discussion du chapitre II). Cette étude sera poursuivie.

Il est possible que la région périplasmique d'OutL située entre le TMS et le domaine de type ferrédoxine soit impliquée dans les interactions avec les autres composants du système. En effet, la première hélice α (α_a) de cette région est considérée par certains programmes (Jpred) comme la continuation du TMS. Or, dans les constructions utilisées pour le DHB, T25::L Δ F::BlaM et T25::L Δ H::BlaM, cette région est coupée du TMS, ce qui peut affecter sa conformation et abolir les interactions. La construction de triples fusions d'OutL qui possède et le TMS et cette région (Cya::TMS, α_a,α_b ::BlaM) pourrait permettre de mieux visualiser les interactions les impliquant. La même stratégie pourrait être appliquée pour OutM et OutC. Il est possible que les interactions que nous avons détectées entre les TMS isolés de ces protéines soient influencées par la présence de cette courte région périplasmique avoisinant le TMS.

Nous avons pu mettre en évidence de nombreuses interactions entre TMS d'OutC, OutL et OutM, suggérant que la structuration de la plateforme se ferait dans la membrane cytoplasmique plutôt que dans le périplasma. Les TMS d'OutC et d'OutM sont capables de dimériser et d'interagir avec les TMS des deux autres protéines étudiées. Comme pour les interactions des régions périplasmiques d'OutL et OutM, il serait intéressant d'étudier la

nature de ces interactions entre les TMS ainsi que leur compatibilité. Les expériences de DHB ont notamment montré que quand trois résidus polaires localisés sur la même face du TMS d'OutC ont été substitués par des résidus hydrophobes, ce triple mutant OutC avait perdu sa capacité à interagir avec le TMS d'OutL mais pas avec celui d'OutM. Un travail similaire pourra être fait sur les TMS d'OutM et d'OutL. L'utilisation du « cystein bonding » permettra d'identifier les interfaces d'interaction des TMS de ces trois protéines. Par ailleurs, une perte de fonctionnalité du système de sécrétion à cause de la formation d'une liaison disulfure entre les TMS va indiquer que cette interaction n'est pas permanente lors du processus de sécrétion.

Pour définir le rôle et l'assemblage de la plateforme de la membrane interne, il sera nécessaire dans le futur de travailler sur les deux autres protéines de la membrane interne OutF et OutB. Les protéines GspB ont un rôle très mal défini, puisqu'elles ne sont présentes que dans quelques espèces. Mais chez *E. chrysanthemi*, la suppression de la protéine OutB entraîne une diminution de 30% de la sécrétion. Il a été montré qu'OutB interagit avec la région N-terminale périplasmique d'OutD. OutB est prédite comme une protéine bitopique avec une large région périplasmique. Il n'est pas impossible qu'elle soit partie intégrante de la plateforme de la membrane interne. Une recherche des interactions entre OutB et les protéines entières OutC, OutL et OutM pourra être faite par double-hybride bactérien dans un premier temps. Dans le cas d'une interaction d'OutB avec l'une de ces protéines, une dissection de la protéine pourra préciser la région impliquée : le TMS, la région périplasmique ou les deux.

Les régions cytoplasmiques de la protéine intégrale OutF ont déjà fait l'objet d'une étude de double-hybride levure (Py *et al.*, 2001). Le domaine N-terminal cytoplasmique d'OutF interagit avec OutE et la région cytoplasmique d'OutL. Grâce à l'adaptation de la technique du double-hybride bactérien adapté aux TMS, les trois TMS d'OutF pourront pour la première fois être analysés.

Les travaux ultérieurs et les études effectuées lors de cette thèse indiquent une multitude d'interactions entre diverses régions de plusieurs composants du système de sécrétion de type II. Un aspect innovant de cette étude est qu'elle suggère une alternance de certaines de ces interactions lors du processus de sécrétion, mettant en avant un aspect dynamique du fonctionnement du système. Notre modèle du T2SS (Figure 52) suggère qu'une cascade des interactions transitoires s'enchaîne lors du processus de sécrétion et l'identification et l'analyse de toutes ces interactions permettra de comprendre le fonctionnement de cette nano-machine complexe.

Références bibliographiques

- Aas, F. E.; Løvold, C. & Koomey, M. (2002), 'An inhibitor of DNA binding and uptake events dictates the proficiency of genetic transformation in *Neisseria gonorrhoeae*: mechanism of action and links to Type IV pilus expression.', *Mol Microbiol* **46**(5), 1441--1450.
- Abbott, D. W. & Boraston, A. B. (2008), 'Structural biology of pectin degradation by Enterobacteriaceae.', *Microbiol Mol Biol Rev* **72**(2), 301--16, table of contents.
- Abendroth, J.; Bagdasarian, M.; Sandkvist, M. & Hol, W. G. J. (2004), 'The structure of the cytoplasmic domain of EpsL, an inner membrane component of the type II secretion system of *Vibrio cholerae*: an unusual member of the actin-like ATPase superfamily.', *J Mol Biol* **344**(3), 619--633.
- Abendroth, J.; Kreger, A. C. & Hol, W. G. J. (2009), 'The dimer formed by the periplasmic domain of EpsL from the Type 2 Secretion System of *Vibrio parahaemolyticus*.', *J Struct Biol* **168**(2), 313--322.
- Abendroth, J.; Mitchell, D. D.; Korotkov, K. V.; Johnson, T. L.; Kreger, A.; Sandkvist, M. & Hol, W. G. J. (2009), 'The three-dimensional structure of the cytoplasmic domains of EpsF from the type 2 secretion system of *Vibrio cholerae*.', *J Struct Biol* **166**(3), 303--315.
- Abendroth, J.; Murphy, P.; Sandkvist, M.; Bagdasarian, M. & Hol, W. G. J. (2005), 'The X-ray structure of the type II secretion system complex formed by the N-terminal domain of EpsE and the cytoplasmic domain of EpsL of *Vibrio cholerae*.', *J Mol Biol* **348**(4), 845--855.
- Abendroth, J.; Rice, A. E.; McLuskey, K.; Bagdasarian, M. & Hol, W. G. J. (2004), 'The crystal structure of the periplasmic domain of the type II secretion system protein EpsM from *Vibrio cholerae*: the simplest version of the ferredoxin fold.', *J Mol Biol* **338**(3), 585--596.
- Alami, M.; Lüke, I.; Deitermann, S.; Eisner, G.; Koch, H.-G.; Brunner, J. & Müller, M. (2003), 'Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*.', *Mol Cell* **12**(4), 937--946.
- Alm, R. A. & Mattick, J. S. (1997), 'Genes involved in the biogenesis and function of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*.', *Gene* **192**(1), 89--98.
- Alm, R. A. & Mattick, J. S. (1995), 'Identification of a gene, pilV, required for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*, whose product possesses a pre-pilin-like leader sequence.', *Mol Microbiol* **16**(3), 485--496.
- Alphonse, S.; Durand, E.; Douzi, B.; Waegle, B.; Darbon, H.; Filloux, A.; Voulhoux, R. & Bernard, C. (2010), 'Structure of the *Pseudomonas aeruginosa* XcpT pseudopilin, a major component of the type II secretion system.', *J Struct Biol* **169**(1), 75--80.
- Arrieta, J. G.; Sotolongo, M.; Menéndez, C.; Alfonso, D.; Trujillo, L. E.; Soto, M.; Ramírez, R. & Hernández, L. (2004), 'A type II protein secretory pathway required for levansucrase secretion by *Gluconacetobacter diazotrophicus*.', *J Bacteriol* **186**(15), 5031--5039.
- Arts, J.; van Boxtel, R.; Filloux, A.; Tommassen, J. & Koster, M. (2007), 'Export of the pseudopilin XcpT of the *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion system via the signal recognition particle-Sec pathway.', *J Bacteriol* **189**(5), 2069--2076.
- Arts, J.; de Groot, A.; Ball, G.; Durand, E.; Khattabi, M. E.; Filloux, A.; Tommassen, J. & Koster, M. (2007), 'Interaction domains in the *Pseudomonas aeruginosa* type II secretory apparatus component XcpS (GspF).', *Microbiology* **153**(Pt 5), 1582--1592.
- Assalkhou, R.; Balasingham, S.; Collins, R. F.; Frye, S. A.; Davidsen, T.; Benam, A. V.; Bjørås, M.; Derrick, J. P. & Tønjum, T. (2007), 'The outer membrane secretin PilQ from *Neisseria meningitidis* binds DNA.', *Microbiology* **153**(Pt 5), 1593--1603.
- Ast, V. M.; Schoenhofen, I. C.; Langen, G. R.; Stratilo, C. W.; Chamberlain, M. D. & Howard, S. P. (2002),

'Expression of the ExeAB complex of *Aeromonas hydrophila* is required for the localization and assembly of the ExeD secretion port multimer.', *Mol Microbiol* **44**(1), 217--231.

Aukema, K. G.; Kron, E. M.; Herdendorf, T. J. & Forest, K. T. (2005), 'Functional dissection of a conserved motif within the pilus retraction protein PilT.', *J Bacteriol* **187**(2), 611--618.

Ayers, M.; Sampaleanu, L. M.; Tammam, S.; Koo, J.; Harvey, H.; Howell, P. L. & Burrows, L. L. (2009), 'PilM/N/O/P proteins form an inner membrane complex that affects the stability of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus secretin.', *J Mol Biol* **394**(1), 128--142.

Balasingham, S. V.; Collins, R. F.; Assalkhou, R.; Homberset, H.; Frye, S. A.; Derrick, J. P. & T?njum, T. (2007), 'Interactions between the lipoprotein PilP and the secretin PilQ in *Neisseria meningitidis*.', *J Bacteriol* **189**(15), 5716--5727.

