



HAL
open science

Caractérisation d'une nouvelle voie d'adressage des protéines à la membrane externe des bactéries à Gram négatif

Arnaud Rondelet

► **To cite this version:**

Arnaud Rondelet. Caractérisation d'une nouvelle voie d'adressage des protéines à la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Sciences agricoles. INSA de Lyon, 2012. Français. NNT : 2012ISAL0126 . tel-00833222

HAL Id: tel-00833222

<https://theses.hal.science/tel-00833222>

Submitted on 12 Jun 2013

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

Caractérisation d'une nouvelle voie d'adressage des protéines à la membrane externe des bactéries à Gram négatif.

présentée devant

L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon

pour obtenir

le grade de Docteur

Ecole doctorale : Evolution, Ecosystème, Microbiologie, Modélisation

Spécialité : **Microbiologie**

par

Arnaud Rondelet

Le 7 décembre 2012

JURY

Mme Françoise Jacob-Dubuisson Directeur de Recherche CNRS,

Rapporteur

Mr Jean Michel Betton, Directeur de Recherche CNRS,

Rapporteur

Mr Christophe Grangeasse, Directeur de Recherche CNRS,

Examineur

Mr Philippe Lejeune, Professeur à l'INSA de Lyon,

Examineur

Mr Guy Condemine, Directeur de Recherche CNRS.

Directeur de Thèse

INSA Direction de la Recherche - Ecoles Doctorales – Quinquennal 2011-2015

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
CHIMIE	CHIMIE DE LYON http://www.edchimie-lyon.fr Insa : R. GOURDON	M. Jean Marc LANCELIN Université de Lyon – Collège Doctoral Bât ESCPE 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 13 95 directeur@edchimie-lyon.fr
E.E.A.	ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE http://edeea.ec-lyon.fr Secrétariat : M.C. HAVGOUDOUKIAN eea@ec-lyon.fr	M. Gérard SCORLETTI Ecole Centrale de Lyon 36 avenue Guy de Collongue 69134 ECULLY Tél : 04.72.18 60 97 Fax : 04 78 43 37 17 Gerard.scorletti@ec-lyon.fr
E2M2	EVOLUTION, ECOSYSTEME, MICROBIOLOGIE, MODELISATION http://e2m2.universite-lyon.fr Insa : H. CHARLES	Mme Gudrun BORNETTE CNRS UMR 5023 LEHNA Université Claude Bernard Lyon 1 Bât Forel 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.72.43.12.94 e2m2@biomserv.univ-lyon1.fr
EDISS	INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE http://ww2.ibcp.fr/ediss Sec : Safia AIT CHALAL Insa : M. LAGARDE	M. Didier REVEL Hôpital Louis Pradel Bâtiment Central 28 Avenue Doyen Lépine 69677 BRON Tél : 04.72.68 49 09 Fax :04 72 35 49 16 Didier.revel@creatis.uni-lyon1.fr
INFOMATHS	INFORMATIQUE ET MATHEMATIQUES http://infomaths.univ-lyon1.fr	M. Johannes KELLENDONK Université Claude Bernard Lyon 1 INFOMATHS Bâtiment Braconnier 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72. 44.82.94 Fax 04 72 43 16 87 infomaths@univ-lyon1.fr
Matériaux	MATERIAUX DE LYON Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry Ed.materiaux@insa-lyon.fr	M. Jean-Yves BUFFIERE INSA de Lyon MATEIS Bâtiment Saint Exupéry 7 avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.72.43 83 18 Fax 04 72 43 85 28 Jean-yves.buffiere@insa-lyon.fr
MEGA	MECANIQUE, ENERGETIQUE, GENIE CIVIL, ACOUSTIQUE Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry mega@insa-lyon.fr	M. Philippe BOISSE INSA de Lyon Laboratoire LAMCOS Bâtiment Jacquard 25 bis avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél :04.72.43.71.70 Fax : 04 72 43 72 37 Philippe.boisse@insa-lyon.fr
ScSo	ScSo* M. OBADIA Lionel Sec : Viviane POLSINELLI Insa : J.Y. TOUSSAINT	M. OBADIA Lionel Université Lyon 2 86 rue Pasteur 69365 LYON Cedex 07 Tél : 04.78.69.72.76 Fax : 04.37.28.04.48 Lionel.Obadia@univ-lyon2.fr

*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

Table des matières

Remerciements	3
Abréviations	5
Liste des figures et tableaux	6
Résumé	8
Summary	9
Chapitre I Introduction générale	10
Chapitre II Biosynthèse des protéines de la membrane externe chez les protéobactéries	13
I Introduction	13
II Exportation des protéines	14
II.A Le système SEC.....	14
II.B Le système Tat.....	18
III Biosynthèse des protéines en tonneau β	24
III.A Introduction	24
III.B Les chaperons périplasmiques SurA, Skp et DegP	25
III.C Insertion des PT β dans la ME par le complexe Bam	29
IV Biosynthèse des lipoprotéines	35
IV.A Introduction.....	35
IV.B Exportation et maturation des lipoprotéines.....	36
IV.C Le système Lol : découverte et informations générales.....	36
IV.D Signal d'adressage des lipoprotéines à la ME	38
IV.E Mécanismes de fonctionnement du système Lol	41
V Protéines atypiques de membrane externe	43
V.A Introduction	43
V.B Modification post traductionnelle d'une PT β	43
V.C Cas des lipoprotéines Wza et PelC.....	44
V.D Sécrétines	44
V.E PnIH, une protéine ancrée dans la ME par une séquence signal Tat	46
VI Conclusion, hypothèses et objectifs de l'étude	47
Chapitre III Identification de partenaires de PnIH par des méthodes biochimiques...	49
I Introduction	49
II Matériel et méthodes	49

III Résultats	53
III.A Copurification de PnIH et de ses partenaires	53
III.B Copurification de la séquence signal de PnIH et de ses partenaires.....	54
III.C Utilisation des sphéroplastes pour identifier les partenaires de PnIH.....	56
IV Discussion et Conclusion	57
Chapitre IV Implication de SurA dans l'adressage de PnIH à la ME et analyse de la séquence signal de PnIH (Article)	60
Chapitre VI Discussion générale et perspectives	77
Bibliographie	84

Remerciements

Je voudrais commencer par remercier Mme Françoise Jacob-Dubuisson et Mr Jean Michel Betton d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Je remercie également Mr Christophe Grangeasse et Mr Philippe Lejeune d'avoir accepté d'examiner cette thèse.

Mes remerciements les plus sincères à Guy Condemine, pour son accueil et son encadrement tout au long de ces presque 4 ans (Master inclus). J'ai beaucoup appris à son contact tant en sciences qu'en culture générale ou qu'en matériel de randonnée !!! Merci pour les discussions sur les sujets variés qui ont occupé les long temps cumulés de centrifugation. Je dois aussi le remercier de m'avoir laissé partir à Oxford lors du premier semestre de Master 2 ou encore de m'avoir permis de réaliser tous mes « side project ». Guy, je vous le promets, je viendrais un jour aux portes ouvertes de Julienas.

Merci à Nicole Cotte Pattat pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire Microbiologie Adaptation et Pathogénie ainsi que pour sa patience et son efficacité lors de mes demandes de dernières minutes.

Je tiens à remercier la région Rhône Alpes et l'ex-cluster 10 infectiologie pour son financement. Une pensée particulière à Agnès Delebasse Nabet pour son travail énorme au sein du cluster. Merci à tous les Rhône-Alpins qui ont indirectement participé au financement de cette thèse.

A mi parcours de cette thèse il y a eu mon comité de pilotage. Et je tiens à remercier vivement Agnès Rodrigue, Florence Wisniewski et Nicolas Blot pour leur attention, leurs conseils et leurs encouragements.

De sincères remerciements à Vladimir Shevchik pour le temps qu'il a passé à m'aiguiller scientifiquement et pour les discussions diverses et variées sur des sujets allant de la chromatographie d'affinité à l'existence d'une vie après la mort. Je lui dois beaucoup. Je remercie également Sylvie Reverchon pour les discussions, les fous rires et les points biblio (ces petites publications qui apparaissent sur mon bureau de façon inopinée). Merci à William Nasser notamment pour sa bonne humeur et sa disponibilité. Merci également à tous les enseignants chercheurs du MAP pour les échanges scientifiques et leurs conseils au long de cette thèse.

Merci à Géraldine Effantin, j'espère que travailler avec moi ne t'a pas « trop matisé » et que tu arriveras un jour à te sortir « My heart will go on » de la tête. Merci à Amy Ko An Ru pour ses cours d'anglais et son aide technique.

Un grand merci à Yvette, Véro et Jean Michel, sans votre travail le mien aurait été beaucoup plus compliqué ! Vous avez assuré !!!!! Jean Michel, merci également pour les bons moments à l'atelier.

Merci également, aux équipes iGEM INSA 2010 et 2011 pour les grands moments passés !

Merci au personnel de l'INSA pour m'avoir accueilli et aidé au cours de ces 6 années.

Nous voilà déjà sur la deuxième page des remerciements... et je dois bien dire qu'il y a encore beaucoup trop de personnes sans qui cette thèse n'aurait pas été la même. Il y a d'abord Yann Ferrandez qui m'a initié au mystère PnlH. Tes coups de pieds aux fesses (que j'ai jamais ni vu ni senti) vont me (m'ont ??) manquer. Il y a également la paire Camilo Arias Goeta et Daniel Clay Hutchinson. Ces deux compères m'ont accompagné (souvent à distance) depuis mon arrivée à l'INSA et je leur dois tellement de choses qu'il serait inadapté d'en faire la liste ici. Gracias y Thank you les mecs. Merci aux étudiants du laboratoire. Il y en a eu tellement que j'en oublierais forcément et j'en suis désolé. Merci à Camille Pineau pour la relecture du manuscrit, le café et les craquages incompris par le reste du monde. Finalement, je te pardonne d'exister. Merci à Natacha Guschinskaya pour tout y compris le fait de m'avoir nourri dans les jours de disettes. Merci à la bande Camille Blériot et Axel Cournac pour les grands moments de fêtes et de discussion sur la vie. Les gars ne changez rien car la soirée ne fait que commencer ! Merci à Julien Wawrzyniak mon seul compagnon masculin pérenne du 4 ème ! Heureusement que tu as été là à maintes reprises ! (et oui t'es dans les étudiants maintenant !!!) Enfin, merci pour tout à Mathilde, Denis, Camille, Sana, Ouafa, Susan, Xiao , Manon et Honoré, je vous dois un petit Coca Coli. Merci, à mon ultracentrifugeuse pour les 300 000 000 de tours sans jamais craquer !

Et ceux d'en face ? Mes compagnons de galère au domus. Merci à Benoit (père, président) Drogue pour m'avoir supporté en tant que coloc mais aussi pour les discussions interminables, les fous rires, les conseils... enfin tout quoi (oui, oui même les cours de crawl sur carrelage). Je voterais pour toi en 2022 (2017 ça fait un peu court). Merci à Vincent Thomas Raqu(Ain) pour les sarsages amicaux, les expressions farfelues et tout le reste ! Je sais pas si tu es au courant mais tu me dois un mur et une poche de jeans. Merci à Tony Diogène Campillo le montagnard qui se soigne à la Chartreuse ! Merci à Juliana Almario pour les longues discussions, les foutages de (ma) gueules, la musique et les conseils sur la philosophie de la science ! J'en déduis (du verbe endéduire) que la Colombie regorge de personnes à connaître ! Merci à Jeanne Doré pour les conseils vestimentaires et les validations ! Merci également à Step Petit pour les fous rires (et les pleures). Merci à mon rayon de soleil du midi, Daniel Muller, et son compère Ludovic Vial !! Merci à ceux qui resteront toujours pour moi les M2 crétiens : Magali (sans e) (kikiki) Dequivre, Guillaume Minard (t'as retrouvé tes clefs ?) et Steph Borland !!! Il y a aussi Maxime Brutot, Marie Lara Bouffaud, David Chapulliot (t'as trouvé des rideaux ?) etc... J'en oublie ne vous offusquez pas SVP. En plus, à force de remercier la 5557 j'en arrive à oublier que je ne suis pas des vôtres. Buck and V for ever !

Je me dois de remercier également ceux qui m'ont accompagné de près ou de loin durant ces trois ans : Tuf, Glid, Pux, Jerem, Nath, Alix, Brunuch' la flamkuch', Gael le serial cloner, James Cameron, LDC et Kate W...

Enfin et surtout... Merci à ma famille et spécialement à ma mère, mon père et ma sœur pour leur soutien et leurs encouragements... Sans eux, rien de tous ça n'aurait été possible !!! Merci à tous d'avoir supporter mes absences... Enfin, je tiens à dédier ce manuscrit à Jean Claude : j'ai continué de foncer, voilà ce que ça donne.

Abréviations

ABC :	ATP Binding Cassette	OM :	Outer membrane
Ar :	Acide aminé aromatique	OMA :	Outer membrane auxiliary
ARN :	Acide ribonucléique	OMP :	Outer membrane integral protein
ATP :	Adénosine triphosphate	OMP85 :	Outer membrane protein 85
Bam :	β -barrel assembly machinery	PCR :	Polymerase chain reaction
BSA :	Bovine serum albumin	PDZ :	Post synaptic density 95, Disc large, Zo-1
CDS :	Coding sequence	PE :	Phosphatidyléthanolamine
CHAPS :	3-[(3-cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propanesulfonate	PMSF :	Phenylmethyl-sulphonyl fluoride
CL :	Cardiolipine	POTRA :	Polypeptide translocation associated
Da :	Dalton	PPiase :	Peptidyl-prolyl isomérase
DNA :	Desoxyribonucleotide	PT β :	Protéine en tonneau β
DO ₆₀₀ :	Densité optique à 600 nm	PVDF :	Polyvinylidène fluoride
EDTA :	Acide éthylène diamine tétraacétique	REMP :	Redox enzyme maturation protein
GFP :	Green fluorescent protein	RSO :	Right side out
GST :	Glutathion-S-Transférase	SDS :	Sodium dodecyl sulfate
GTP :	Guanosine triphosphate	SDS-PAGE :	Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide-gel electrophoresis
HRP :	Horse-radish peroxydase	SRP :	Signal recognition particle
IL :	Interconnecting loop	t-ARN :	ARN de transfert
IM :	Inner membrane	Tat :	Twin arginine translocation
IMP :	Protéine intégrale de membrane interne	TF :	Trigger factor
IPTG :	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside	TM :	Segment transmembranaire
LB :	Luria Bertani	TPR :	Tretratricopeptide repeats
LC-MS-MS :	Liquid chromatography coupled with two mass spectrometry	Tris :	Trishydroxyméthylaminométhane
LPS :	Lipopolysaccharide		
ME :	Membrane externe		
MI :	Membrane interne		
MGD :	Molybdoptérine guanine dinucléotide		
NAD ⁺ :	Nicotinamide adénine dinucléotide		
Ni-NTA :	Nickel-nitrilotriacetic acid		
OHB :	Oligo-(R)-3-hydroxybutyrate		

Liste des figures et tableaux

Chapitre I :	Verso de la page
Figure I.1 : Représentation de l'évolution de la membrane externe chez les bactéries.	11
Chapitre II	Verso de la page
Figure II.1 : Représentation schématique de l'enveloppe des protéobactéries.	12
Figure II.2 : Adressage au translocon Sec.	13
Figure II.3 : Structure cristalline de différents complexes SecYE(G/β) montrés en vue de côté ou de dessus (depuis le cytoplasme).	14
Figure II.4 : Structure cristalline du complexe SecYEG de <i>Thermotoga maritima</i> co-cristallisé avec SecA.	15
Figure II.5 : Insertion des protéines dans la membrane interne.	16
Figure II.6 : Organisation tripartite des séquences signal Tat et Sec.	18
Figure II.7 : Composants du système Tat d' <i>E. coli</i> .	19
Figure II.8 : Modèle de cycle de fonctionnement du système Tat.	21
Figure II.9 : Structure de la protéine en tonneau β LamB d' <i>E. coli</i> .	23
Figure II.10 : Représentation schématique de l'adressage des PTβ à la membrane externe.	23
Figure II.11 : Compétition entre repliement, agrégation et dégradation dans le périplasme.	24
Figure II.12 : Structure du chaperon périplasmique SurA d' <i>E. coli</i> .	25
Figure II.13 : Structure de Skp d' <i>E. coli</i> et modèle d'interaction avec son substrat.	26
Figure II.14 : Analyse structurale de la protéine DegP d' <i>E. coli</i> .	27
Figure II.15 : Représentation schématique de l'adressage des PTβ au complexe Bam chez <i>E. coli</i> .	28
Figure II.16 : Analyse structurale de la protéine BamA.	30
Figure II.17 : Analyse structurale de la protéine BamB d' <i>E. coli</i> .	32
Figure II.18 : Analyse structurale du complexe BamCDE.	33
Figure II.19 : Schéma présentant un modèle d'acheminement des PTβ à la membrane externe.	34
Figure II.20 : Exportation et maturation des lipoprotéines.	35
Figure II.21 : Modèle d'adressage des lipoprotéines à la membrane externe.	36
Figure II.22 : Analyse du signal de rétention des lipoprotéines dans la membrane interne d' <i>E. coli</i> .	38
Figure II.23 : Analyse structurale des protéines LolA et LolB.	40
Figure II.24 : Cycle du transfert d'une lipoprotéine depuis la membrane cytoplasmique vers LolA par le système LolCDE.	41
Figure II.25 : Structure de la lipoprotéine Wza d' <i>E. coli</i> .	43

Figure II.26 : Structure et adressage des secrétines du système de sécrétion de type II.	44
Figure II.27 : PnlH une protéine de surface ancrée dans la membrane externe par une séquence signal Tat.	45
Tableau II.1 : Composition et homologies de séquences du complexe Bam dans différentes espèces de protéobactéries.	29
Tableau II.2 : Comparaison des séquences carboxy terminales de plusieurs protéines en tonneau β d' <i>E. coli</i> et <i>N. meningitidis</i> .	31

Chapitre III :	Verso de la page
Figure III.1 : Surproduction et solubilisation de PnlH-6His chez <i>E. coli</i> NM522.	52
Figure III.2 : Copurification de PnlH-6His et de ses partenaires.	53
Figure III.3 : Copurification de PnlH-6His après production chez <i>D. dadantii</i> A350.	54
Figure III.4 : Copurification de partenaires de la séquence signal de PnlH.	55
Figure III.5 : Mise au point de la production de PnlH-6His dans des sphéroplastes d' <i>E. coli</i> .	56
Figure III.6 : Cinétique de relargage de PnlH-6His par des sphéroplastes d' <i>E. coli</i> .	57
Tableau III.1 : Souches, plasmides et oligonucléotides utilisés dans ce travail.	48

Chapitre IV (article) :	Page
FIG 1 : Défauts de biosynthèse des porines dans des mutants de <i>D. dadantii</i> pour les facteurs d'adressage des PT β à la ME.	65
FIG 2 : Rôle des chaperons périplasmiques SurA, Skp et DegP dans l'adressage de PnlH-6His à la ME de <i>D. dadantii</i> .	66
FIG 3 : Rôle de la séquence signal de PnlH dans l'interaction avec SurA.	67
FIG 4 : Analyse <i>in silico</i> de la séquence signal de PnlH.	68
FIG 5 : Etude de la séquence signal de PnlH par mutagenèse dirigée.	69
FIG 6 : Adressage de PnlH-6His à la ME dans les mutants <i>bamB</i> , <i>C</i> et <i>E</i> de <i>D. dadantii</i> .	70
FIG S1 : Localisation cellulaire de PnlH-6His dans la souche A350 de <i>D. dadantii</i> .	75
FIG S2 : PnlHP32LP35A est clivée à son extrémité carboxy terminale et est associée à la ME.	76
TABLE 1 : Souches et plasmides utilisés dans cette étude.	64
TABLE 2 : Inhibition de croissance des mutants de <i>D. dadantii</i> pour les facteurs d'adressage des PT β à la ME.	65
TABLE S1 : Oligonucléotides utilisés dans cette étude.	74

Chapitre V :	Verso de la page
Figure V.1 : Modèles d'adressage de PnlH à la membrane externe de <i>D. dadantii</i> en l'absence de Stt.	77
Figure V.2 : Modèles d'insertion de PnlH dans la ME en présence du Stt.	80

Résumé

Le système Tat (pour Twin Arginine Translocation) exporte des protéines repliées depuis le cytoplasme vers le périplasma des bactéries. L'adressage des protéines à exporter au système Tat repose sur une séquence signal spécifique amino terminale clivée après exportation. Chez le phytopathogène *Dickeya dadantii*, l'homologue de pectine lyase PnIH possède une séquence signal Tat qui assure son adressage au système Tat mais qui n'est pas clivée après exportation et ancre la protéine dans la membrane externe. Chez les protéobactéries, la majorité des protéines de membrane externe sont soit des lipoprotéines soit des protéines intégrales de membrane en tonneau β . L'adressage de ces protéines à la membrane externe repose sur des voies spécifiques du type de protéine : la voie Lol pour les lipoprotéines et la combinaison des chaperons périplasmiques SurA, Skp et DegP et du complexe de membrane externe Bam (β barrel assembly machinery) pour les protéines en tonneau β . Au cours de ce travail, l'étude de l'adressage de PnIH à la membrane externe a montré que SurA se liait à la séquence signal hydrophobe de PnIH pour la protéger de l'environnement hydrophile au cours de son transit dans le périplasma.

La séquence signal de PnIH (41 acides aminés) porte l'intégralité de l'information nécessaire à son adressage à la membrane externe. La nature de l'information adressant les protéines au système Tat est bien connue et dans ce travail nous nous sommes efforcés d'identifier les informations requises pour les deux dernières étapes de l'adressage de PnIH à la membrane externe : la traversée du périplasma et l'insertion dans la membrane externe. La délétion d'une région conservée comprise entre les résidus 28 et 41 de la séquence signal de PnIH affecte l'adressage de cette dernière à la membrane externe. Des substitutions des acides aminés conservés de cette région ne semblent pas affecter l'adressage de PnIH, indiquant que l'information nécessaire à l'adressage de PnIH à la membrane externe après exportation ne réside pas dans la séquence en acides aminés de la séquence signal de PnIH. En revanche, nos données suggèrent que la présence d'une hélice α hydrophobe dans la séquence signal de PnIH est importante pour son adressage à la membrane externe. Cette observation est particulièrement intéressante puisqu'une telle structure est généralement considérée comme une caractéristique des protéines de membrane interne.

Mots clefs : Protéines de membrane externe, séquence signal Tat, SurA, adressage.

Summary

The Twin Arginine Translocation (Tat) pathway exports folded proteins from the cytoplasm to the periplasm of bacteria. The targeting of the exported proteins to the Tat pathway relies on a specific amino-terminal signal sequence, which is cleaved after exportation. In the phytopathogen *Dickeya dadantii* the pectin lyase homologue PnlH is exported by the Tat pathway without cleavage of its signal sequence, which anchors PnlH into the outer membrane. In proteobacteria, the vast majority of outer membrane proteins consists of β -barrel proteins and lipoproteins. Targeting of these proteins to the outer membrane relies on two pathways: the periplasmic chaperones SurA, Skp and DegP work together with the β -Barrel-Assembly Machinery (Bam) to target and insert β -barrel proteins into the outer membrane while the Lol pathway targets and insert lipoproteins. In this work, we showed that SurA binds to the hydrophobic PnlH signal sequence during the course of its periplasmic transit.

The PnlH signal sequence (41 residues) carries all the information necessary to the targeting of PnlH to the outer membrane. The nature of the information that targets proteins to the Tat system is well characterized. Thus, we focused on the nature of the information carried by the PnlH signal sequence and that allows its crossing of the periplasm and its insertion in the outer membrane. The deletion of a conserved region of the PnlH signal sequence between residues 28 and 41 strongly affects the targeting of PnlH to the outer membrane. None of the single amino acid substitutions constructed in this region obviously affected the targeting of PnlH, indicating that the information may not reside in the amino acid sequence of the PnlH signal sequence. Consistently, our data suggest that the presence in the PnlH signal sequence of an α helix with a hydrophobic cluster is important for the targeting of PnlH to the outer membrane. This observation is striking since such a structure is considered as an inner membrane protein property.

Key words : Outer membrane proteins, Tat signal sequence, SurA, targeting.

Chapitre I Introduction générale

A la fin des années 1830, M. Schleiden et T. Schwann énonçaient le premier axiome de ce que l'on appelle aujourd'hui la théorie cellulaire : « tous les organismes sont faits de petites unités, les cellules ». Selon cette théorie, la cellule est l'unité structurale, fonctionnelle et reproductrice du vivant. L'existence de ces unités n'est permise que par l'existence d'une enveloppe qui individualise la cellule de son environnement. Cette enveloppe a une fonction complexe et essentielle pour la cellule. Elle permet notamment d'isoler du milieu extérieur le contenu cellulaire : informations génétiques, réactions métaboliques etc. Pourtant, l'enveloppe cellulaire est loin d'être un simple sac inerte et constitue une interface dynamique et sélective entre la cellule et le milieu extérieur. Ainsi, tout en permettant l'entrée et la sortie de molécules nécessaires au fonctionnement cellulaire, l'enveloppe reste suffisamment imperméable à toute une batterie de molécules potentiellement toxiques pour la cellule. Pour répondre à ces contraintes, les êtres vivants ont mis en place diverses stratégies et il en résulte une grande diversité en terme de structure de l'enveloppe cellulaire au sein du vivant. Les enveloppes bactériennes ont été particulièrement étudiées en raison de la facilité de manipulation de ces organismes et de l'impact qu'ils ont sur notre société. Un aperçu de la diversité des enveloppes cellulaires au sein du vivant peut ainsi facilement être obtenu au travers des efforts des scientifiques pour classer les enveloppes bactériennes en fonction de leur structure.

Les premiers pas dans l'étude de l'enveloppe bactérienne peuvent être attribués à Hans Christian Gram. A la fin du XIX^{ème} siècle, il met au point une coloration permettant de classer les bactéries selon leur réponse positive ou négative à la coloration. La coloration de Gram a longtemps été un élément fondamental de la classification bactérienne (Beveridge, 2001) et un amalgame entre réponse à cette coloration et structure de l'enveloppe a persisté. Ainsi, la structure de l'enveloppe des bactéries à Gram positif est souvent assimilée à celle de *Bacillus subtilis* (*Firmicutes*) dont l'enveloppe est constituée d'une unique membrane lipidique entourée d'un épais polymère, le peptidoglycane. De la même façon, la structure de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif est assimilée à celle d'*Escherichia coli* (*Proteobacteria*) dont l'enveloppe est constituée de deux membranes lipidiques délimitant un espace hydrophile dénommé périplasme. Depuis la fin du XX^{ème} siècle l'utilisation de techniques biochimiques, microscopiques et génomiques de plus en plus performantes a permis de mettre en évidence que la diversité des membranes bactériennes était bien plus importante que celle suggérée par la coloration de Gram. A titre d'exemple, les Mycobactéries du phylum des *Actinobacteria*, ont une réponse positive à la coloration de Gram et ont longtemps été considérées comme des bactéries à une seule membrane. Cependant, de récentes études ont permis de montrer que *Mycobacterium tuberculosis* pourrait disposer d'une seconde membrane dont la nature est très différente de celle que l'on retrouve chez *E. coli* (Niederweis *et al.*, 2010). Cet exemple, non isolé, illustre à quel point la diversité des enveloppes bactériennes a longtemps été sous estimée.