Ball, G.; Chapon-Hervé, V.; Bleves, S.; Michel, G. & Bally, M. (1999), 'Assembly of XcpR in the cytoplasmic membrane is required for extracellular protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*.', *J Bacteriol* **181**(2), 382--388.

Ball, G.; Durand, E.; Lazdunski, A. & Filloux, A. (2002), 'A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*.', *Mol Microbiol* **43**(2), 475--485.

Barras, F.; Kilhoffer, M. C.; Bortoli-German, I. & Haiech, J. (1994), 'Microbial and genetic approaches to the study of structure-function relationships of proteins.', *Prog Mol Subcell Biol* **13**, 81--99.

Becker, T.; Bhushan, S.; Jarasch, A.; Armache, J.-P.; Funes, S.; Jossinet, F.; Gumbart, J.; Mielke, T.; Berninghausen, O.; Schulten, K.; Westhof, E.; Gilmore, R.; Mandon, E. C. & Beckmann, R. (2009), 'Structure of monomeric yeast and mammalian Sec61 complexes interacting with the translating ribosome.', *Science* **326**(5958), 1369--1373.

Berks, B. C.; Palmer, T. & Sargent, F. (2005), 'Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway.', *Curr Opin Microbiol* **8**(2), 174--181.

Bitter, W.; Koster, M.; Latijnhouwers, M.; de Cock, H. & Tommassen, J. (1998), 'Formation of oligomeric rings by XcpQ and PilQ, which are involved in protein transport across the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*.', *Mol Microbiol* **27**(1), 209--219.

Bleves, S.; Gérard-Vincent, M.; Lazdunski, A. & Filloux, A. (1999), 'Structure-function analysis of XcpP, a component involved in general secretory pathway-dependent protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*.', *J Bacteriol* **181**(13), 4012--4019.

Bleves, S.; Lazdunski, A. & Filloux, A. (1996), 'Membrane topology of three Xcp proteins involved in exoprotein transport by *Pseudomonas aeruginosa*.', *J Bacteriol* **178**(14), 4297--4300.

Blot, N.; Berrier, C.; Cotte-Pattat, N. H.; Ghazi, A. & Condemine, G. (2002), 'The oligogalacturonate-specific porin KdgM of *Erwinia chrysanthemi* belongs to a new porin family.', *J Biol Chem* **277**(10), 7936--7944.

Boccaro, M.; Aymeric, J. L. & Camus, C. (1994), 'Role of endoglucanases in *Erwinia chrysanthemi* 3937 virulence on *Saintpaulia ionantha*.', *J Bacteriol* **176**(5), 1524--1526.

Bogsch, E.; Brink, S. & Robinson, C. (1997), 'Pathway specificity for a delta pH-dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a 'Sec-avoidance' motif in the transfer peptide and a 'Sec-incompatible' mature protein.', *EMBO J* **16**(13), 3851--3859.

Bouley, J.; Condemine, G. & Shevchik, V. E. (2001), 'The PDZ domain of OutC and the N-terminal region of OutD determine the secretion specificity of the type II out pathway of *Erwinia chrysanthemi*.', *J Mol Biol* **308**(2), 205--219.

Boyer, M. H.; Cami, B.; Chambost, J. P.; Magnan, M. & Cattaneo, J. (1987), 'Characterization of a new endoglucanase from *Erwinia chrysanthemi*.', *Eur J Biochem* **162**(2), 311--316.

Bradley, D. E. (1980), 'A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility.', *Can J Microbiol* **26**(2), 146--154.

- Brillet, K.; Journet, L.; Célia, H.; Paulus, L.; Stahl, A.; Pattus, F. & Cobessi, D. (2007), 'A beta strand lock exchange for signal transduction in TonB-dependent transducers on the basis of a common structural motif.', *Structure* **15**(11), 1383--1391.
- Brok, R.; Gelder, P. V.; Winterhalter, M.; Ziese, U.; Koster, A. J.; de Cock, H.; Koster, M.; Tommassen, J. & Bitter, W. (1999), 'The C-terminal domain of the Pseudomonas secretin XcpQ forms oligomeric rings with pore activity.', *J Mol Biol* **294**(5), 1169--1179.
- Broome-Smith, J. K.; Tadayyon, M. & Zhang, Y. (1990), 'Beta-lactamase as a probe of membrane protein assembly and protein export.', *Mol Microbiol* **4**(10), 1637--1644.
- Buddelmeijer, N.; Francetic, O. & Pugsley, A. P. (2006), 'Green fluorescent chimeras indicate nonpolar localization of pullulanase secretion components PulL and PulM.', *J Bacteriol* **188**(8), 2928--2935.
- Buddelmeijer, N.; Krehenbrink, M.; Pecorari, F. & Pugsley, A. P. (2009), 'Type II secretion system secretin PulD localizes in clusters in the Escherichia coli outer membrane.', *J Bacteriol* **191**(1), 161--168.
- Bulyha, I.; Schmidt, C.; Lenz, P.; Jakovljevic, V.; Höne, A.; Maier, B.; Hoppert, M. & Søgaard-Andersen, L. (2009), 'Regulation of the type IV pili molecular machine by dynamic localization of two motor proteins.', *Mol Microbiol* **74**(3), 691--706.
- Caffall, K. H. & Mohnen, D. (2009), 'The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides.', *Carbohydr Res* **344**(14), 1879--1900.
- Camberg, J. L.; Johnson, T. L.; Patrick, M.; Abendroth, J.; Hol, W. G. J. & Sandkvist, M. (2007), 'Synergistic stimulation of EpsE ATP hydrolysis by EpsL and acidic phospholipids.', *EMBO J* **26**(1), 19--27.
- Camberg, J. L. & Sandkvist, M. (2005), 'Molecular analysis of the Vibrio cholerae type II secretion ATPase EpsE.', *J Bacteriol* **187**(1), 249--256.
- Campos, M.; Nilges, M.; Cisneros, D. A. & Francetic, O. (2010), 'Detailed structural and assembly model of the type II secretion pilus from sparse data.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(29), 13081--13086.
- Carbonnelle, E.; Hélaïne, S.; Prouvensier, L.; Nassif, X. & Pelicic, V. (2005), 'Type IV pilus biogenesis in Neisseria meningitidis: PilW is involved in a step occurring after pilus assembly, essential for fibre stability and function.', *Mol Microbiol* **55**(1), 54--64.
- Chami, M.; Guilvout, I.; Gregorini, M.; Rémy, H. W.; Müller, S. A.; Valerio, M.; Engel, A.; Pugsley, A. P. & Bayan, N. (2005), 'Structural insights into the secretin PulD and its trypsin-resistant core.', *J Biol Chem* **280**(45), 37732--37741.
- Chapon, V.; Simpson, H. D.; Morelli, X.; Brun, E. & Barras, F. (2000), 'Alteration of a single tryptophan residue of the cellulose-binding domain blocks secretion of the Erwinia chrysanthemi Cel5 cellulase (ex-EGZ) via the type II system.', *J Mol Biol* **303**(2), 117--123.
- Chen, L. Y.; Chen, D. Y.; Miaw, J. & Hu, N. T. (1996), 'XpsD, an outer membrane protein required for protein secretion by Xanthomonas campestris pv. campestris, forms a multimer.', *J Biol Chem* **271**(5), 2703--2708.
- Chen, Y.; Shiue, S.-J.; Huang, C.-W.; Chang, J.-L.; Chien, Y.-L.; Hu, N.-T. & Chan, N.-L. (2005), 'Structure and function of the XpsE N-terminal domain, an essential component of the Xanthomonas campestris type II secretion system.', *J Biol Chem* **280**(51), 42356--42363.
- Chiang, P.; Sampaleanu, L. M.; Ayers, M.; Pahuta, M.; Howell, P. L. & Burrows, L. L. (2008), 'Functional role of conserved residues in the characteristic secretion NTPase motifs of the Pseudomonas aeruginosa type IV pilus motor proteins PilB, PilT and PilU.', *Microbiology* **154**(Pt 1), 114--126.
- Cianciotto, N. P. (2005), 'Type II secretion: a protein secretion system for all seasons.', *Trends Microbiol* **13**(12), 581--588.