Ces dernières années, l'accumulation des données concernant la structure des enveloppes bactériennes a posé le problème de la classification de ces enveloppes en fonction de leur structure. En 2010, Sutcliffe propose des bases sémantiques à ce problème de classification (Sutcliffe, 2010). Selon lui, il est important de définir l'architecture des enveloppes bactériennes en fonction du nombre de membranes cellulaires. Il distingue alors deux grands types d'organisation : les bactéries monodermes à une seule membrane et les bactéries didermes à deux membranes. L'auteur insiste aussi sur la nécessité de différencier les bactéries didermes en fonction de la nature de leur membrane la plus externe. Dans ce contexte, la composition en lipide de cette membrane est un critère particulièrement important. Dès lors, Sutcliffe regroupe sous l'appellation de bactéries didermes à lipopolysaccharide (LPS) toutes les bactéries à deux membranes dont la plus externe contient des LPS. Les bactéries à deux membranes caractérisées par la présence de composés atypiques (acides mycoliques des *Mycobacteria*, glycosphingolipides des *Sphingomonas*, toga des *Thermotogae*) et/ou l'absence de LPS dans la membrane externe sont simplement définies comme didermes. Cependant, malgré les récentes avancées techniques, l'absence de données suffisantes rend parfois difficile la classification de certaines bactéries en tant que monoderme ou diderme. C'est notamment le cas pour de nombreuses espèces du phylum des *Chloroflexi*.

A cette diversité des enveloppes bactériennes s'ajoute une répartition phylogénétique complexe. En effet, si seuls les phyla des *Firmicutes* et des *Actinobacteria* contiennent des bactéries monodermes, les bactéries didermes sont retrouvées dans la quasi totalité des phyla. Il est ainsi intéressant de noter que le phylum principalement monodermique des *Actinobacteria* contient un certain nombre de bactéries didermes comme les Mycobactéries. De façon encore plus surprenante, les bactéries didermes à LPS ont été retrouvées dans 17 des 24 phyla pour lesquels les données nécessaires à la détermination de la structure de l'enveloppe sont disponibles (Sutcliffe, 2010). Il est donc difficile d'établir un lien direct entre structure de l'enveloppe et appartenance à un phylum. Cependant, il est possible d'observer une certaine homogénéité dans la structure de l'enveloppe des espèces de certains phyla. A titre d'exemples, le phylum des Deinococcales–*Thermus* contient uniquement des bactéries didermes sans LPS et le phylum des *Proteobacteria* est presque uniquement constitué de bactéries didermes à LPS.

La large représentation au sein des différents phyla des bactéries didermes soulève la question de l'origine de cette seconde membrane et de son rôle évolutif. Plusieurs théories sur l'origine d'une seconde membrane ont été avancées. En 2009, dans des travaux controversés Lake suggère que l'apparition de la membrane externe des bactéries didermes serait liée à une endosymbiose entre une *Actinobacteria* et une *Clostridia* (Lake, 2009). En 2011, un groupe américain travaillant sur la bactérie *Acetonema longum* (*Clostridia*) remarque que cette bactérie monoderme a la capacité de produire des spores didermes par intégration de la membrane de la cellule mère à l'enveloppe de la spore (Tocheva *et al.*, 2011). Si ces travaux offrent une explication mécanique à l'apparition d'une seconde membrane chez un monoderme, ils n'expliquent pas pourquoi une telle organisation a été si largement sélectionnée au cours de l'évolution. Une

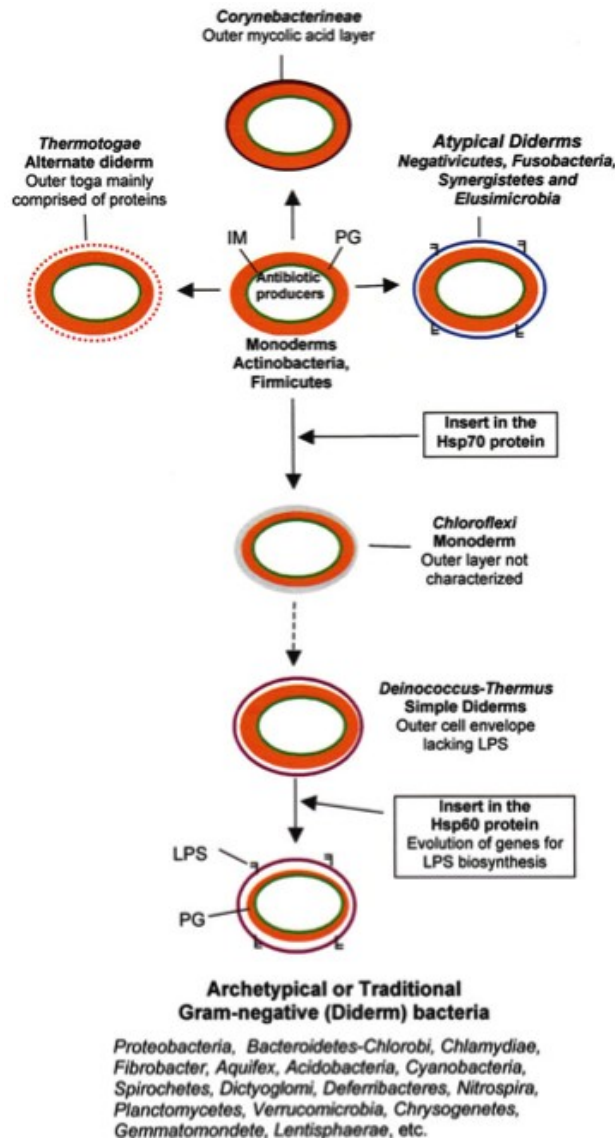


Figure I.1 : Représentation de l'évolution de la membrane externe chez les bactéries.

La nature de la membrane externe de chaque groupe est indiquée sous le groupe correspondant. Les bactéries « didermes traditionnelles » possèdent une membrane externe asymétrique avec un feuillet interne de phospholipides et un feuillet externe de LPS. La phylogénie des différents groupes de bactéries didermes est basée sur la présence d'insert dans les gènes codant les protéines Hsp60 et Hsp70. Les *Chloroflexi*, *Deinococcus-Thermus* et autres bactéries « didermes traditionnelles » possèdent un insert dans le gène codant Hsp70. Les bactéries « didermes traditionnelles » possèdent un insert dans le gène codant Hsp60. PG et IM signifient respectivement peptidoglycane et membrane interne. D'après Gupta (2011).

première réponse à cette question a été apportée par une étude de Radhey Gupta datant de 2011 (Gupta, 2011). Partant du constat que la majorité des producteurs d'antibiotiques sont des monoderms, l'auteur propose que l'acquisition d'une seconde membrane pourrait constituer une défense supplémentaire contre les antibiotiques. Une étude phylogénétique basée sur la présence d'insertions dans les gènes codant pour les protéines Hsp60 et Hsp70 a permis à l'auteur de tracer l'histoire évolutive de nombreuses bactéries didermes à LPS à partir de bactéries monoderms (Figure I.1). De façon intéressante, ces travaux montrent que l'acquisition d'une seconde membrane est une stratégie efficace qui est apparue plusieurs fois et de façon indépendante au cours de l'évolution.

Si l'acquisition d'une seconde membrane chez les bactéries semble conférer un avantage évolutif indéniable (Gupta, 2011), elle pose aussi de nombreux problèmes en terme d'échanges avec le milieu extérieur. En effet, la présence d'une seconde membrane constitue une barrière supplémentaire pour l'internalisation et la sécrétion des molécules nécessaires au fonctionnement cellulaire. Pour palier à ce problème, les bactéries didermes ont mis en place dans la membrane externe de nombreuses structures protéiques qui assurent les interactions avec le milieu extérieur. C'est notamment le cas des porines, protéines assurant la diffusion de nombreuses molécules au travers de la membrane externe, ou des systèmes de sécrétion assurant la sortie de molécules dans le milieu extérieur (Nikaido, 2003). Les composants de la membrane externe, qu'ils soient protéiques ou lipidiques, sont synthétisés dans le cytoplasme et doivent donc franchir la membrane interne et le périplasme avant d'être insérés dans la membrane externe. De part la nature hydrophobe de ces composés ce processus d'acheminement au travers d'un espace hydrophile comme le périplasme est thermodynamiquement défavorable. Ce processus est donc impossible de façon spontanée et l'absence de source d'énergie dans le périplasme constitue un problème supplémentaire. Il se pose également la question du signal permettant d'adresser de façon spécifique une molécule au bon compartiment : cytoplasme, membrane interne, périplasme ou membrane externe. Pour résoudre ces problèmes les bactéries ont mis en place de nombreux systèmes assurant l'adressage spécifique des composants de la membrane externe à cette dernière (Ricci et Silhavy, 2012).

L'étude des systèmes permettant la biosynthèse de la membrane externe pourrait fournir des informations utiles concernant la mise en place de cette dernière au cours de l'évolution. De plus, la compréhension des mécanismes sous jacents à cette biosynthèse pourrait fournir de nouvelles cibles pour les antibiotiques. Les protéobactéries sont souvent considérées comme des bactéries didermes à LPS archétypiques et constituent un modèle d'étude très utilisé pour la biogénèse de la membrane externe. Dans ce contexte, cette thèse se propose de faire la synthèse des connaissances actuelles sur l'adressage des protéines à la membrane externe des protéobactéries ainsi que d'étudier l'adressage d'une protéine atypique de membrane externe chez la protéobactérie phytopathogène *Dickeya dadantii*.

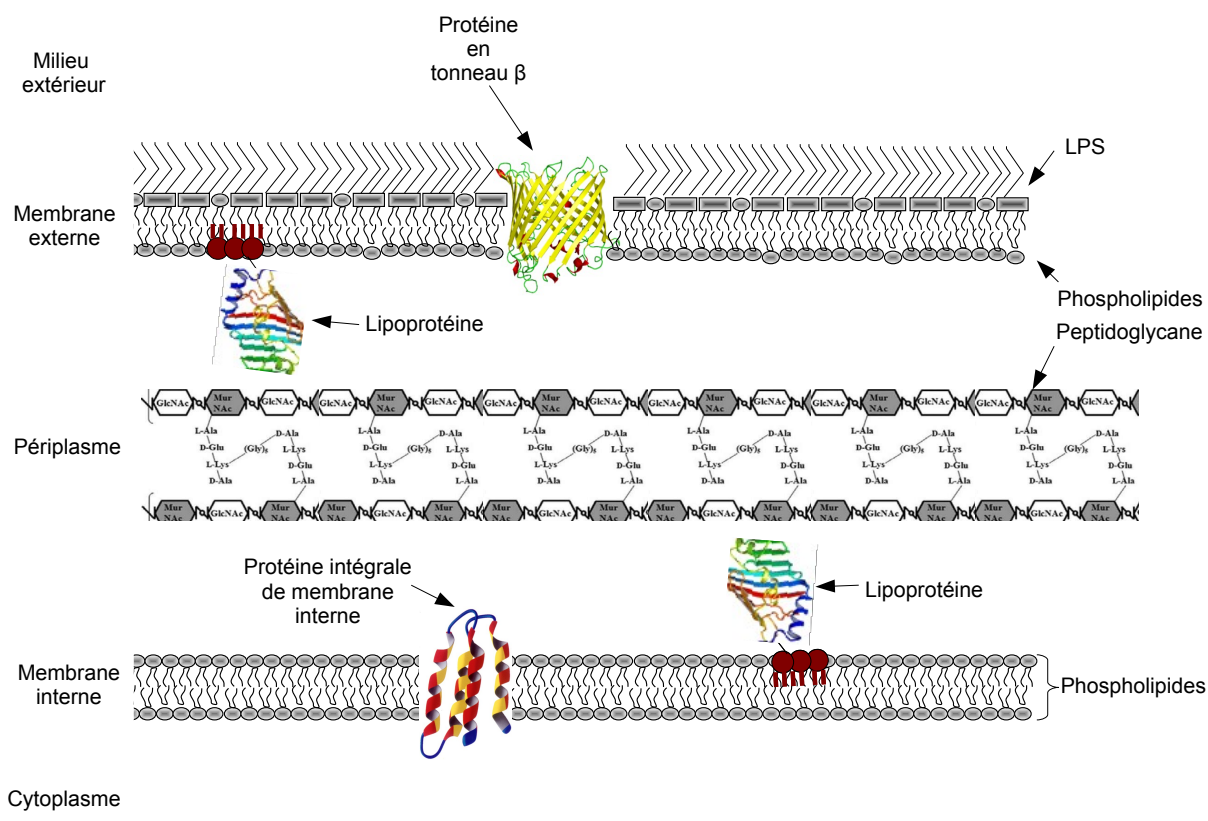


Figure II.1 : Représentation schématique de l'enveloppe des protéobactéries.