- Collin, S.; Guilvout, I.; Chami, M. & Pugsley, A. P. (2007), 'YaeT-independent multimerization and outer membrane association of secretin PulD.', *Mol Microbiol* **64**(5), 1350--1357.
- Collins, R. F.; Davidsen, L.; Derrick, J. P.; Ford, R. C. & Tønjum, T. (2001), 'Analysis of the PilQ secretin from *Neisseria meningitidis* by transmission electron microscopy reveals a dodecameric quaternary structure.', *J Bacteriol* **183**(13), 3825--3832.
- Collins, R. F.; Frye, S. A.; Balasingham, S.; Ford, R. C.; Tønjum, T. & Derrick, J. P. (2005), 'Interaction with type IV pili induces structural changes in the bacterial outer membrane secretin PilQ.', *J Biol Chem* **280**(19), 18923--18930.
- Collins, R. F.; Frye, S. A.; Kitmitto, A.; Ford, R. C.; Tønjum, T. & Derrick, J. P. (2004), 'Structure of the *Neisseria meningitidis* outer membrane PilQ secretin complex at 12 Å resolution.', *J Biol Chem* **279**(38), 39750--39756.
- Condemine, G.; Dorel, C.; Cotte-Pattat, N. H. & Robert-Baudouy, J. (1992), 'Some of the out genes involved in the secretion of pectate lyases in *Erwinia chrysanthemi* are regulated by kdgR.', *Mol Microbiol* **6**(21), 3199--3211.
- Condemine, G. & Ghazi, A. (2007), 'Differential regulation of two oligogalacturonate outer membrane channels, KdgN and KdgM, of *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi*).', *J Bacteriol* **189**(16), 5955--5962.
- Condemine, G. & Shevchik, V. E. (2000), 'Overproduction of the secretin OutD suppresses the secretion defect of an *Erwinia chrysanthemi* outB mutant.', *Microbiology* **146** (Pt 3), 639--647.
- Cotte-Pattat, N. H.; Condemine, G.; Nasser, W. & Reverchon, S. (1996), 'Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*.', *Annu Rev Microbiol* **50**, 213--257.
- Cotte-Pattat, N. H. & Reverchon, S. (2001), 'Two transporters, TogT and TogMNAB, are responsible for oligogalacturonide uptake in *Erwinia chrysanthemi* 3937.', *Mol Microbiol* **41**(5), 1125--1132.
- Cotte-Pattat, N. H.; Shevchik, V. E. & Nasser, W. (2002), 'PehN, a polygalacturonase homologue with a low hydrolase activity, is coregulated with the other *Erwinia chrysanthemi* polygalacturonases.', *J Bacteriol* **184**(10), 2664--2673.
- Craig, L.; Pique, M. E. & Tainer, J. A. (2004), 'Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity.', *Nat Rev Microbiol* **2**(5), 363--378.
- Craig, L.; Taylor, R. K.; Pique, M. E.; Adair, B. D.; Arvai, A. S.; Singh, M.; Lloyd, S. J.; Shin, D. S.; Getzoff, E. D.; Yeager, M.; Forest, K. T. & Tainer, J. A. (2003), 'Type IV pilin structure and assembly: X-ray and EM analyses of *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus and *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin.', *Mol Cell* **11**(5), 1139--1150.
- Craig, L.; Volkmann, N.; Arvai, A. S.; Pique, M. E.; Yeager, M.; Egelman, E. H. & Tainer, J. A. (2006), 'Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions.', *Mol Cell* **23**(5), 651--662.
- Crowther, L. J.; Yamagata, A.; Craig, L.; Tainer, J. A. & Donnenberg, M. S. (2005), 'The ATPase activity of BfpD is greatly enhanced by zinc and allosteric interactions with other Bfp proteins.', *J Biol Chem* **280**(26), 24839--24848.
- D'Enfert, C. & Pugsley, A. P. (1989), 'Klebsiella pneumoniae pulS gene encodes an outer membrane lipoprotein required for pullulanase secretion.', *J Bacteriol* **171**(7), 3673--3679.
- Daefler, S.; Guilvout, I.; Hardie, K. R.; Pugsley, A. P. & Russel, M. (1997), 'The C-terminal domain of the secretin PulD contains the binding site for its cognate chaperone, PulS, and confers PulS dependence on pIVf1 function.', *Mol Microbiol* **24**(3), 465--475.
- Daefler, S.; Russel, M. & Model, P. (1997), 'Module swaps between related translocator proteins pIV(f1), pIV(IKe) and PulD: identification of a specificity domain.', *J Mol Biol* **266**(5), 978--992.
- Dalbey, R. E. & Kuhn, A. (2004), 'YidC family members are involved in the membrane insertion, lateral integration, folding, and assembly of membrane proteins.', *J Cell Biol* **166**(6), 769--774.
- Daniel, R. A.; Noirot-Gros, M.-F.; Noirot, P. & Errington, J. (2006), 'Multiple interactions between the

transmembrane division proteins of *Bacillus subtilis* and the role of FtsL instability in divisome assembly.', *J Bacteriol* **188**(21), 7396--7404.

Davis, B. M.; Lawson, E. H.; Sandkvist, M.; Ali, A.; Sozhamannan, S. & Waldor, M. K. (2000), 'Convergence of the secretory pathways for cholera toxin and the filamentous phage, CTXphi.', *Science* **288**(5464), 333--335.

DeLisa, M. P.; Lee, P.; Palmer, T. & Georgiou, G. (2004), 'Phage shock protein PspA of *Escherichia coli* relieves saturation of protein export via the Tat pathway.', *J Bacteriol* **186**(2), 366--373.

Desvaux, M.; Parham, N. J.; Scott-Tucker, A. & Henderson, I. R. (2004), 'The general secretory pathway: a general misnomer?', *Trends Microbiol* **12**(7), 306--309.

Doig, P.; Todd, T.; Sastry, P. A.; Lee, K. K.; Hodges, R. S.; Paranchych, W. & Irvin, R. T. (1988), 'Role of pili in adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human respiratory epithelial cells.', *Infect Immun* **56**(6), 1641--1646.

Douet, V.; Expert, D.; Barras, F. & Py, B. (2009), 'Erwinia chrysanthemi iron metabolism: the unexpected implication of the inner membrane platform within the type II secretion system.', *J Bacteriol* **191**(3), 795--804.

Douet, V.; Loiseau, L.; Barras, F. & Py, B. (2004), 'Systematic analysis, by the yeast two-hybrid, of protein interaction between components of the type II secretory machinery of *Erwinia chrysanthemi*.', *Res Microbiol* **155**(2), 71--75.

Douzi, B.; Durand, E.; Bernard, C.; Alphonse, S.; Cambillau, C.; Filloux, A.; Tegoni, M. & Voulhoux, R. (2009), 'The XcpV/GspI pseudopilin has a central role in the assembly of a quaternary complex within the T2SS pseudopilus.', *J Biol Chem* **284**(50), 34580--34589.

Drake, S. L.; Sandstedt, S. A. & Koomey, M. (1997), 'PilP, a pilus biogenesis lipoprotein in *Neisseria gonorrhoeae*, affects expression of PilQ as a high-molecular-mass multimer.', *Mol Microbiol* **23**(4), 657--668.

Durand, E.; Bernadac, A.; Ball, G.; Lazdunski, A.; Sturgis, J. N. & Filloux, A. (2003), 'Type II protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: the pseudopilus is a multifibrillar and adhesive structure.', *J Bacteriol* **185**(9), 2749--2758.

Durand, E.; Michel, G.; Voulhoux, R.; Kürner, J.; Bernadac, A. & Filloux, A. (2005), 'XcpX controls biogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* XcpT-containing pseudopilus.', *J Biol Chem* **280**(36), 31378--31389.

Economou, A.; Pogliano, J. A.; Beckwith, J.; Oliver, D. B. & Wickner, W. (1995), 'SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecE.', *Cell* **83**(7), 1171--1181.

Egea, P. F. & Stroud, R. M. (2010), 'Lateral opening of a translocon upon entry of protein suggests the mechanism of insertion into membranes.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(40), 17182--17187.

van den Ent, F.; Leaver, M.; Bendezu, F.; Errington, J.; de Boer, P. & L?we, J. (2006), 'Dimeric structure of the cell shape protein MreC and its functional implications.', *Mol Microbiol* **62**(6), 1631--1642.

Ferguson, A. D.; Hofmann, E.; Coulton, J. W.; Diederichs, K. & Welte, W. (1998), 'Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide.', *Science* **282**(5397), 2215--2220.

Ferrandez, Y. & Condemine, G. (2008), 'Novel mechanism of outer membrane targeting of proteins in Gram-negative bacteria.', *Mol Microbiol* **69**(6), 1349--1357.

Filloux, A. (2004), 'The underlying mechanisms of type II protein secretion.', *Biochim Biophys Acta* **1694**(1-3), 163--179.

Forest, K. T.; Satyshur, K. A.; Worzalla, G. A.; Hansen, J. K. & Herdendorf, T. J. (2004), 'The pilus-retraction protein PilT: ultrastructure of the biological assembly.', *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**(Pt 5), 978--982.

Francetic, O.; Lory, S. & Pugsley, A. P. (1998), 'A second prepilin peptidase gene in *Escherichia coli* K-12.', *Mol Microbiol* **27**(4), 763--775.