Chapitre II Biosynthèse des protéines de la membrane externe chez les protéobactéries

I Introduction

L'enveloppe des protéobactéries est caractérisée par la présence de deux membranes délimitant un compartiment intermembranaire appelé le périplasme (Figure II.1). La majorité de ce compartiment est occupée par un polymère de glycosaminopeptides dénommé peptidoglycane dont le rôle est notamment de donner leur forme aux cellules et de protéger la bactérie contre les stress osmotiques (Typas *et al.*, 2011). Le périplasme représente également un compartiment cellulaire métaboliquement actif et est le lieu de transit de nombreuses molécules entre la membrane interne (MI) et la membrane externe (ME). Ces deux membranes se distinguent fortement de part leur composition. En effet, si la MI est composée d'une bicouche de phospholipides, la ME est constituée de façon asymétrique avec un feuillet interne composé de phospholipides et un feuillet externe composé de LPS. Ce dernier est constitué d'un lipide A, jouant un rôle d'ancre membranaire, substitué par un cœur oligosaccharidique parfois lui-même associé à un oligosaccharide répété : l'antigène O (Silhavy *et al.*, 2010). MI et ME sont pourvues de nombreuses protéines et si elles disposent toutes deux de lipoprotéines, ancrées dans la membrane via une extrémité amino terminale acylée (Okuda et Tokuda, 2011), elles diffèrent par la nature de leurs protéines intégrales. En effet, les protéines intégrales de MI traversent la bicouche phospholipidique grâce à des structures secondaires en hélice α (Dalbey *et al.*, 2011) alors que les protéines intégrales de ME forment des structures en tonneau β (Fairman *et al.*, 2011) et sont ainsi dénommées protéines en tonneau β (PT β).

La mise en place des protéines dans la membrane externe implique des mécanismes complexes puisque ces protéines hydrophobes doivent d'abord traverser la membrane interne et le périplasme avant d'être insérées dans la ME. La première étape de la mise en place des protéines de ME correspond à l'exportation : un transport actif de la protéine néo synthétisée depuis le cytoplasme vers le périplasme (Desvaux *et al.*, 2009). Ce processus est assuré par les systèmes Sec, pour les protéines non repliées, et Tat pour les protéines repliées. L'adressage d'une protéine à un système d'exportation est dépendant d'une séquence signal spécifique, située à l'extrémité amino terminale des protéines exportées et clivée après exportation. La façon dont ces protéines sont ensuite insérées dans la membrane externe est longtemps restée une énigme. Ces dernières années, deux systèmes permettant l'acheminement et l'insertion des protéines à la membrane externe ont été identifiés. Il s'agit des systèmes d'adressage Bam et Lol qui sont spécifiques respectivement des PT β et des lipoprotéines. Ce chapitre bibliographique se propose de faire un état des lieux des connaissances concernant ces systèmes permettant l'adressage et l'insertion des protéines dans la ME des protéobactéries. La majorité des données disponibles ont été obtenues chez la γ -protéobactérie *E. coli* et ce travail décrit principalement les avancées

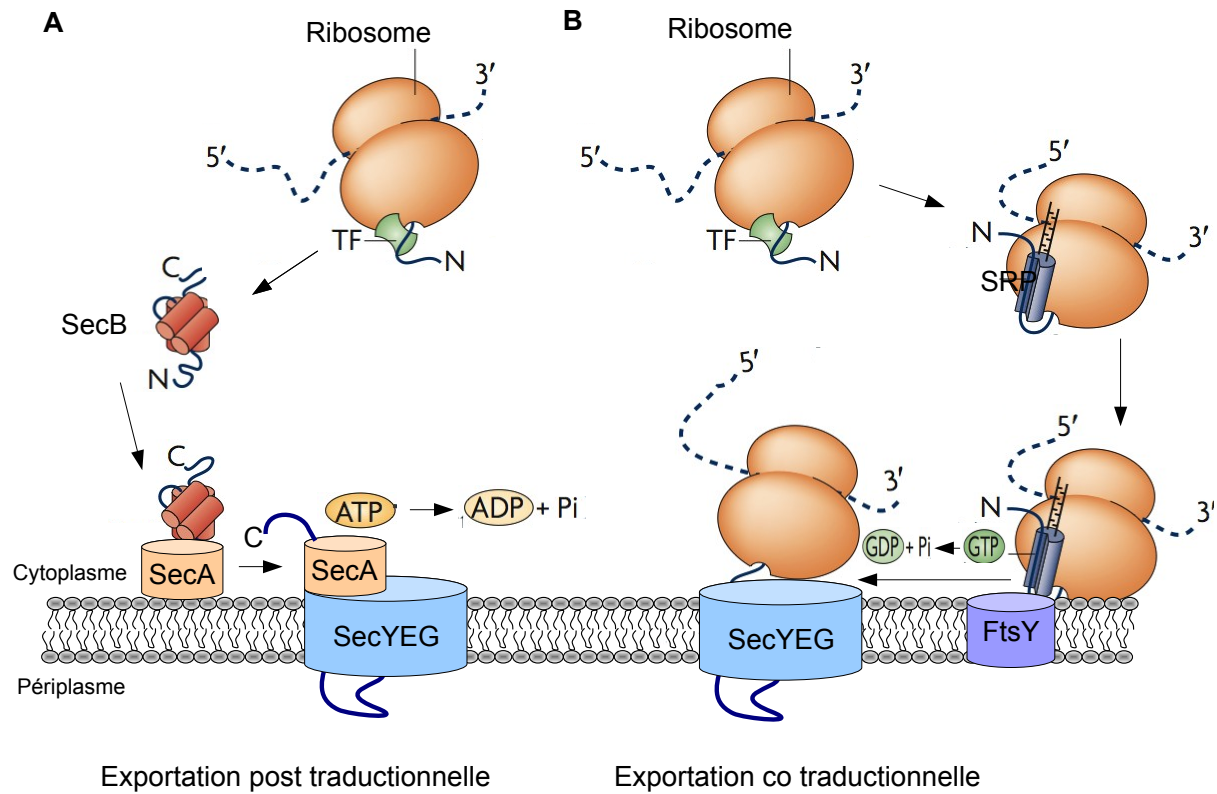


Figure II.2 : Adressage au translocon Sec.

(A) Exportation post traductionnelle. La protéine à exporter est prise en charge par un homotétramère de SecB. SecB interagit avec l'ATPase SecA et lui transfère la protéine à exporter. Après interaction de SecA avec le translocon Sec, l'hydrolyse d'ATP par SecA fournit l'énergie pour l'exportation. (B) Exportation co traductionnelle. Le SRP se fixe sur la séquence signal de la protéine à exporter et sur le ribosome. La traduction s'arrête. Le complexe SRP ribosome est recruté par FtsY et le ribosome est transféré au translocon Sec. La traduction reprend fournissant l'énergie à l'exportation. L'hydrolyse de GTP par SRP et FtsY assure la dissociation de ces deux particules. Adapté de Cross *et al.* (2009).

concernant la biosynthèse de la ME de cet organisme. Dans ce contexte, il est important de noter que ce qui est décrit chez cette bactérie n'est pas forcément vrai chez d'autres organismes.

II Exportation des protéines

II.A Le système SEC

II.A.1 Introduction

Les protéines périplasmiques et de ME sont synthétisées dans le cytoplasme et doivent donc être exportées dans le périplasme pour atteindre leur destination finale. La majorité de ces protéines traverse la MI sous forme non repliée en empruntant le système Sec. Ce système est le système d'export principal chez les bactéries et un système équivalent est présent chez les archées et les eucaryotes (Cao et Saier, 2003). Chez les bactéries, le système Sec comprend deux complexes de MI SecYEG et SecDFYajC qui forment le translocon au travers duquel la protéine à exporter traverse la MI. L'adressage de la protéine à exporter au translocon Sec repose soit sur le couple de protéines cytoplasmiques SecA et SecB ou sur SRP (Signal Recognition Particle) et son récepteur membranaire FtsY (Cross *et al.*, 2009). Cet adressage repose sur plusieurs signaux présents dans la protéine à exporter et notamment sur l'existence d'un court peptide amino terminal dénommé séquence signal. Les caractéristiques de cette séquence signal et le mode de fonctionnement du système Sec sont présentés ci-dessous.

II.A.2 La séquence signal Sec et adressage au translocon Sec

Les protéines exportées par le système Sec sont synthétisées sous la forme d'un précurseur doté d'une séquence signal amino terminale qui sera clivée après exportation pour donner la forme mature de la protéine. La séquence signal Sec ne porte pas de motif conservé mais possède une organisation tripartite conservée au cours de l'évolution (Cao et Saier, 2003) :

- un domaine amino terminal basique (Domaine N).
- un domaine central hydrophobe (Domaine H).
- un domaine carboxy terminal polaire portant un site de clivage A-X-A pour la signal peptidase LepB (Luke *et al.*, 2009) ou $L_{-3}(A/S/T)_{-2}(G/A)_{-1}C_{+1}$ pour la signal peptidase LspA (Pugsley, 1993).

La séquence signal Sec étant en position amino terminale, elle est la première à sortir du ribosome et est directement prise en charge par le TF (Trigger Factor). Par la suite, la séquence signal Sec permet l'adressage au translocon Sec de manière post-traductionnelle ou co-traductionnelle (Figure II.2) (Cross *et al.*, 2009).

L'exportation co-traductionnelle implique initialement le SRP qui est doté d'une activité GTPase et est constitué de la protéine Ffh et de l'ARN 4,5S (Pool *et al.*, 2005). Le SRP reconnaît les séquences signal Sec dotées d'un domaine H très hydrophobe et déplace le TF pour se lier à

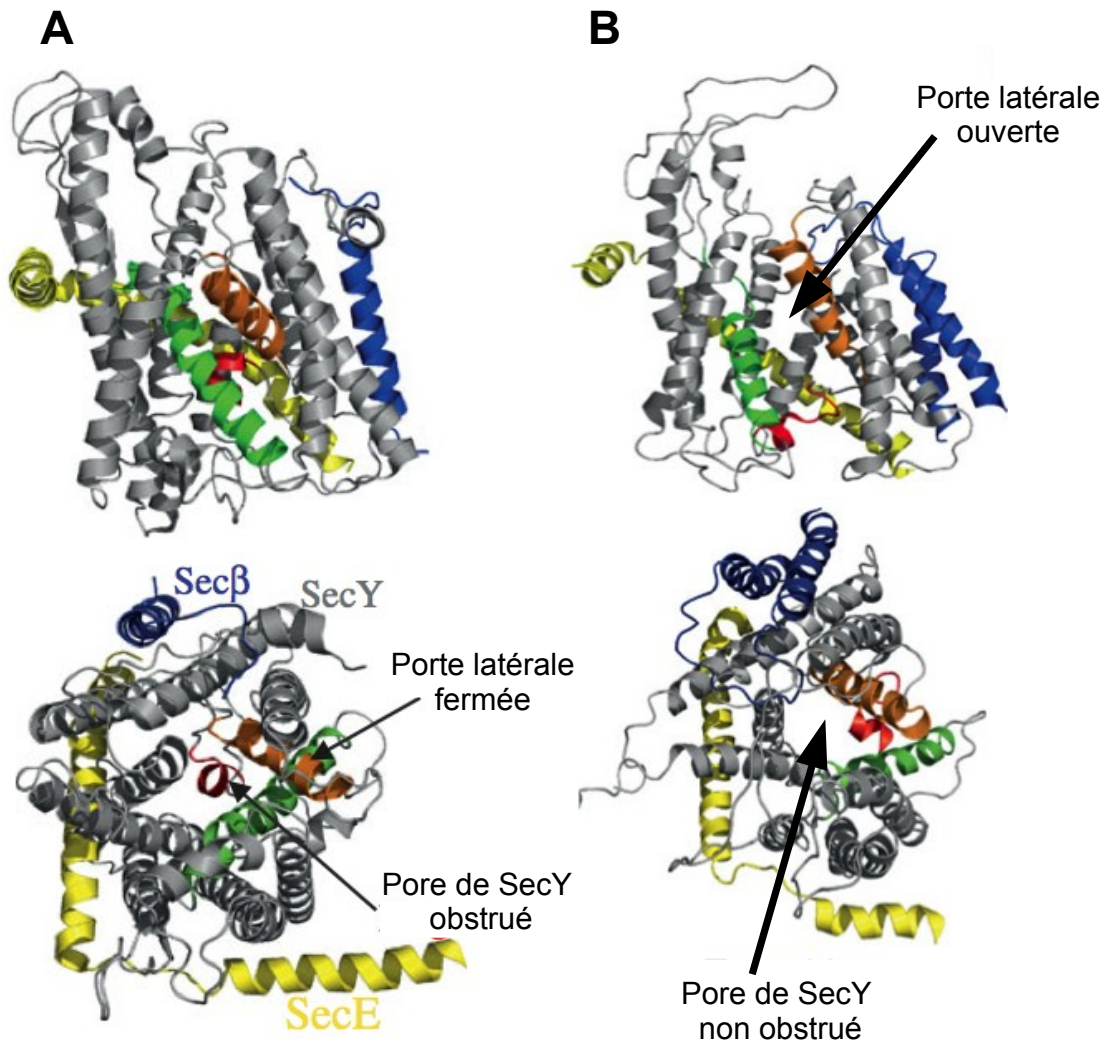


Figure II.3 : Structure cristalline de différents complexes SecYE(G/β) montrés en vue de coté ou de dessus (depuis le cytoplasme).