- Francetic, O. & Pugsley, A. P. (2005), 'Towards the identification of type II secretion signals in a nonacylated variant of pullulanase from *Klebsiella oxytoca*.', *J Bacteriol* **187**(20), 7045--7055.
- Francetic, O.; Belin, D.; Badaut, C. & Pugsley, A. P. (2000), 'Expression of the endogenous type II secretion pathway in *Escherichia coli* leads to chitinase secretion.', *EMBO J* **19**(24), 6697--6703.
- Francetic, O.; Buddelmeijer, N.; Lewenza, S.; Kumamoto, C. A. & Pugsley, A. P. (2007), 'Signal recognition particle-dependent inner membrane targeting of the PulG Pseudopilin component of a type II secretion system.', *J Bacteriol* **189**(5), 1783--1793.
- Frye, S. A.; Assalkhou, R.; Collins, R. F.; Ford, R. C.; Petersson, C.; Derrick, J. P. & T?njum, T. (2006), 'Topology of the outer-membrane secretin PilQ from *Neisseria meningitidis*.', *Microbiology* **152**(Pt 12), 3751--3764.
- Gérard-Vincent, M.; Robert, V.; Ball, G.; Bleves, S.; Michel, G. P. F.; Lazdunski, A. & Filloux, A. (2002), 'Identification of XcpP domains that confer functionality and specificity to the *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion apparatus.', *Mol Microbiol* **44**(6), 1651--1665.
- Gardner, J. G. & Keating, D. H. (2010), 'Requirement of the type II secretion system for utilization of cellulosic substrates by *Cellvibrio japonicus*.', *Appl Environ Microbiol* **76**(15), 5079--5087.
- Genin, S. & Boucher, C. A. (1994), 'A superfamily of proteins involved in different secretion pathways in gram-negative bacteria: modular structure and specificity of the N-terminal domain.', *Mol Gen Genet* **243**(1), 112--118.
- Gerritse, G.; Ure, R.; Bizoullier, F. & Quax, W. J. (1998), 'The phenotype enhancement method identifies the Xcp outer membrane secretion machinery from *Pseudomonas alcaligenes* as a bottleneck for lipase production.', *J Biotechnol* **64**(1), 23--38.
- Gill, D. B.; Koomey, M.; Cannon, J. G. & Atkinson, J. P. (2003), 'Down-regulation of CD46 by piliated *Neisseria gonorrhoeae*.', *J Exp Med* **198**(9), 1313--1322.
- Giltner, C. L.; Habash, M. & Burrows, L. L. (2010), '*Pseudomonas aeruginosa* minor pilins are incorporated into type IV pili.', *J Mol Biol* **398**(3), 444--461.
- Giltner, C. L.; Rana, N.; Lunardo, M. N.; Hussain, A. Q. & Burrows, L. L. (2010), 'Evolutionary and functional diversity of the *Pseudomonas* type IVa pilin island.', *Environ Microbiol*.
- Gohlke, U.; Pullan, L.; McDevitt, C. A.; Porcelli, I.; de Leeuw, E.; Palmer, T.; Saibil, H. R. & Berks, B. C. (2005), 'The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(30), 10482--10486.
- Golovanov, A. P.; Balasingham, S.; Tzitzilonis, C.; Goult, B. T.; Lian, L.-Y.; Homberset, H.; T?njum, T. & Derrick, J. P. (2006), 'The solution structure of a domain from the *Neisseria meningitidis* lipoprotein PilP reveals a new beta-sandwich fold.', *J Mol Biol* **364**(2), 186--195.
- Graubner, W.; Schierhorn, A. & Brüser, T. (2007), 'DnaK plays a pivotal role in Tat targeting of CueO and functions beside SlyD as a general Tat signal binding chaperone.', *J Biol Chem* **282**(10), 7116--7124.
- de Groot, A.; Koster, M.; Gérard-Vincent, M.; Gerritse, G.; Lazdunski, A.; Tommassen, J. & Filloux, A. (2001), 'Exchange of Xcp (Gsp) secretion machineries between *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas alcaligenes*: species specificity unrelated to substrate recognition.', *J Bacteriol* **183**(3), 959--967.
- Guilvout, I.; Chami, M.; Berrier, C.; Ghazi, A.; Engel, A.; Pugsley, A. P. & Bayan, N. (2008), 'In vitro multimerization and membrane insertion of bacterial outer membrane secretin PulD.', *J Mol Biol* **382**(1), 13--23.
- Guilvout, I.; Chami, M.; Engel, A.; Pugsley, A. P. & Bayan, N. (2006), 'Bacterial outer membrane secretin PulD assembles and inserts into the inner membrane in the absence of its pilotin.', *EMBO J* **25**(22), 5241--5249.
- Guilvout, I.; Hardie, K. R.; Sauvonnnet, N. & Pugsley, A. P. (1999), 'Genetic dissection of the outer membrane secretin PulD: are there distinct domains for multimerization and secretion specificity?', *J Bacteriol* **181**(23), 7212--7220.
- Guo, F.; Maurizi, M. R.; Esser, L. & Xia, D. (2002), 'Crystal structure of ClpA, an Hsp100 chaperone and regulator

of ClpAP protease.', *J Biol Chem* **277**(48), 46743--46752.

Hansen, J. K. & Forest, K. T. (2006), 'Type IV pilin structures: insights on shared architecture, fiber assembly, receptor binding and type II secretion.', *J Mol Microbiol Biotechnol* **11**(3-5), 192--207.

Hardie, K. R.; Lory, S. & Pugsley, A. P. (1996), 'Insertion of an outer membrane protein in Escherichia coli requires a chaperone-like protein.', *EMBO J* **15**(5), 978--988.

Hardie, K. R.; Seydel, A.; Guilvout, I. & Pugsley, A. P. (1996), 'The secretin-specific, chaperone-like protein of the general secretory pathway: separation of proteolytic protection and piloting functions.', *Mol Microbiol* **22**(5), 967--976.

Harris, B. Z. & Lim, W. A. (2001), 'Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly.', *J Cell Sci* **114**(Pt 18), 3219--3231.

He, S. Y.; Schoedel, C.; Chatterjee, A. K. & Collmer, A. (1991), 'Extracellular secretion of pectate lyase by the *Erwinia chrysanthemi* out pathway is dependent upon Sec-mediated export across the inner membrane.', *J Bacteriol* **173**(14), 4310--4317.

Hirst, T. R. & Holmgren, J. (1987), 'Conformation of protein secreted across bacterial outer membranes: a study of enterotoxin translocation from *Vibrio cholerae*.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(21), 7418--7422.

Howard, S. P.; Critch, J. & Bedi, A. (1993), 'Isolation and analysis of eight *exs* genes and their involvement in extracellular protein secretion and outer membrane assembly in *Aeromonas hydrophila*.', *J Bacteriol* **175**(20), 6695--6703.

Howard, S. P.; Gebhart, C.; Langen, G. R.; Li, G. & Strozen, T. G. (2006), 'Interactions between peptidoglycan and the ExeAB complex during assembly of the type II secretin of *Aeromonas hydrophila*.', *Mol Microbiol* **59**(3), 1062--1072.

Howard, S. P.; Meiklejohn, H. G.; Shivak, D. & Jahagirdar, R. (1996), 'A TonB-like protein and a novel membrane protein containing an ATP-binding cassette function together in exotoxin secretion.', *Mol Microbiol* **22**(4), 595--604.

Hu, N. T.; Hung, M. N.; Liao, C. T. & Lin, M. H. (1995), 'Subcellular location of XpsD, a protein required for extracellular protein secretion by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.', *Microbiology* **141** (Pt 6), 1395--1406.

Hu, N.-T.; Leu, W.-M.; Lee, M.-S.; Chen, A.; Chen, S.-C.; Song, Y.-L. & Chen, L.-Y. (2002), 'XpsG, the major pseudopilin in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, forms a pilus-like structure between cytoplasmic and outer membranes.', *Biochem J* **365**(Pt 1), 205--211.

Jack, R. L.; Buchanan, G.; Dubini, A.; Hatzixanthis, K.; Palmer, T. & Sargent, F. (2004), 'Coordinating assembly and export of complex bacterial proteins.', *EMBO J* **23**(20), 3962--3972.

Jeleń, F.; Oleksy, A.; Smietana, K. & Otlewski, J. (2003), 'PDZ domains - common players in the cell signaling.', *Acta Biochim Pol* **50**(4), 985--1017.

Johnson, T. L.; Scott, M. E. & Sandkvist, M. (2007), 'Mapping critical interactive sites within the periplasmic domain of the *Vibrio cholerae* type II secretion protein EpsM.', *J Bacteriol* **189**(24), 9082--9089.

Köhler, R.; Schäfer, K.; M?ller, S.; Vignon, G.; Diederichs, K.; Philippsen, A.; Ringler, P.; Pugsley, A. P.; Engel, A. & Welte, W. (2004), 'Structure and assembly of the pseudopilin PulG.', *Mol Microbiol* **54**(3), 647--664.

Köhler, S. D.; Weber, A.; Howard, S. P.; Welte, W. & Drescher, M. (2010), 'The proline-rich domain of TonB possesses an extended polyproline II-like conformation of sufficient length to span the periplasm of Gram-negative bacteria.', *Protein Sci* **19**(4), 625--630.

Kachlany, S. C.; Planet, P. J.; Desalle, R.; Fine, D. H.; Figurski, D. H. & Kaplan, J. B. (2001), 'flp-1, the first representative of a new pilin gene subfamily, is required for non-specific adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.', *Mol Microbiol* **40**(3), 542--554.

Kaiser, D. (2000), 'Bacterial motility: how do pili pull?', *Curr Biol* **10**(21), R777--R780.

- Karimova, G.; Pidoux, J.; Ullmann, A. & Ladant, D. (1998), 'A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(10), 5752--5756.
- Kazemi-Pour, N.; Condemine, G. & Cotte-Pattat, N. H. (2004), 'The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*.', *Proteomics* **4**(10), 3177--3186.
- Kazmierczak, B. I.; Mielke, D. L.; Russel, M. & Model, P. (1994), 'pIV, a filamentous phage protein that mediates phage export across the bacterial cell envelope, forms a multimer.', *J Mol Biol* **238**(2), 187--198.
- Keizer, D. W.; Slupsky, C. M.; Kalisiak, M.; Campbell, A. P.; Crump, M. P.; Sastry, P. A.; Hazes, B.; Irvin, R. T. & Sykes, B. D. (2001), 'Structure of a pilin monomer from *Pseudomonas aeruginosa*: implications for the assembly of pili.', *J Biol Chem* **276**(26), 24186--24193.
- Kim, T. J.; Lafferty, M. J.; Sandoe, C. M. & Taylor, R. K. (2000), 'Delineation of pilin domains required for bacterial association into microcolonies and intestinal colonization by *Vibrio cholerae*.', *Mol Microbiol* **35**(4), 896--910.
- Koebnik, R.; Locher, K. P. & Gelder, P. V. (2000), 'Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell.', *Mol Microbiol* **37**(2), 239--253.
- Koo, J.; Tammam, S.; Ku, S.-Y.; Sampaleanu, L. M.; Burrows, L. L. & Howell, P. L. (2008), 'PilF is an outer membrane lipoprotein required for multimerization and localization of the *Pseudomonas aeruginosa* Type IV pilus secretin.', *J Bacteriol* **190**(21), 6961--6969.
- Korotkov, K. V.; Gray, M. D.; Kreger, A.; Turley, S.; Sandkvist, M. & Hol, W. G. J. (2009), 'Calcium is essential for the major pseudopilin in the type 2 secretion system.', *J Biol Chem* **284**(38), 25466--25470.
- Korotkov, K. V. & Hol, W. G. J. (2008), 'Structure of the GspK-GspI-GspJ complex from the enterotoxigenic *Escherichia coli* type 2 secretion system.', *Nat Struct Mol Biol* **15**(5), 462--468.
- Korotkov, K. V.; Krumm, B.; Bagdasarian, M. & Hol, W. G. J. (2006), 'Structural and functional studies of EpsC, a crucial component of the type 2 secretion system from *Vibrio cholerae*.', *J Mol Biol* **363**(2), 311--321.
- Korotkov, K. V.; Pardon, E.; Steyaert, J. & Hol, W. G. J. (2009), 'Crystal structure of the N-terminal domain of the secretin GspD from ETEC determined with the assistance of a nanobody.', *Structure* **17**(2), 255--265.
- Kumamoto, C. A. (1989), '*Escherichia coli* SecB protein associates with exported protein precursors in vivo.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(14), 5320--5324.
- Kuo, W.-W.; Kuo, H.-W.; Cheng, C.-C.; Lai, H.-L. & Chen, L.-Y. (2005), 'Roles of the minor pseudopilins, XpsH, XpsI and XpsJ, in the formation of XpsG-containing pseudopilus in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.', *J Biomed Sci* **12**(4), 587--599.
- Laatu, M. & Condemine, G. (2003), 'Rhamnogalacturonate lyase RhiE is secreted by the out system in *Erwinia chrysanthemi*.', *J Bacteriol* **185**(5), 1642--1649.
- Lam, A. Y.; Pardon, E.; Korotkov, K. V.; Hol, W. G. J. & Steyaert, J. (2009), 'Nanobody-aided structure determination of the EpsI:EpsJ pseudopilin heterodimer from *Vibrio vulnificus*.', *J Struct Biol* **166**(1), 8--15.
- LaPointe, C. F. & Taylor, R. K. (2000), 'The type 4 prepilin peptidases comprise a novel family of aspartic acid proteases.', *J Biol Chem* **275**(2), 1502--1510.
- Lario, P. I.; Pfuetzner, R. A.; Frey, E. A.; Creagh, L.; Haynes, C.; Maurelli, A. T. & Strynadka, N. C. J. (2005), 'Structure and biochemical analysis of a secretin pilot protein.', *EMBO J* **24**(6), 1111--1121.
- Larsen, R. A.; Thomas, M. G. & Postle, K. (1999), 'Protonmotive force, ExbB and ligand-bound FepA drive conformational changes in TonB.', *Mol Microbiol* **31**(6), 1809--1824.
- Laurent, F.; Kotoujansky, A.; Labesse, G. & Bertheau, Y. (1993), 'Characterization and overexpression of the pem gene encoding pectin methylesterase of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937.', *Gene* **131**(1), 17--25.

- Lee, H. M.; Wang, K. C.; Liu, Y. L.; Yew, H. Y.; Chen, L. Y.; Leu, W. M.; Chen, D. C. & Hu, N. T. (2000), 'Association of the cytoplasmic membrane protein XpsN with the outer membrane protein XpsD in the type II protein secretion apparatus of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.', *J Bacteriol* **182**(6), 1549--1557.
- Lee, H.-M.; Chen, J.-R.; Lee, H.-L.; Leu, W.-M.; Chen, L.-Y. & Hu, N.-T. (2004), 'Functional dissection of the XpsN (GspC) protein of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* type II secretion machinery.', *J Bacteriol* **186**(10), 2946--2955.
- Lee, M.-S.; Chen, L.-Y.; Leu, W.-M.; Shiau, R.-J. & Hu, N.-T. (2005), 'Associations of the major pseudopilin XpsG with XpsN (GspC) and secretin XpsD of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* type II secretion apparatus revealed by cross-linking analysis.', *J Biol Chem* **280**(6), 4585--4591.
- Lentze, N. & Auerbach, D. (2008), 'Membrane-based yeast two-hybrid system to detect protein interactions.', *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 19**, Unit 19.17.
- Li, G. & Howard, S. P. (2010), 'ExeA binds to peptidoglycan and forms a multimer for assembly of the type II secretion apparatus in *Aeromonas hydrophila*.', *Mol Microbiol* **76**(3), 772--781.
- Lindeberg, M.; Boyd, C. M.; Keen, N. T. & Collmer, A. (1998), 'External loops at the C terminus of *Erwinia chrysanthemi* pectate lyase C are required for species-specific secretion through the out type II pathway.', *J Bacteriol* **180**(6), 1431--1437.
- Login, F. H. (2007), 'Structural and functional study of OutC, a component of the type II protein secretion system of the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*', PhD thesis, Université Claude Bernard - Lyon1.
- Login, F. H.; Fries, M.; Wang, X.; Pickersgill, R. W. & Shevchik, V. E. (2010), 'A 20-residue peptide of the inner membrane protein OutC mediates interaction with two distinct sites of the outer membrane secretin OutD and is essential for the functional type II secretion system in *Erwinia chrysanthemi*.', *Mol Microbiol* **76**(4), 944--955.
- Login, F. H. & Shevchik, V. E. (2006), 'The single transmembrane segment drives self-assembly of OutC and the formation of a functional type II secretion system in *Erwinia chrysanthemi*.', *J Biol Chem* **281**(44), 33152--33162.
- Long, C. D.; Madraswala, R. N. & Seifert, H. S. (1998), 'Comparisons between colony phase variation of *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 and pilus, pilin, and S-pilin expression.', *Infect Immun* **66**(5), 1918--1927.
- Lu, H. M. & Lory, S. (1996), 'A specific targeting domain in mature exotoxin A is required for its extracellular secretion from *Pseudomonas aeruginosa*.', *EMBO J* **15**(2), 429--436.
- Lybarger, S. R.; Johnson, T. L.; Gray, M. D.; Sikora, A. E. & Sandkvist, M. (2009), 'Docking and assembly of the type II secretion complex of *Vibrio cholerae*.', *J Bacteriol* **191**(9), 3149--3161.
- Maier, B.; Potter, L.; So, M.; Long, C. D.; Seifert, H. S. & Sheetz, M. P. (2002), 'Single pilus motor forces exceed 100 pN.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(25), 16012--16017.
- Maier, K. S.; Hubich, S.; Liebhart, H.; Krauss, S.; Kuhn, A. & Facey, S. J. (2008), 'An amphiphilic region in the cytoplasmic domain of KdpD is recognized by the signal recognition particle and targeted to the *Escherichia coli* membrane.', *Mol Microbiol* **68**(6), 1471--1484.
- Martin, P. R.; Watson, A. A.; McCaul, T. F. & Mattick, J. S. (1995), 'Characterization of a five-gene cluster required for the biogenesis of type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*.', *Mol Microbiol* **16**(3), 497--508.
- Matos, C. F. R. O.; Cola, A. D. & Robinson, C. (2009), 'TatD is a central component of a Tat translocon-initiated quality control system for exported FeS proteins in *Escherichia coli*.', *EMBO Rep* **10**(5), 474--479.
- Mattick, J. S. (2002), 'Type IV pili and twitching motility.', *Annu Rev Microbiol* **56**, 289--314.
- Maurer, C.; Panahandeh, S.; Jungkamp, A.-C.; Moser, M. & Müller, M. (2010), 'TatB Functions as an Oligomeric Binding Site for Folded Tat Precursor Proteins.', *Mol Biol Cell*.