SecY est en gris. Les deux hélices α de SecY formant la porte latérale sont indiquées en orange (TM2) et en vert (TM7). L'hélice α obstruant le pore de SecY est indiquée en rouge. SecE est en jaune et SecG/β est en bleu. (A) SecYE(G/β de de *Methanococcus jannaschii*. (B) SecYEG de *Thermotoga maritima* co-cristallisé avec SecA (non montrée). D'après Lycklama a Nijeholt et Driessen (2012).

ces dernières ce qui arrête la traduction (Lee et Bernstein, 2001). Le complexe SRP-ribosome est ensuite recruté par la GTPase de MI FtsY. L'interaction entre SRP et FtsY permet le transfert de la séquence signal de la protéine à exporter et du ribosome au translocon Sec (Görlich et Rapoport, 1993 ; Halic *et al.*, 2006). L'hydrolyse de GTP par SRP et FtsY assure ensuite la dissociation de ces deux particules qui sont prêtes pour un nouveau cycle (Connolly *et al.*, 1991). Une fois le ribosome dissocié de SRP, la traduction reprend et fournit l'énergie nécessaire au translocon Sec pour assurer l'exportation de la protéine en cours de synthèse. Les séquences signal Sec dotées d'un domaine H peu hydrophobe n'interagissent pas avec SRP et adressent la protéine au translocon Sec de façon post-traductionnelle. Dans ce cas, le chaperon homotétramérique SecB se lie à la forme mature de la protéine à exporter avec assez peu de spécificité et la maintient dans un état non replié compatible avec l'exportation (Randall *et al.*, 1997 ; Lecker *et al.*, 1989). SecB interagit ensuite avec l'extrémité carboxy terminale de l'ATPase SecA et lui transfère la protéine à exporter. SecA assure la spécificité de l'adressage en se liant notamment à la séquence signal de la protéine à exporter (Hartl *et al.*, 1990 ; Gelis *et al.*, 2007 ; Grady *et al.*, 2012). En interagissant avec le translocon Sec, le complexe SecA-protéine à exporter se charge d'une molécule d'ATP ce qui entraîne un changement de conformation important de SecA (Natale *et al.*, 2004). Ce changement de conformation permet le transfert de la séquence signal de la protéine à exporter au translocon Sec (Zimmer *et al.*, 2008). Enfin, des cycles d'hydrolyse d'ATP par SecA permettent de pousser la protéine au travers du translocon Sec (Erlandson *et al.*, 2008).

II.A.3 Les composants du système Sec : SecA et les complexes SecYEG et SecDFYajC

Le complexe hétérotrimérique SecYEG constitue l'unité principale du système Sec à la fois pour l'exportation co-traductionnelle et l'exportation post-traductionnelle. En association avec SecA il suffit à assurer *in vitro* la translocation de protéines (Brundage *et al.*, 1990). Ce complexe hétérotrimérique est constitué des protéines SecY (10 segments transmembranaires (TM)), SecE (3 TMs) et SecG (2 TMs) et est fonctionnel sous la forme de dimère. L'obtention de la structure cristalline du complexe SecYE β (Sec β est un homologue de SecG) de *Methanococcus jannaschii* (Figure II.3 A) a permis de montrer que les 10 TMs de SecY forment un pore au travers duquel s'effectue l'exportation des protéines (Van Den Berg *et al.*, 2004). Ce pore est obstrué par une constriction centrale constituée de six résidus hydrophobes et par une hélice α qui, ensemble, bloquent la diffusion potentiellement létale de molécules solubles entre le cytoplasme et le périplasme (Gumbart et Schulten, 2008). De plus, les TMs 7 et 2 de SecY forment une porte latérale ouverte sur la partie hydrophobe de la membrane. La cristallisation du complexe SecYEG de *Thermotoga maritima* complexé avec SecA montre que cette porte latérale peut s'ouvrir et que l'hélice α qui bloque le pore dans la structure de SecYEG de *Methanococcus jannaschii* est déplacée vers le périplasme (Figure II.3 B)(Zimmer *et al.*, 2008). Ces observations laissent à penser que, durant l'exportation, le pore de SecY s'ouvre pour assurer le passage de la protéine à

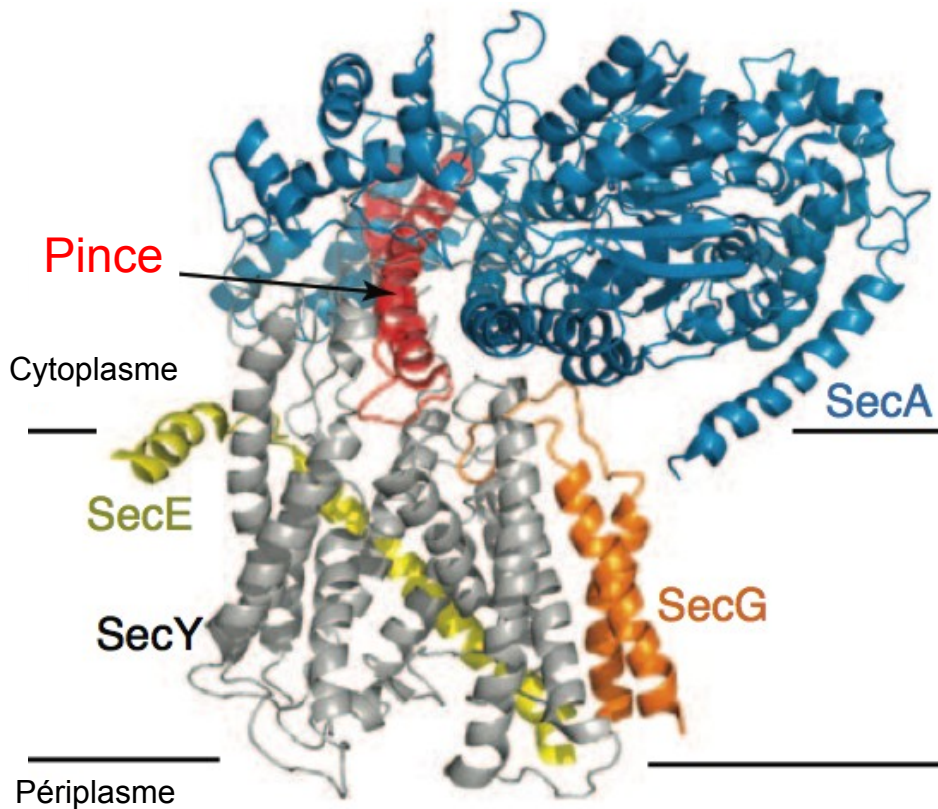


Figure II.4 : Structure cristalline du complexe SecYEG de *Thermotoga maritima* co-cristallisé avec SecA.

Vue de coté. Un unique complexe SecYEG (SecY en gris, SecE en jaune, SecG en orange) est représenté associé à une unique protéine SecA (en bleu). Les deux hélices α de SecA formant une pince s'insérant dans le pore de SecY sont représentées en rouge. D'après Zimmer *et al.* (2008).

exporter vers le périplasma. En accord avec cette idée, l'ouverture de la porte latérale de SecY semble indispensable à l'exportation (du Plessis *et al.*, 2009) probablement en permettant d'élargir le pore au niveau de sa constriction centrale. De plus, il a été suggéré qu'en s'ouvrant, la porte latérale pourrait accueillir la séquence signal de la protéine à exporter (Plath *et al.*, 1998). La protéine SecE est insérée dans la membrane par 3 TMs et possède deux hélices α en forme de V dont l'interaction avec SecY est indispensable à la stabilité du complexe (Figure II.4) (Pohlschröder *et al.*, 1996). Le rôle exact de la protéine SecG reste inconnu et, si elle n'est pas essentielle à la translocation *in vitro* (Brundage *et al.*, 1990), elle augmente l'efficacité de l'exportation *in vivo* (Nishiyama *et al.*, 1994).

Les protéines SecD et SecF forment avec la protéine YajC un complexe hétérotrimérique. Ce complexe, localisé dans la MI, interagit avec le complexe SecYEG au cours de l'exportation (Duong et Wickner, 1997). Les protéines SecD et SecF ne sont pas indispensables à la translocation *in vitro* (Matsuyama *et al.*, 1992) mais leur délétion conduit à une diminution de l'efficacité d'exportation *in vivo* (Pogliano et Beckwith, 1994). Le complexe SecDFYajC semble être impliqué à la fois dans la coordination des composants du translocon Sec (Duong et Wickner, 1997) et dans le relargage des protéines exportées (Matsuyama *et al.*, 1993). Une étude récente a montré que ce processus de relargage est dépendant de la force proton motrice et repose sur un long domaine périplasmique de SecD qui, en interagissant avec la protéine à exporter, permet de tirer cette dernière vers le périplasma (Tzukazaki *et al.*, 2011).

La protéine SecA est un élément central de l'exportation post-traductionnelle. En effet, elle reçoit la protéine à exporter de SecB et est responsable du transfert de celle-ci au complexe SecYEG. De plus, elle semble fournir une partie de l'énergie nécessaire au processus d'exportation grâce à son activité ATPase (Zimmer *et al.*, 2006 ; Gelis *et al.*, 2007 ; Erlandson *et al.*, 2008). SecA existe à la fois sous une forme libre dans le cytoplasme et sous une forme associée à la MI. Les différentes études structurales ne s'accordent pas sur l'état monomérique ou dimérique de SecA et donnent une orientation différente des protomères lorsque SecA est dimérique (Papanikolaou *et al.*, 2007 ; Sharma *et al.*, 2003 ; Vassilyev *et al.*, 2006 ; Vrontou et Economou, 2004 ; Weaver *et al.*, 1992 ; Zimmer *et al.*, 2006 ; Ding *et al.*, 2003). Cependant, la forme dimérique de SecA semble être la forme prédominante et fonctionnelle dans la bactérie. En effet, il a été montré que SecA permettait la translocation de protéines *in vitro* uniquement en interagissant sous forme dimérique avec SecYEG (Kusters *et al.*, 2011). De plus, deux protomères de SecA liés de façon covalente restent fonctionnels pour l'exportation (de Keyzer *et al.*, 2005). La récente co-cristallisation de SecA et du complexe SecYEG montre que deux hélices α de SecA forment une sorte de pince qui s'insère dans le pore de SecY (Figure II.4) (Zimmer *et al.*, 2008). Il a été proposé que l'hydrolyse de l'ATP par SecA provoque un mouvement de cette pince qui pousse la protéine à exporter au travers du pore de SecY (Erlandson *et al.*, 2008).

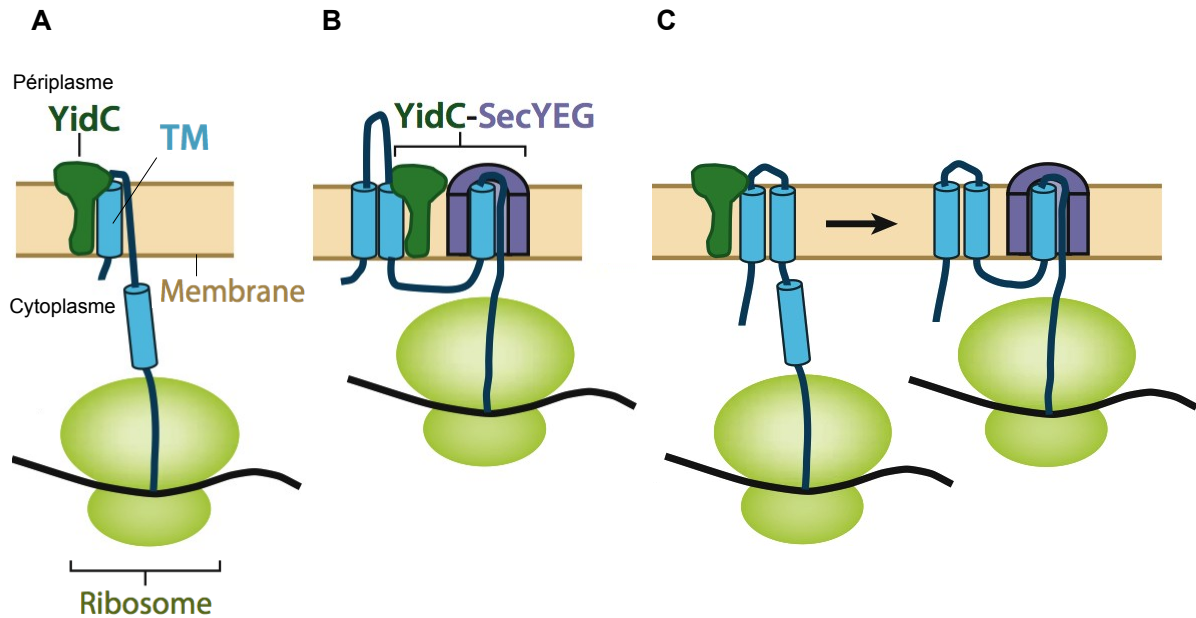


Figure II.5 : Insertion des protéines dans la membrane interne.

(A) YidC assure seule l'insertion des segments transmembranaires (TMs) de certaines protéines dans la membrane interne. (B) YidC s'associe au complexe SecYEG pour assurer l'insertion dans la MI des TMs de certaines protéines. Le translocon Sec assure le transfert des TMs depuis le cytoplasme vers YidC. YidC assure ensuite l'assemblage des TMs et leur diffusion dans la membrane interne. (C) YidC assure l'insertion des TMs de la partie amino terminale de CyoA dans la membrane interne. Dans un second temps SecYEG assure l'insertion de la partie carboxy terminale de CyoA. D'après Dalbey *et al.* (2011).