- McTigue, M.A., Williams, D.R., and Tainer, J.A. (1995) Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. *J Mol Biol* **246**: 21–27
- McVay, C. S. & Hamood, A. N. (1995), 'Toxin A secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: the role of the first 30 amino acids of the mature toxin.', *Mol Gen Genet* **249**(5), 515--525.
- Michel, G.; Bleves, S.; Ball, G.; Lazdunski, A. & Filloux, A. (1998), 'Mutual stabilization of the XcpZ and XcpY components of the secretory apparatus in *Pseudomonas aeruginosa*.' *Microbiology* **144** (Pt 12), 3379--3386.
- Michel, G. P. F.; Durand, E. & Filloux, A. (2007), 'XphA/XqhA, a novel GspCD subunit for type II secretion in *Pseudomonas aeruginosa*.' *J Bacteriol* **189**(10), 3776--3783.
- Miller, J. H. (1972), 'Experiments in molecular genetics', *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Misic, A. M.; Satyshur, K. A. & Forest, K. T. (2010), 'P. aeruginosa PilT structures with and without nucleotide reveal a dynamic type IV pilus retraction motor.' *J Mol Biol* **400**(5), 1011--1021.
- Mitra, K.; Schaffitzel, C.; Shaikh, T.; Tama, F.; Jenni, S.; Brooks, C. L.; Ban, N. & Frank, J. (2005), 'Structure of the E. coli protein-conducting channel bound to a translating ribosome.' *Nature* **438**(7066), 318--324.
- Nasser, W.; Shevchik, V. E. & Cotte-Pattat, N. H. (1999), 'Analysis of three clustered polygalacturonase genes in *Erwinia chrysanthemi* 3937 revealed an anti-repressor function for the PecS regulator.' *Mol Microbiol* **34**(4), 641--650.
- Natale, P.; Brüser, T. & Driessen, A. J. M. (2008), 'Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane—distinct translocases and mechanisms.' *Biochim Biophys Acta* **1778**(9), 1735--1756.
- Natale, P.; Swaving, J.; van der Does, C.; de Keyzer, J. & Driessen, A. J. M. (2004), 'Binding of SecA to the SecYEG complex accelerates the rate of nucleotide exchange on SecA.' *J Biol Chem* **279**(14), 13769--13777.
- Nijeholt, J. A. L. A.; Bulacu, M.; Marrink, S. J. & Driessen, A. J. M. (2010), 'Immobilization of the plug domain inside the SecY channel allows unrestricted protein translocation.' *J Biol Chem* **285**(31), 23747--23754.
- Nouwen, N.; de Kruijff, B. & Tommassen, J. (1996), 'prlA suppressors in *Escherichia coli* relieve the proton electrochemical gradient dependency of translocation of wild-type precursors.' *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(12), 5953--5957.
- Nouwen, N.; van der Laan, M. & Driessen, A. J. (2001), 'SecDFyajC is not required for the maintenance of the proton motive force.' *FEBS Lett* **508**(1), 103--106.
- Nouwen, N.; Ranson, N.; Saibil, H.; Wolpensinger, B.; Engel, A.; Ghazi, A. & Pugsley, A. P. (1999), 'Secretin PulD: association with pilot PulS, structure, and ion-conducting channel formation.' *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(14), 8173--8177.
- Nouwen, N.; Stahlberg, H.; Pugsley, A. P. & Engel, A. (2000), 'Domain structure of secretin PulD revealed by limited proteolysis and electron microscopy.' *EMBO J* **19**(10), 2229--2236.
- Nunn, D. N. & Lory, S. (1993), 'Cleavage, methylation, and localization of the *Pseudomonas aeruginosa* export proteins XcpT, -U, -V, and -W.' *J Bacteriol* **175**(14), 4375--4382.
- Nunn, D. N. & Lory, S. (1991), 'Product of the *Pseudomonas aeruginosa* gene pilD is a prepilin leader peptidase.' *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(8), 3281--3285.
- Oates, J.; Barrett, C. M. L.; Barnett, J. P.; Byrne, K. G.; Bolhuis, A. & Robinson, C. (2005), 'The *Escherichia coli* twin-arginine translocation apparatus incorporates a distinct form of TatABC complex, spectrum of modular TatA complexes and minor TatAB complex.' *J Mol Biol* **346**(1), 295--305.
- Okinaka, Y.; Yang, C.-H.; Perna, N. T. & Keen, N. T. (2002), 'Microarray profiling of *Erwinia chrysanthemi* 3937 genes that are regulated during plant infection.' *Mol Plant Microbe Interact* **15**(7), 619--629.

- Pallen, M. J. & Ponting, C. P. (1997), 'PDZ domains in bacterial proteins.', *Mol Microbiol* **26**(2), 411--413.
- Parche, S.; Geissdörfer, W. & Hillen, W. (1997), 'Identification and characterization of xcpR encoding a subunit of the general secretory pathway necessary for dodecane degradation in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1.', *J Bacteriol* **179**(14), 4631--4634.
- Parge, H. E.; Forest, K. T.; Hickey, M. J.; Christensen, D. A.; Getzoff, E. D. & Tainer, J. A. (1995), 'Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 Å resolution.', *Nature* **378**(6552), 32--38.
- Pawelek, P. D.; Croteau, N.; Thow-Hing, C. N.; Khursigara, C. M.; Moiseeva, N.; Allaire, M. & Coulton, J. W. (2006), 'Structure of TonB in complex with FhuA, *E. coli* outer membrane receptor.', *Science* **312**(5778), 1399--1402.
- Peabody, C. R.; Chung, Y. J.; Yen, M.-R.; Vidal-Ingigliardi, D.; Pugsley, A. P. & Saier, M. H. (2003), 'Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella.', *Microbiology* **149**(Pt 11), 3051--3072.
- Pelacic, V. (2008), 'Type IV pili: e pluribus unum?', *Mol Microbiol* **68**(4), 827--837.
- Peterson, J. H.; Woolhead, C. A. & Bernstein, H. D. (2003), 'Basic amino acids in a distinct subset of signal peptides promote interaction with the signal recognition particle.', *J Biol Chem* **278**(46), 46155--46162.
- Planet, P. J.; Kachlany, S. C.; DeSalle, R. & Figurski, D. H. (2001), 'Phylogeny of genes for secretion NTPases: identification of the widespread tadA subfamily and development of a diagnostic key for gene classification.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(5), 2503--2508.
- du Plessis, D. J. F.; Nouwen, N. & Driessen, A. J. M. (2010), 'The Sec translocase.', *Biochim Biophys Acta*.
- Possot, O. M.; G?rard-Vincent, M. & Pugsley, A. P. (1999), 'Membrane association and multimerization of secretion component pulC.', *J Bacteriol* **181**(13), 4004--4011.
- Possot, O. M. & Pugsley, A. P. (1997), 'The conserved tetracysteine motif in the general secretory pathway component PulE is required for efficient pullulanase secretion.', *Gene* **192**(1), 45--50.
- Possot, O. M.; Vignon, G.; Bomchil, N.; Ebel, F. & Pugsley, A. P. (2000), 'Multiple interactions between pullulanase secretion components involved in stabilization and cytoplasmic membrane association of PulE.', *J Bacteriol* **182**(8), 2142--2152.
- Pugsley, A. P. (1992), 'Translocation of a folded protein across the outer membrane in *Escherichia coli*.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(24), 12058--12062.
- Pugsley, A. P. & Dupuy, B. (1992), 'An enzyme with type IV prepilin peptidase activity is required to process components of the general extracellular protein secretion pathway of *Klebsiella oxytoca*.', *Mol Microbiol* **6**(6), 751--760.
- Pugsley, A. P.; Poquet, I. & Kornacker, M. G. (1991), 'Two distinct steps in pullulanase secretion by *Escherichia coli* K12.', *Mol Microbiol* **5**(4), 865--873.
- Pugsley, A. P. & Reyss, I. (1990), 'Five genes at the 3' end of the *Klebsiella pneumoniae* pulC operon are required for pullulanase secretion.', *Mol Microbiol* **4**(3), 365--379.
- Py, B.; Chippaux, M. & Barras, F. (1993), 'Mutagenesis of cellulase EGZ for studying the general protein secretory pathway in *Erwinia chrysanthemi*.', *Mol Microbiol* **7**(5), 785--793.
- Py, B.; Loiseau, L. & Barras, F. (2001), 'An inner membrane platform in the type II secretion machinery of Gram-negative bacteria.', *EMBO Rep* **2**(3), 244--248.
- Py, B.; Loiseau, L. & Barras, F. (1999), 'Assembly of the type II secretion machinery of *Erwinia chrysanthemi*: direct interaction and associated conformational change between OutE, the putative ATP-binding component and the membrane protein OutL.', *J Mol Biol* **289**(3), 659--670.
- Randall, L. L.; Topping, T. B. & Hardy, S. J. (1990), 'No specific recognition of leader peptide by SecB, a

chaperone involved in protein export.', *Science* **248**(4957), 860--863.

Reeves, P. J.; Douglas, P. & Salmond, G. P. (1994), 'beta-Lactamase topology probe analysis of the OutO NMePhe peptidase, and six other Out protein components of the *Erwinia carotovora* general secretion pathway apparatus.', *Mol Microbiol* **12**(3), 445--457.

Reeves, P. J.; Whitcombe, D.; Wharam, S.; Gibson, M.; Allison, G.; Bunce, N.; Barallon, R.; Douglas, P.; Mulholland, V. & Stevens, S. (1993), 'Molecular cloning and characterization of 13 out genes from *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora*: genes encoding members of a general secretion pathway (GSP) widespread in gram-negative bacteria.', *Mol Microbiol* **8**(3), 443--456.

Reichow, S. L.; Korotkov, K. V.; Hol, W. G. J. & Gonen, T. (2010), 'Structure of the cholera toxin secretion channel in its closed state.', *Nat Struct Mol Biol*.

Reverchon, S. & Robert-Baudouy, J. (1987), 'Regulation of expression of pectate lyase genes *pelA*, *pelD*, and *pelE* in *Erwinia chrysanthemi*.', *J Bacteriol* **169**(6), 2417--2423.

Robert, V.; Filloux, A. & Michel, G. P. F. (2005), 'Role of XcpP in the functionality of the *Pseudomonas aeruginosa* secreton.', *Res Microbiol* **156**(8), 880--886.

Robert, V.; Hayes, F.; Lazdunski, A. & Michel, G. P. F. (2002), 'Identification of XcpZ domains required for assembly of the secreton of *Pseudomonas aeruginosa*.', *J Bacteriol* **184**(6), 1779--1782.

Robien, M. A.; Krumm, B. E.; Sandkvist, M. & Hol, W. G. J. (2003), 'Crystal structure of the extracellular protein secretion NTPase EpsE of *Vibrio cholerae*.', *J Mol Biol* **333**(3), 657--674.

Rose, R. E. (1988), 'The nucleotide sequence of pACYC184.', *Nucleic Acids Res* **16**(1), 355.

Russ, W. P. & Engelman, D. M. (1999), 'TOXCAT: a measure of transmembrane helix association in a biological membrane.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(3), 863--868.

Rytkönen, A.; Johansson, L.; Asp, V.; Albiger, B. & Jonsson, A. B. (2001), 'Soluble pilin of *Neisseria gonorrhoeae* interacts with human target cells and tissue.', *Infect Immun* **69**(10), 6419--6426.

Sal-Man, N.; Gerber, D.; Bloch, I. & Shai, Y. (2007), 'Specificity in transmembrane helix-helix interactions mediated by aromatic residues.', *J Biol Chem* **282**(27), 19753--19761.

Sampaleanu, L. M.; Bonanno, J. B.; Ayers, M.; Koo, J.; Tammam, S.; Burley, S. K.; Almo, S. C.; Burrows, L. L. & Howell, P. L. (2009), 'Periplasmic domains of *Pseudomonas aeruginosa* PilN and PilO form a stable heterodimeric complex.', *J Mol Biol* **394**(1), 143--159.

Samson, R.; Legendre, J. B.; Christen, R.; Saux, M. F.-L.; Achouak, W. & Gardan, L. (2005), 'Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov.', *Int J Syst Evol Microbiol* **55**(Pt 4), 1415--1427.

Sandkvist, M.; Bagdasarian, M.; Howard, S. P. & DiRita, V. J. (1995), 'Interaction between the autokinase EpsE and EpsL in the cytoplasmic membrane is required for extracellular secretion in *Vibrio cholerae*.', *EMBO J* **14**(8), 1664--1673.

Sandkvist, M.; Hirst, T. R. & Bagdasarian, M. (1987), 'Alterations at the carboxyl terminus change assembly and secretion properties of the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin.', *J Bacteriol* **169**(10), 4570--4576.

Sandkvist, M.; Hough, L. P.; Bagdasarian, M. M. & Bagdasarian, M. (1999), 'Direct interaction of the EpsL and EpsM proteins of the general secretion apparatus in *Vibrio cholerae*.', *J Bacteriol* **181**(10), 3129--3135.

Sandkvist, M.; Keith, J. M.; Bagdasarian, M. & Howard, S. P. (2000), 'Two regions of EpsL involved in species-specific protein-protein interactions with EpsE and EpsM of the general secretion pathway in *Vibrio cholerae*.', *J Bacteriol* **182**(3), 742--748.

- Sandkvist, M.; Michel, L. O.; Hough, L. P.; Morales, V. M.; Bagdasarian, M.; Koomey, M.; DiRita, V. J. & Bagdasarian, M. (1997), 'General secretion pathway (eps) genes required for toxin secretion and outer membrane biogenesis in *Vibrio cholerae*.', *J Bacteriol* **179**(22), 6994--7003.
- Sargent, F. (2007), 'The twin-arginine transport system: moving folded proteins across membranes.', *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 5), 835--847.
- Sargent, F.; Bogsch, E. G.; Stanley, N. R.; Wexler, M.; Robinson, C.; Berks, B. C. & Palmer, T. (1998), 'Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway.', *EMBO J* **17**(13), 3640--3650.
- Satyshur, K. A.; Worzalla, G. A.; Meyer, L. S.; Heiniger, E. K.; Aukema, K. G.; Misic, A. M. & Forest, K. T. (2007), 'Crystal structures of the pilus retraction motor PilT suggest large domain movements and subunit cooperation drive motility.', *Structure* **15**(3), 363--376.
- Sauvonnet, N.; Poquet, I. & Pugsley, A. P. (1995), 'Extracellular secretion of pullulanase is unaffected by minor sequence changes but is usually prevented by adding reporter proteins to its N- or C-terminal end.', *J Bacteriol* **177**(18), 5238--5246.
- Sauvonnet, N. & Pugsley, A. P. (1996), 'Identification of two regions of *Klebsiella oxytoca* pullulanase that together are capable of promoting beta-lactamase secretion by the general secretory pathway.', *Mol Microbiol* **22**(1), 1--7.
- Sauvonnet, N.; Vignon, G.; Pugsley, A. P. & Gounon, P. (2000), 'Pilus formation and protein secretion by the same machinery in *Escherichia coli*.', *EMBO J* **19**(10), 2221--2228.
- Sawaya, M. R.; Guo, S.; Tabor, S.; Richardson, C. C. & Ellenberger, T. (1999), 'Crystal structure of the helicase domain from the replicative helicase-primase of bacteriophage T7.', *Cell* **99**(2), 167--177.
- Schoenhofen, I. C.; Li, G.; Strozen, T. G. & Howard, S. P. (2005), 'Purification and characterization of the N-terminal domain of ExeA: a novel ATPase involved in the type II secretion pathway of *Aeromonas hydrophila*.', *J Bacteriol* **187**(18), 6370--6378.
- Scott, M. E.; Dossani, Z. Y. & Sandkvist, M. (2001), 'Directed polar secretion of protease from single cells of *Vibrio cholerae* via the type II secretion pathway.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24), 13978--13983.
- Serek, J.; Bauer-Manz, G.; Struhalla, G.; van den Berg, L.; Kiefer, D.; Dalbey, R. & Kuhn, A. (2004), 'Escherichia coli YidC is a membrane insertase for Sec-independent proteins.', *EMBO J* **23**(2), 294--301.
- Shan, S.; Chandrasekar, S. & Walter, P. (2007), 'Conformational changes in the GTPase modules of the signal reception particle and its receptor drive initiation of protein translocation.', *J Cell Biol* **178**(4), 611--620.
- Shevchik, V. E.; Bortoli-German, I.; Robert-Baudouy, J.; Robinet, S.; Barras, F. & Condemine, G. (1995), 'Differential effect of dsbA and dsbC mutations on extracellular enzyme secretion in *Erwinia chrysanthemi*.', *Mol Microbiol* **16**(4), 745--753.
- Shevchik, V. E. & Condemine, G. (1998), 'Functional characterization of the *Erwinia chrysanthemi* OutS protein, an element of a type II secretion system.', *Microbiology* **144** (Pt 11), 3219--3228.
- Shevchik, V. E.; Condemine, G.; Cotte-Pattat, N. H. & Robert-Baudouy, J. (1996), 'Characterization of pectin methylesterase B, an outer membrane lipoprotein of *Erwinia chrysanthemi* 3937.', *Mol Microbiol* **19**(3), 455--466.
- Shevchik, V. E.; Condemine, G.; Robert-Baudouy, J. & Cotte-Pattat, N. H. (1999), 'The exopolysaccharide lyase PelW and the oligogalacturonate lyase Ogl, two cytoplasmic enzymes of pectin catabolism in *Erwinia chrysanthemi* 3937.', *J Bacteriol* **181**(13), 3912--3919.
- Shevchik, V. E. & Cotte-Pattat, N. H. (2003), 'PaeX, a second pectin acetylesterase of *Erwinia chrysanthemi* 3937.', *J Bacteriol* **185**(10), 3091--3100.
- Shevchik, V. E. & Cotte-Pattat, N. H. (1997), 'Identification of a bacterial pectin acetyl esterase in *Erwinia chrysanthemi* 3937.', *Mol Microbiol* **24**(6), 1285--1301.

- Shevchik, V. E.; Kester, H. C.; Benen, J. A.; Visser, J.; Robert-Baudouy, J. & Cotte-Pattat, N. H. (1999), 'Characterization of the exopolygalacturonate lyase PelX of *Erwinia chrysanthemi* 3937.', *J Bacteriol* **181**(5), 1652--1663.
- Shevchik, V. E.; Robert-Baudouy, J. & Condemine, G. (1997), 'Specific interaction between OutD, an *Erwinia chrysanthemi* outer membrane protein of the general secretory pathway, and secreted proteins.', *EMBO J* **16**(11), 3007--3016.
- Shimizu, T.; Kawakami, S.; Sato, T.; Sasaki, T.; Higashide, M.; Hamabata, T.; Ohta, T. & Noda, M. (2007), 'The serine 31 residue of the B subunit of Shiga toxin 2 is essential for secretion in enterohemorrhagic *Escherichia coli*.', *Infect Immun* **75**(5), 2189--2200.
- Shiue, S.-J.; Chien, I.-L.; Chan, N.-L.; Leu, W.-M. & Hu, N.-T. (2007), 'Mutation of a key residue in the type II secretion system ATPase uncouples ATP hydrolysis from protein translocation.', *Mol Microbiol* **65**(2), 401--412.
- Shiue, S.-J.; Kao, K.-M.; Leu, W.-M.; Chen, L.-Y.; Chan, N.-L. & Hu, N.-T. (2006), 'XpsE oligomerization triggered by ATP binding, not hydrolysis, leads to its association with XpsL.', *EMBO J* **25**(7), 1426--1435.
- Skerker, J. M. & Berg, H. C. (2001), 'Direct observation of extension and retraction of type IV pili.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(12), 6901--6904.
- van der Sluis, E. O. & Driessen, A. J. M. (2006), 'Stepwise evolution of the Sec machinery in Proteobacteria.', *Trends Microbiol* **14**(3), 105--108.
- Strom, M. S. & Lory, S. (1991), 'Amino acid substitutions in pilin of *Pseudomonas aeruginosa*. Effect on leader peptide cleavage, amino-terminal methylation, and pilus assembly.', *J Biol Chem* **266**(3), 1656--1664.
- Szczesny, R.; Jordan, M.; Schramm, C.; Schulz, S.; Cogez, V.; Bonas, U. & Buttner, D. (2010), 'Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.', *New Phytol* **187**(4), 983--1002.
- Tonjum, T.; Caugant, D. A.; Dunham, S. A. & Koomey, M. (1998), 'Structure and function of repetitive sequence elements associated with a highly polymorphic domain of the *Neisseria meningitidis* PilQ protein.', *Mol Microbiol* **29**(1), 111--124.
- Tardy, F.; Nasser, W.; Robert-Baudouy, J. & Cotte-Pattat, N. H. (1997), 'Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potential inhibitors.', *J Bacteriol* **179**(8), 2503--2511.
- Tarry, M. J.; Schäfer, E.; Chen, S.; Buchanan, G.; Greene, N. P.; Lea, S. M.; Palmer, T.; Saibil, H. R. & Berks, B. C. (2009), 'Structural analysis of substrate binding by the TatBC component of the twin-arginine protein transport system.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(32), 13284--13289.
- Thomas, J. D.; Reeves, P. J. & Salmond, G. P. (1997), 'The general secretion pathway of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: analysis of the membrane topology of OutC and OutF.', *Microbiology* **143** (Pt 3), 713--720.
- Tsai, R.-T.; Leu, W.-M.; Chen, L.-Y. & Hu, N.-T. (2002), 'A reversibly dissociable ternary complex formed by XpsL, XpsM and XpsN of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* type II secretion apparatus.', *Biochem J* **367**(Pt 3), 865--871.
- Turner, L. R.; Lara, J. C.; Nunn, D. N. & Lory, S. (1993), 'Mutations in the consensus ATP-binding sites of XcpR and PilB eliminate extracellular protein secretion and pilus biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*.', *J Bacteriol* **175**(16), 4962--4969.
- Vignon, G.; Köhler, R.; Larquet, E.; Giroux, S.; Pr?vost, M.-C.; Roux, P. & Pugsley, A. P. (2003), 'Type IV-like pili formed by the type II secreton: specificity, composition, bundling, polar localization, and surface presentation of peptides.', *J Bacteriol* **185**(11), 3416--3428.
- 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**(23), 6735--6741.