II.A.4 Insertion des protéines dans la membrane interne

Les protéines de MI représentent approximativement 20% du protéome de *E. coli* et jouent de nombreuses fonctions clefs dans le métabolisme bactérien (Daley *et al.*, 2005). De ce fait, leur insertion dans la MI est un défi important pour les bactéries. La majorité des protéines de MI sont des protéines intégrales de membrane (IMP) et sont insérées dans la membrane par une ou plusieurs hélices α hydrophobes ou segments transmembranaires (TMs). La protéine YidC joue un rôle particulièrement important dans l'insertion de ces TMs dans la MI. En effet, elle possède une fonction d'insertase qui lui permet d'assurer seule l'insertion dans la MI de plusieurs petites protéines comme la sous unité c de l'ATP synthase F1F0 et les protéines de capsid des phages M13 et Pf3 (Figure II.5 A) (Samuelson *et al.*, 2000 ; Kol *et al.*, 2006). De plus, YidC a été décrite comme agissant de concert avec le translocon Sec pour assurer l'insertion de différentes IMPs (Samuelson *et al.*, 2000 ; duPlessis *et al.*, 2006 ; Wagner *et al.*, 2008). Dans ce contexte, YidC interagit avec le complexe SecDFYajC qui la maintient à proximité du complexe SecYEG pour former le complexe fonctionnel à l'insertion des IMPs (Nouwen et Driessen, 2002). Le rôle exact de YidC lorsqu'elle agit avec SecYEG varie selon le substrat. Des expériences de cross link suggèrent que YidC pourrait jouer le rôle d'une intégrase permettant la diffusion dans la bicouche phospholipidique des TMs que lui délivre SecYEG au niveau de la porte latérale de SecY (Figure II.5 B) (Houben *et al.*, 2004 ; van Den Berg *et al.*, 2004). De plus, l'étude de l'insertion dans la MI de LacY a montré que YidC n'est pas nécessaire à l'insertion des TMs de LacY qui sont insérés par SecYEG. En revanche, YidC est indispensable au repliement correct de la protéine dans la MI (Nagamori *et al.*, 2004), indiquant que YidC pourrait également être dotée d'une fonction de foldase assurant l'assemblage des TMs dans la MI (Nagamori *et al.*, 2004 ; Dalbey *et al.*, 2011). Enfin, YidC a été décrite comme permettant l'insertion de l'extrémité amino terminale de CyoA dans la MI alors que le système Sec assure l'insertion de l'extrémité carboxy terminale (Figure II.5 C) (Celebi *et al.*, 2006 ; van Bloois *et al.*, 2006).

Les IMPs sont synthétisées sans séquence signal et le signal qui les adresse à la MI correspond aux régions fortement hydrophobes que constituent leurs hélices α transmembranaires. SRP reconnaît ces régions particulièrement hydrophobes et assure un adressage co-translationnel au translocon Sec. De façon intéressante, SRP permet l'adressage de la sous unité c de l'ATP synthase F1F0 à YidC, indiquant que SRP pourrait également assurer l'adressage à la MI des IMPs indépendantes du translocon Sec pour leur insertion dans la MI (van Bloois *et al.*, 2004).

II.B Le système Tat

II.B.1 Introduction

L'existence d'un système d'exportation des protéines indépendant du système Sec a d'abord été proposée par Berks en 1996 (Berks, 1996). L'auteur avait remarqué que de nombreuses enzymes à cofacteur disposaient d'une séquence signal contenant un motif conservé SRRXFLK et a proposé que ce type d'enzymes pourrait être exporté par un autre système que le système Sec. Le système Tat (Twin Arginine Translocation) a ensuite été expérimentalement identifié chez *E. coli* et dans les thylakoïdes du maïs comme un système alternatif permettant l'exportation de protéines à motif SRRXFLK de façon indépendante au système Sec (Settles *et al.*, 1997 ; Santini *et al.*, 1998 ; Weiner *et al.*, 1998). L'existence d'un second système d'exportation peut paraître redondante mais celle-ci s'explique par la spécificité de ses substrats. En effet, le système Tat assure l'exportation de protéines repliées dans le cytoplasme autrement impossible par le système Sec.

Le système Tat est conservé chez les bactéries, les archées, les thylakoïdes de plantes, les chloroplastes des algues et a été retrouvé dans les mitochondries de certaines éponges. Il joue un rôle dans divers processus métaboliques comme la respiration ou la division cellulaire et est fortement impliqué dans la virulence de nombreuses espèces bactériennes. L'ubiquité et l'importance de ce système dans les processus cellulaires en ont fait un sujet très étudié ces 15 dernières années et nous donnerons ici un aperçu de ces recherches.

II.B.2 Pourquoi un système Tat ?

L'existence du système Tat assurant spécifiquement l'exportation de protéines repliées soulève la question suivante : « Pourquoi certaines protéines périplasmiques doivent elles être repliées dans le cytoplasme ? ». Chez les protéobactéries trois principales raisons ont été identifiées.

(1) La protéine se replie autour de cofacteurs qui ne peuvent être insérés que dans le cytoplasme. De façon générale, un cofacteur est dit associé au système Tat lorsqu'il est présent à la fois dans les protéines cytoplasmiques et dans les protéines périplasmiques. A contrario, les cofacteurs associés au système Sec ne sont présents que dans les protéines périplasmiques ; c'est notamment le cas des hèmes (Palmer et Berks, 2012). Il est possible de distinguer deux grandes familles de cofacteurs associées au système Tat : les clusters métaux-soufre et les cofacteurs dérivés de nucléotides (NAD⁺, Cobalamine, etc.) (Berks *et al.*, 2003).

(2) La protéine se replie autour d'ions métalliques dont la concentration périplasmique est faible. En cas de repliement dans le périplasma, la protéine pourrait intégrer par compétition un ion métallique non spécifique présent en plus forte concentration (Palmer et Berks, 2012).

(3) La protéine doit être exportée sous la forme d'hétéromultimère. Durant ce processus dénommé « hitchhiking », un complexe de deux protéines repliées est exporté par le système Tat. Seule l'une des deux protéines dispose d'une séquence signal Tat et l'exportation ne peut avoir

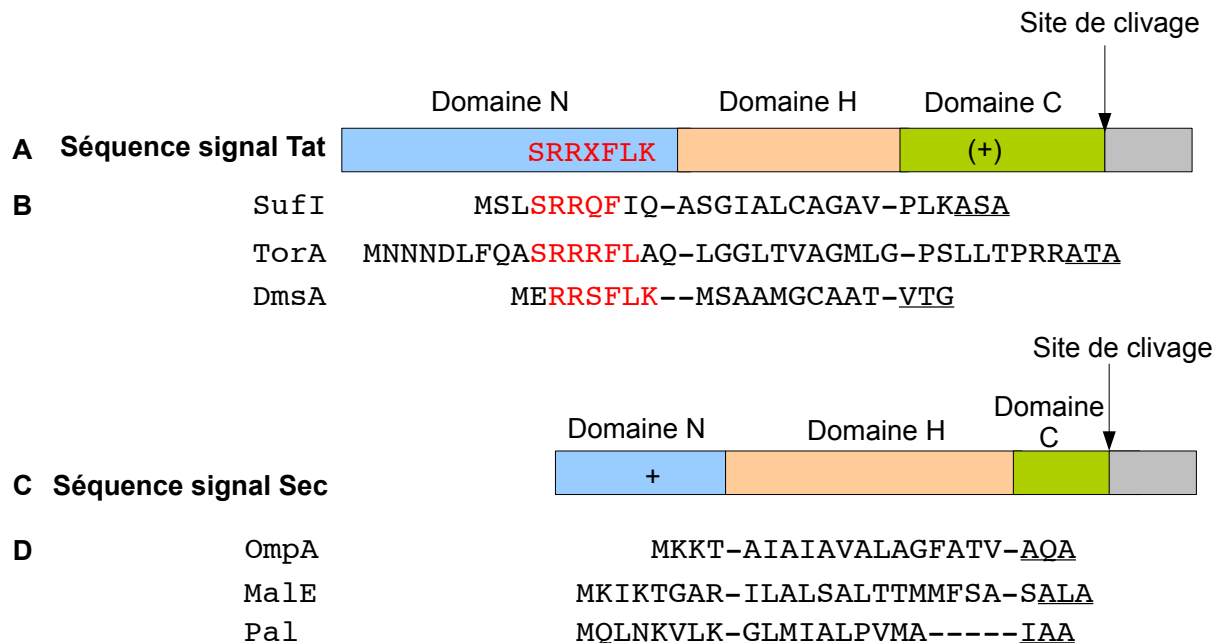


Figure II.6 : Organisation tripartite des séquences signal Tat et Sec.

(A) Représentation schématique d'une séquence signal Tat. Le consensus Tat est indiqué en rouge. Les domaines N, H et C sont indiqués avec la position du site de clivage. Le symbole (+) indique la présence d'une éventuelle charge positive. (B) Séquences signal Tat des protéines SufI de *E. coli*, TorA d'*E. coli* et de la lipoprotéine DmsA de *Shewanella oneidensis*. Le consensus Tat est indiqué en rouge et les symboles – indiquent un changement de domaine. Le site de clivage de la signal peptidase est souligné. (C) Représentation schématique d'une séquence signal Sec. Les domaines N, H et C sont indiqués avec la position du site de clivage. Le symbole + indique la position de charges positives. (D) Séquences signal des protéines OmpA, MalE et de la lipoprotéine Pal d'*E. coli*. Les symboles – indiquent un changement de domaine. Le site de clivage de la signal peptidase est souligné. Adapté de Palmer et Berks (2012).

lieu que lorsque les deux partenaires sont repliés et associés sous la forme d'un dimère. Ce processus a été décrit pour la première fois pour le complexe hydrogénase 2 d'*E. coli* (Rodrigue *et al.*, 1999).

Ces protéines repliées dans le cytoplasme avant exportation doivent posséder un signal qui assure leur adressage au système Tat plutôt qu'au système Sec, incapable de prendre en charge des protéines repliées. La nature de ce signal est décrite ci-dessous.

II.B.3 La séquence signal Tat

De façon analogue au système Sec, l'adressage d'une protéine au système Tat dépend d'une séquence signal amino terminale spécifique de ce système. Le rôle primordial de la séquence signal Tat dans cet adressage a été montré par l'étude de l'exportation Tat dépendante de protéines de fusion entre la séquence signal Tat de la protéine TorA d'*E. coli* et les formes matures de diverses protéines telles que MalE ou la GFP (Santini *et al.*, 1998 ; Blaudeck *et al.*, 2003 ; Ize *et al.*, 2002). Tout comme les séquences signal Sec, les séquences signal Tat possèdent une organisation tripartite (Figure II.6). Cependant, chacune des trois parties présente des caractéristiques propres au système Tat (Berks, 1996 ; Cristobal *et al.*, 1999).

(1) Le domaine amino terminal (Domaine N) basique est généralement plus long que celui des séquences signal Sec et porte un motif conservé SRRXFLK. La nature et le rôle de ce motif sont discutés plus loin.

(2) Le domaine central (Domaine H) est généralement moins hydrophobe que celui des séquences signal Sec et une augmentation de l'hydrophobicité de ce domaine conduit à un adressage de la protéine au système Sec (Cristobal *et al.*, 1999). De plus, ce domaine est impliqué dans l'interaction avec les REMP (Redox enzyme maturation proteins) qui sont des chaperons cytoplasmiques spécifiques de certaines enzymes Redox et qui sont impliqués dans le repliement et l'adressage au système Tat de ces protéines (Shanmugham *et al.*, 2012).

(3) Le domaine carboxy terminal (Domaine C) porte un site de clivage pour une signal peptidase. Ce site de clivage est le même que dans une séquence signal Sec, à savoir A-X-A pour la signal peptidase LepB (Luke *et al.*, 2009) et $L_{-3}(A/S/T)_{-2}(G/A)_{-1}C_{+1}$ pour la signal peptidase LspA (Pugsley, 1993). Dans certains cas le domaine carboxy terminal porte une charge globale positive qui a été décrite comme un signal d'évitement à Sec (Bogsch *et al.*, 1997 ; Blaudeck *et al.*, 2003). De plus, ce domaine est impliqué avec le domaine hydrophobe dans l'interaction avec les REMP (Shanmugham *et al.*, 2012).

Le motif SRRXFLK du domaine amino terminal joue un rôle particulièrement important dans l'adressage au système Tat. Les deux arginines de ce motif sont presque toujours invariantes et confèrent leur nom au système Tat qui est un acronyme pour Twin Arginine Translocation. Le remplacement de l'une ou des deux arginines de ce motif par une lysine conduit à une diminution drastique de la vitesse d'exportation (Stanley *et al.*, 2000 ; Ize *et al.*, 2002). Cependant, il est intéressant de noter que certains substrats du système Tat disposent naturellement d'un motif dont

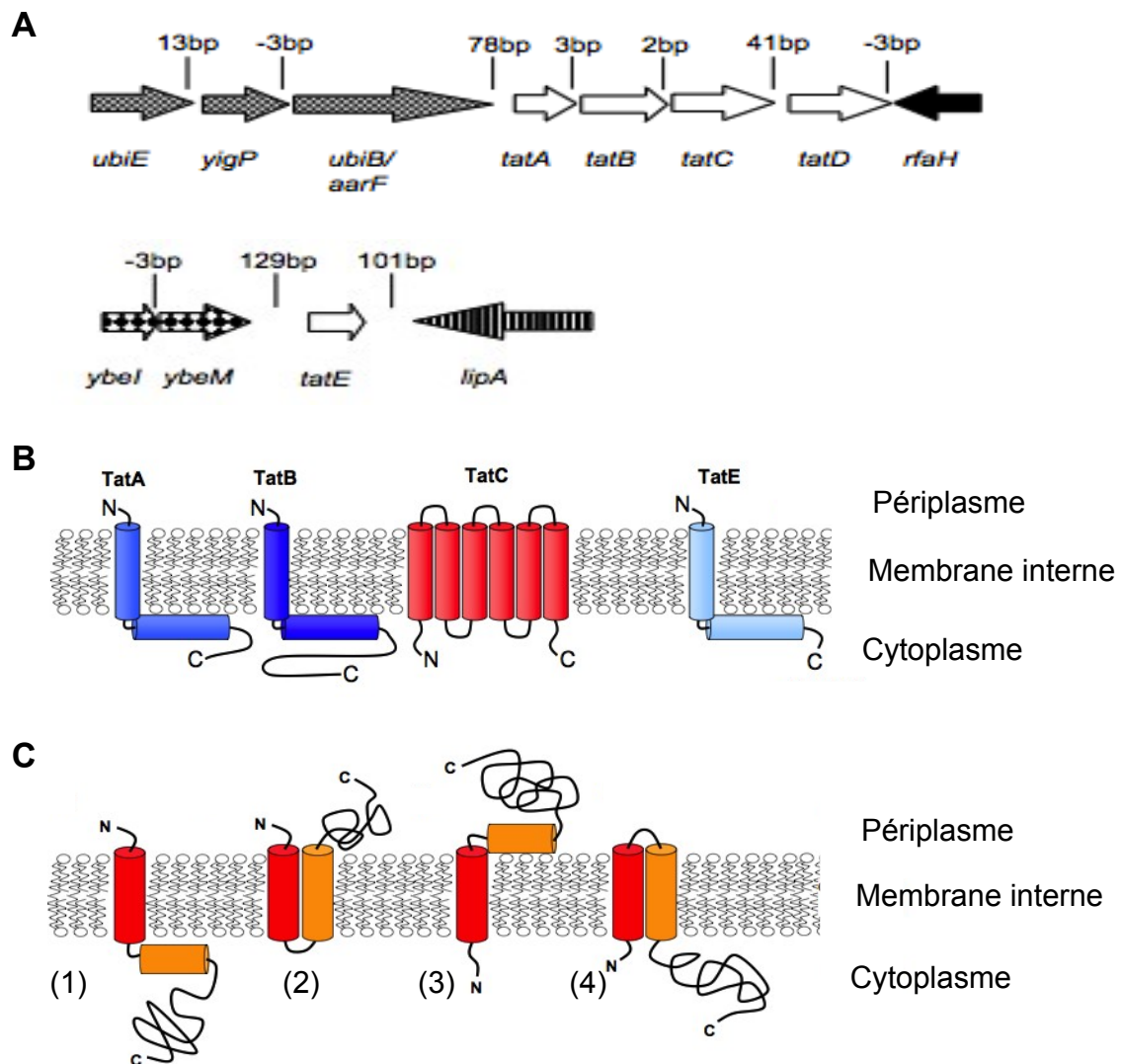


Figure II.7 : Composants du système Tat d'*E. coli*.

(A) Contexte génétique des unités transcriptionnelles *tatABCD* et *tatE* chez *E. coli* K-12. (B) Prédiction de topologie des protéines Tata, B, C et E. La topologie de la protéine TatC a été validée expérimentalement (Punginelli *et al.*, 2007). (C) Différentes topologies proposées pour la protéine Tata. (1) Topologie prédite avec une extrémité amino terminale périplasmique. (2) Topologie alternative avec une extrémité carboxy terminale périplasmique (Gouffi *et al.*, 2004). (3) et (4) Tata peut emprunter deux topologies différentes avec une extrémité amino terminale cytoplasmique et une extrémité carboxy terminale soit périplasmique soit cytoplasmique (Chan *et al.*, 2007). Adapté de Palmer *et al.* (2012).

la première arginine est remplacée par une lysine. C'est notamment le cas de la tétrathionate reductase TtrB de *Salmonella enterica* (Hinsley *et al.*, 2001). Si l'occurrence des autres résidus du motif est supérieure à 50%, le rôle exact de ces derniers reste moins certain (Berks, 1996 ; Stanley *et al.*, 2000). Il a été proposé que le caractère hydrophobe des résidus phénylalanine et leucine était crucial pour l'adressage au système Tat (Stanley *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2006 ; Mendel *et al.*, 2008) et que le résidu X, généralement polaire, permettait d'insérer un espace entre les arginines chargées et ces deux résidus hydrophobes (Buchanan *et al.*, 2001). La lysine finale, quant à elle, est très souvent présente dans les enzymes à cofacteur et a été décrite comme un signal qui pourrait ralentir l'adressage de ces enzymes au système Tat afin d'assurer l'intégration cytoplasmique du cofacteur (Stanley *et al.*, 2000). Cependant, il est important de noter que si ces observations sont vraies pour un substrat donné dans un organisme donné, elles ne le sont pas forcément dans d'autres cas et sont donc difficilement généralisables. Certains substrats du système Sec, comme la protéine DacD d'*E. coli*, possèdent un doublet arginine dans la partie amino terminale de leur séquence signal. Cette observation implique que la présence d'un doublet arginine dans une séquence signal n'est pas incompatible avec un adressage au système Sec et souligne l'importance des informations portées par les différents domaines de la séquence signal ainsi que par les autres résidus du motif Tat.

II.B.4 Les gènes Tat

Chez *E. coli* le système Tat est codé par cinq gènes répartis en deux unités transcriptionnelles distinctes (Figure II.7 A et B). La première est un opéron comprenant les gènes *tatA*, *tatB*, *tatC* et *tatD* et a été découverte grâce à un crible génétique basé sur la capacité des bactéries à exporter la protéine périplasmique DmsA (Weiner *et al.* 1998). La seconde unité transcriptionnelle ne contient que le gène *tatE* et a été identifiée par homologie avec un gène du système Tat des thylakoïdes de plante (Sargent *et al.*, 1998). Les recherches dans les bases de données semblent indiquer que les gènes codant le système Tat sont présents chez de nombreuses bactéries (Wu *et al.*, 2000). Toutefois, les composants du système varient selon les organismes. Il a été proposé que le système Tat ancestral n'était composé que des produits des gènes *tatA* et *tatC* (Settles *et al.*, 1997 ; Weiner *et al.* 1998). Cette hypothèse est étayée par l'observation que les gènes *tatB* et *tatE* sont issus d'évènements de duplication de *tatA* (Sargent *et al.*, 1998 ; Yen *et al.*, 2002). Plus précisément, *tatB* n'est présent que chez les protéobactéries et les bactéries à Gram positif avec un haut pourcentage GC. Dans ces organismes, *tatB* code pour une protéine essentielle au fonctionnement du système Tat et dont la fonction est différente de celle de TatA. Quant à *tatE*, il est issu d'une duplication récente de *tatA* et n'est présent que dans le génome de quelques espèces de gamma-protéobactéries.

Chez les bactéries, la diversité et l'histoire évolutive des gènes du système Tat suggèrent que tous ne sont pas indispensables au fonctionnement du système. Plusieurs observations expérimentales corroborent cette hypothèse. Chez *E. coli*, TatE possède une fonction redondante

à celle de TatA et le faible niveau d'expression de *tatE* par rapport à *tatA* en fait un élément non essentiel pour le fonctionnement du système Tat (Sargent *et al.*, 1998 ; Jack *et al.*, 2001). De la même manière, si TatD a tout d'abord été impliquée dans la dégradation Tat-dépendante de substrats mal repliés, une étude récente a montré que l'effet observé était lié à un biais technique et aucun rôle de TatD dans le fonctionnement du système Tat n'a été décrit à ce jour (Matos *et al.*, 2009 ; Lindenstrauss *et al.*, 2010). Ces observations indiquent que seules TatA, B et C sont indispensables au fonctionnement du système Tat chez *E. coli*. Chez *Bacillus subtilis* ou *tatB* est absent TatA et TatC assurent à elles seules le fonctionnement du système Tat, TatA pouvant remplir à la fois la fonction de TatA et de TatB (Barnett *et al.*, 2008). Il est donc possible de définir deux types de systèmes Tat minimum : le système TatABC et le système TatAC. Dans la suite de ce manuscrit nous nous concentrerons sur le système TatABC qui est celui présent chez les protéobactéries.

La répartition non ubiquitaire des gènes *tat* dans les génomes bactériens (Wu *et al.*, 2000) indique que ce système pourrait conférer un avantage pour la bactérie dans certaines niches écologiques sans pour autant être essentiel. Cette idée est renforcée par l'observation chez *Bacillus subtilis* d'un second système Tat, issu de la duplication du premier, et s'exprimant dans des conditions environnementales différentes (Jongbloed *et al.*, 2004).

II.B.5 Les protéines Tat

La protéine TatC est la plus conservée des protéines du système Tat et est indispensable au fonctionnement du système quelque soit l'organisme considéré. Il s'agit d'une protéine de MI de 256 acides aminés. Les logiciels de prédiction de topologie prédisent que TatC est insérée dans la MI par 6 segments transmembranaires et l'exactitude de ces prédictions a été démontrée par des expériences de cystéine-scanning (Punginelli *et al.*, 2007) (Figure II.7 B).

Du fait que les gènes *tatB* et *tatE* résultent de la duplication de *tatA*, les protéines TatA, B et E sont proches en terme de taille et de séquence en acides aminés. Il s'agit de trois protéines de MI et la topologie prédite pour les trois protéines est la même : une extrémité amino terminale périplasmique, un segment transmembranaire, une hélice α amphipathique cytoplasmique et une extrémité carboxy terminale cytoplasmique non structurée (Figure II.7 B). Cependant, cette prédiction de topologie est aujourd'hui remise en question pour TatA. En effet, il a été montré que la région carboxy terminale de TatA pouvait être présente à la fois dans le cytoplasme et le périplasme indiquant que l'hélice α amphipathique pourrait constituer un segment transmembranaire (Gouffi *et al.*, 2004) (Figure II.7 C). De plus, une étude ultérieure a confirmé ce résultat et a montré que l'extrémité amino terminale de TatA était présente dans le cytoplasme. (Chan *et al.*, 2007). Ces observations ont conduit au modèle selon lequel TatA pourrait adopter deux conformations différentes. Dans le premier cas TatA est ancrée dans la MI par un segment transmembranaire et son extrémité carboxy terminale est périplasmique. Dans le second cas TatA dispose de deux segments transmembranaires et son extrémité carboxy terminale est

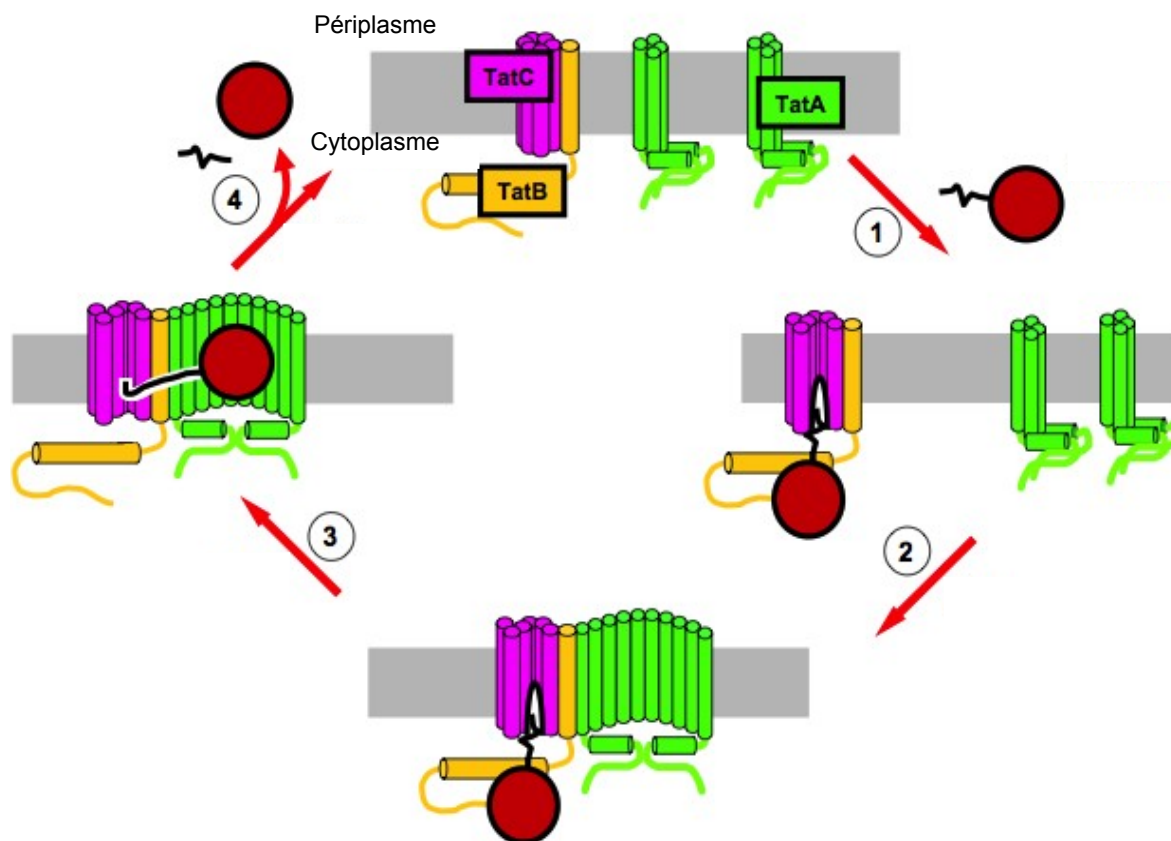


Figure II.8 : Modèle de cycle de fonctionnement du système Tat.