- Voulhoux, R.; Bos, M. P.; Geurtsen, J.; Mols, M. & Tommassen, J. (2003), 'Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly.', *Science* **299**(5604), 262--265.
- Vrontou, E. & Economou, A. (2004), 'Structure and function of SecA, the preprotein translocase nanomotor.', *Biochim Biophys Acta* **1694**(1-3), 67--80.
- Waldor, M. K. & Mekalanos, J. J. (1996), 'Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin.', *Science* **272**(5270), 1910--1914.
- Wandersman, C. (1989), 'Secretion, processing and activation of bacterial extracellular proteases.', *Mol Microbiol* **3**(12), 1825--1831.
- Whitchurch, C. B. & Mattick, J. S. (1994), 'Characterization of a gene, pilU, required for twitching motility but not phage sensitivity in *Pseudomonas aeruginosa*.', *Mol Microbiol* **13**(6), 1079--1091.
- Wickner, W.; Driessen, A. J. & Hartl, F. U. (1991), 'The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane.', *Annu Rev Biochem* **60**, 101--124.
- Willats, W. G.; McCartney, L.; Mackie, W. & Knox, J. P. (2001), 'Pectin: cell biology and prospects for functional analysis.', *Plant Mol Biol* **47**(1-2), 9--27.
- Winther-Larsen, H. C.; Wolfgang, M. C.; van Putten, J. P. M.; Roos, N.; Aas, F. E.; Egge-Jacobsen, W. M.; Maier, B. & Koomey, M. (2007), '*Pseudomonas aeruginosa* Type IV pilus expression in *Neisseria gonorrhoeae*: effects of pilin subunit composition on function and organelle dynamics.', *J Bacteriol* **189**(18), 6676--6685.
- van der Wolk, J. P.; de Wit, J. G. & Driessen, A. J. (1997), 'The catalytic cycle of the *Escherichia coli* SecA ATPase comprises two distinct preprotein translocation events.', *EMBO J* **16**(24), 7297--7304.
- Wong, K. R. & Buckley, J. T. (1991), 'Site-directed mutagenesis of a single tryptophan near the middle of the channel-forming toxin aerolysin inhibits its transfer across the outer membrane of *Aeromonas salmonicida*.', *J Biol Chem* **266**(22), 14451--14456.
- Yamagata, A. & Tainer, J. A. (2007), 'Hexameric structures of the archaeal secretion ATPase GspE and implications for a universal secretion mechanism.', *EMBO J* **26**(3), 878--890.
- Yanez, M. E.; Korotkov, K. V.; Abendroth, J. & Hol, W. G. J. (2008), 'Structure of the minor pseudopilin EpsH from the Type 2 secretion system of *Vibrio cholerae*.', *J Mol Biol* **377**(1), 91--103.
- Yanez, M. E.; Korotkov, K. V.; Abendroth, J. & Hol, W. G. J. (2008), 'The crystal structure of a binary complex of two pseudopilins: EpsI and EpsJ from the type 2 secretion system of *Vibrio vulnificus*.', *J Mol Biol* **375**(2), 471--486.
- Ye, J.; Osborne, A. R.; Groll, M. & Rapoport, T. A. (2004), 'RecA-like motor ATPases--lessons from structures.', *Biochim Biophys Acta* **1659**(1), 1--18.
- Yoneyama, H.; Akiba, K.; Hori, H.; Ando, T. & Nakae, T. (2010), 'Tat pathway-mediated translocation of the sec pathway substrate protein MexA, an inner membrane component of the MexAB-OprM xenobiotic extrusion pump in *Pseudomonas aeruginosa*.', *Antimicrob Agents Chemother* **54**(4), 1492--1497.
- Yu, X. & Egelman, E. H. (1997), 'The RecA hexamer is a structural homologue of ring helicases.', *Nat Struct Biol* **4**(2), 101--104.
- Zhou, J. & Xu, Z. (2005), 'The structural view of bacterial translocation-specific chaperone SecB: implications for function.', *Mol Microbiol* **58**(2), 349--357.
- Zhou, S.; Yomano, L. P.; Saleh, A. Z.; Davis, F. C.; Aldrich, H. C. & Ingram, L. O. (1999), 'Enhancement of expression and apparent secretion of *Erwinia chrysanthemi* endoglucanase (encoded by celZ) in *Escherichia coli* B.', *Appl Environ Microbiol* **65**(6), 2439--2445.
- Zwizinski, C. & Wickner, W. (1980), 'Purification and characterization of leader (signal) peptidase from *Escherichia coli*.', *J Biol Chem* **255**(16), 7973--7977.

FOLIO ADMINISTRATIF

THESE SOUTENUE DEVANT L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON

NOM : LALLEMAND

DATE de SOUTENANCE : 10/01/2011

(avec précision du nom de jeune fille, le cas échéant)

Prénoms : MATHILDE ANNE MARIE

TITRE : DISSECTION DES INTERACTIONS ENTRE LES COMPOSANTS DU SYSTEME DE SECRETION DE TYPE II CHEZ LA BACTERIE PHYTOPATHOGENE ERWINIA CHRYSANTHEMI (DICKEYA DADANTII)

NATURE : Doctorat

Numéro d'ordre : 2011-ISAL-0001

Ecole doctorale : Evolution, écosystèmes, microbiologie, modélisation

Spécialité : Microbiologie moléculaire

Cote B.I.U. - Lyon : T 50/210/19 /

et

bis

CLASSE :

RESUME : Le système de sécrétion de type II (T2SS) est largement répandu chez les bactéries à Gram négatif. Il permet la sécrétion d'enzymes lytiques et de toxines. Chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi*, les pectinases, sécrétées par ce système appelé Out, dégradent la pectine, provoquant les symptômes de pourriture molle. La sécrétion par le T2SS se passe en 2 étapes : les protéines traversent la membrane interne par le système Sec ou le système Tat. Une fois dans le périplasme, elles sont repliées et transloquées par le T2SS à travers la membrane externe. Le système Out est composé de 14 protéines intégrées ou associées à l'une des deux membranes. Son assemblage et son fonctionnement restent obscurs. Une plateforme serait formée dans la membrane interne par OutE, -F, -L, -M et -C. Ces trois derniers composants sont des protéines bitopiques dont la stœchiométrie et le rôle sont inconnus. Pour identifier des interactions entre ses composants, nous avons utilisé le double-hybride bactérien, basé sur la reconstitution de l'activité d'adénylate cyclase. Nous avons démontré que le domaine de type ferrédoxine, situé en C-terminus d'OutL et d'OutM, est directement impliqué dans l'homo- et l'hétérodimérisation de ces protéines. Une interaction entre les régions périplasmiques d'OutC et d'OutD a été aussi détectée (Login *et al.*, 2010). Pour mieux analyser les multiples interactions au sein du T2SS, des expériences de triple-hybride ont été réalisées en co-exprimant différentes combinaisons des régions solubles de trois composants. Nos résultats suggèrent qu'OutL empêche l'interaction entre OutC et OutD. Par ailleurs, OutL est impliquée dans l'activation de l'ATPase OutE, le moteur du système (Camberg *et al.*, 2007). OutL serait donc impliquée dans la transmission du signal entre le périplasme et le cytoplasme et pourrait intervenir dans la dissociation du complexe OutD/OutC. Afin d'analyser le rôle des segments transmembranaires (TMS) de composants du T2SS, nous avons adapté la technique du double-hybride. Le domaine de la protéine rapporteur Cya a été fusionné au N-terminus du TMS et BlaM au C-terminus. BlaM sert à contrôler la topologie correcte des fusions dans la membrane. Plusieurs interactions bi-partenaires entre les TMS d'OutC, OutL et OutM ont été ainsi détectées. Ce travail a été complété par une étude *in vitro* (pull-down) et par mutagenèse dirigée. Ces interactions TMS-TMS pourraient intervenir dans la transmission du signal du périplasme vers le cytoplasme à travers la membrane interne.

MOTS-CLES : système de sécrétion de type II, GspL, GspM, GspC, interaction protéine-protéine, double-hybride bactérien, segment transmembranaire

Laboratoire (s) de recherche : UMR 5240 UCBL-INSA-CNRS-BCS Microbiologie, Adaptation et Pathogénie

Directeur de thèse: Vladimir SHEVCHIK

Président de jury : Pr. Philippe LEJEUNE

Composition du jury : Pr. Philippe LEJEUNE, Dr. Sophie BLEVES, Dr. Olivera FRANCETIC, Dr. Christophe GRANGEASSE,

Dr. Vladimir SHEVCHIK