Initialement, les protéines TatB et TatC forment un complexe constitué de 6 à 8 copies de chaque protéine (une seule copie de TatB est représentée) et TatA forme des tétramères. La séquence signal du substrat est reconnue par TatC (1) et la fixation du substrat au niveau du complexe TatBC entraîne le recrutement d'oligomères de TatA (2). Le substrat traverse ensuite la membrane interne au niveau du complexe TatABC. Selon le modèle présenté, cette traversée se fait au travers d'un pore formé par des oligomères de TatA (3). Après exportation la séquence signal est clivée et le substrat est relâché dans le périplasmе (4). Le complexe TatABC se désassemble. Adapté de Palmer *et al.* (2012).

cytoplasmique (Figure II.7 C). De façon intéressante, Chan *et al.* (2007) ont montré que le changement de conformation de TatA était lié au potentiel de membrane, indiquant qu'il pourrait être lié au fonctionnement du système Tat.

II.B.6 Fonctionnement du système Tat

Le système Tat assure l'exportation de protéines repliées dont le diamètre peut atteindre 70Å (Berks *et al.*, 2000) et l'existence permanente d'un pore de cette taille dans la MI conduirait inévitablement à une perte de son rôle de barrière. Par conséquent, la structure du système Tat est particulièrement dynamique au cours de l'exportation (Figure II.8). Avant interaction avec le substrat, les protéines TatB et TatC forment un complexe constitué de 6 à 8 copies de chaque protéine (Bolhuis *et al.*, 2001 ; Tarry *et al.*, 2009). Ce complexe semble responsable du recrutement du substrat puisque TatC interagit avec le motif SRRXFLK et confère la spécificité du système Tat vis-à-vis de ce motif (Cline et Mori, 2001 ; Alami *et al.*, 2003 ; Strauch et Georgiou, 2007). Malgré la présence de plusieurs unités de TatC dans le complexe TatBC, seuls 1 ou 2 substrats peuvent se lier au complexe (Tarry *et al.*, 2009). La fixation du substrat sur le complexe TatBC provoque le recrutement de la protéine TatA (Mori et Cline, 2002). Avant interaction avec le complexe TatBC, TatA est probablement présente sous forme de tétramères et son recrutement au niveau du complexe TatBC induit la polymérisation de TatA sous la forme d'oligomères plus larges contenant en moyenne 25 copies de TatA (Leake *et al.*, 2008). Des observations en microscopie électronique ont montré que les oligomères de TatA avaient une forme annulaire dont le diamètre variait en fonction du nombre de monomères impliqués (Gohlke *et al.*, 2005). Cette observation a conduit au modèle selon lequel le substrat pourrait traverser la membrane interne au travers d'un pore formé par TatA. Toujours selon ce modèle, la capacité de TatA à former des pores de tailles différentes assurerait l'étanchéité entre cytoplasme et périplasma en ajustant la taille du pore à celle de la protéine à exporter. Cependant, ce point est contredit par l'observation selon laquelle la taille des oligomères formés par TatA est indépendante de la taille de la partie mature de la protéine à exporter (Dabney-Smith *et al.*, 2006). D'autres modèles ont été proposés dans lesquels TatA assurerait le passage du substrat dans le périplasma en déstabilisant la bicouche phospholipidique sans pour autant former un pore dans celle-ci (Cline et McCaffery, 2007 ; Palmer et Berks, 2012). Dans ce contexte, la déstabilisation de la membrane interne par TatA pourrait être liée à un changement de topologie de cette dernière (Figure II.7 C). Après le passage de la membrane interne le substrat est relâché dans le périplasma par l'action d'une signal peptidase, qui assure le clivage de la séquence signal, et le complexe TatABC se désassemble (Mori et Cline, 2002).

Contrairement à ce qui est observé pour le système Sec, l'énergie nécessaire pour l'exportation des protéines par le système Tat n'est pas fournie par l'ATP mais par la force proton motrice (Yahr et Wickner, 2001). Cependant, le rôle exact de la force proton motrice dans le fonctionnement du système Tat est encore discuté.

II.B.7 Le contrôle qualité Tat

Le rôle physiologique du système Tat est d'assurer l'exportation de protéines dont l'activité dépend de leur repliement dans le cytoplasme. Par conséquent, différents mécanismes assurent que seules les protéines correctement repliées dans le cytoplasme soient exportées par le système Tat. Un tel mécanisme est particulièrement bien décrit pour la protéine TorA d'*E. coli* qui doit acquérir un cofacteur MGD (Molybdoptérine Guanine Dinucléotide) avant exportation (Santini *et al.*, 1998). Dans ce cas, un chaperon cytoplasmique spécifique dénommé TorD se lie à la fois à la séquence signal de TorA (Jack *et al.*, 2004) et à sa forme mature (Pommier *et al.*, 1998). TorD participe à l'acquisition de MGD par TorA et préviendrait l'adressage de TorA au système Tat avant l'acquisition de son cofacteur (Sargent, 2007). Ce mécanisme commun à plusieurs enzymes nécessitant un cofacteur cytoplasmique a été dénommé «Tat proofreading ».

Il a également été proposé que le système Tat pourrait disposer d'une capacité intrinsèque à différencier les substrats repliés de ceux non repliés (DeLisa *et al.*, 2003). Cependant, ce mécanisme est actuellement remis en question par le fait que le système Tat est capable d'exporter des peptides hydrophiles non repliés d'une taille généralement inférieure à 100 acides aminés (Richter *et al.*, 2007).

II.B.8 Implication du système Tat dans l'insertion des protéines de MI

La majorité des protéines de MI sont synthétisées sans séquence signal et sont adressées au système Sec par le complexe SRP. L'action combinée du système Sec et de la protéine YidC assure ensuite l'insertion des hélices α hydrophobes dans la MI. Cependant, des travaux chez *E. coli* ont montré que plusieurs protéines dotées d'une séquence signal Tat possèdent une hélice α carboxy-terminale qui est insérée dans la MI de façon Tat dépendante et YidC indépendante (Hatzixanthis *et al.*, 2003). Le système Tat a également été impliqué dans l'insertion dans la membrane interne de l'hélice α amino terminale des protéines Rieske Fe/S des chloroplastes et de *Legionella pneumophila* (Molik *et al.*, 2001 ; De Buck *et al.*, 2007). L'ensemble de ces données suggère qu'il existe une voie alternative d'insertion des protéines dans la MI. Cependant, le mécanisme exact par lequel le système Tat assure l'insertion d'hélices α dans la bicouche phospholipidique reste inconnu.

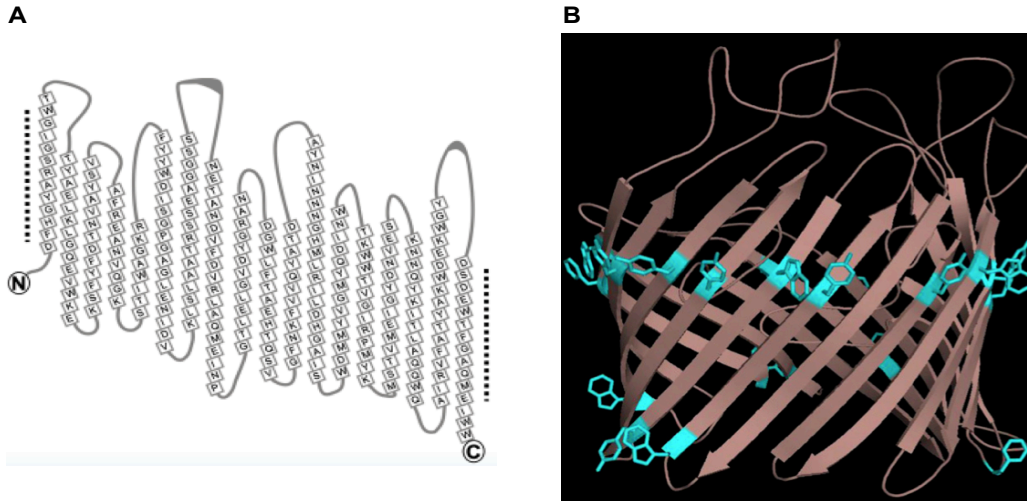


Figure II.9 : Structure de la protéine en tonneau β LamB d'*E. coli*.

(A) Le squelette polypeptidique de la protéine LamB d'*E. coli* est représenté de façon à montrer les résidus impliqués dans les différents brins β (les résidus impliqués sont sous forme de carré). Les différents brins β sont alignés pour montrer les liaisons hydrogène entre les résidus des différents brins. Les résidus des premier et dernier brins dont les interactions par liaisons hydrogènes ferment le tonneau β sont mis en évidence par des lignes en pointillés. D'après Gatsos *et al.* (2008) (B) Structure en tonneau β de la protéine LamB d'*E. coli*. Les résidus aromatiques formant la ceinture d'aromatiques sont montrés en cyan. D'après Ricci et Silhavy (2011).

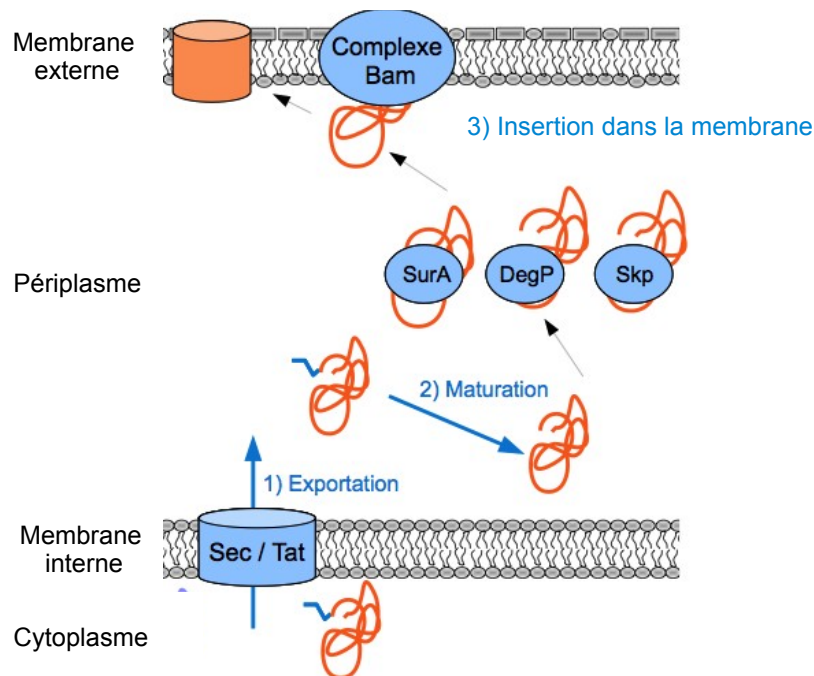


Figure II.10 : Représentation schématique de l'adressage des PT β à la membrane externe.

1) La protéine est synthétisée dans le cytoplasme sous la forme d'un précurseur doté d'une séquence signal Sec. Elle est ensuite exportée depuis le cytoplasme vers le périplasm par le système Sec. 2) La protéine acquiert sa forme mature par clivage de la séquence signal. Il est important de noter que pour des soucis de clarté ce processus a été représenté dans le périplasm mais a en réalité lieu au niveau de la membrane interne. 3) La protéine est prise en charge par l'un

des trois chaperons SurA, Skp ou DegP qui assure son adressage au complexe Bam. Le complexe
 Cette thèse est accessible à l'adresse : <http://theses.insa-lyon.fr/publication/2012ISAL0126/these.pdf>
 © [A. Rondelet], 2012, INSA de Lyon, tous droits réservés.

III Biosynthèse des protéines en tonneau β

III.A Introduction

La membrane externe diffère de la MI notamment de part sa composition lipidique riche en LPS qui lui confère une forte imperméabilité aux composés extérieurs (Nikaido, 2003). Une autre différence entre MI et ME réside dans la nature de leurs protéines intégrales de membrane. En effet, les protéines intégrales de membrane externe ne sont pas insérées dans la membrane par une ou plusieurs hélices α mais forment une structure particulière dénommée tonneau β (Schulz, 2002). Cette structure correspond à un nombre pair de brins β (généralement entre 8 et 22) organisés de façon antiparallèle autour d'un pore central qui peut être fermé par un domaine périplasmique (Figure II.9 A et B). Au sein du tonneau, les brins β interagissent les uns avec les autres via des liaisons hydrogènes et le tonneau est fermé par l'interaction entre le premier et le dernier brin β . Cette organisation particulière des brins β permet d'exposer les résidus hydrophobes de la protéine vers la partie lipidique de la membrane et permet donc l'insertion de la protéine dans la membrane. Deux ceintures de résidus aromatiques localisées aux interfaces entre les parties hydrophobes et hydrophiles de la membrane permettent de stabiliser le tonneau β et de le maintenir en position verticale (Figure II.9 B).

Parmi les différentes protéines en tonneau β (PT β), les porines sont les plus abondantes dans la cellule et jouent un rôle particulièrement important dans la fonction de barrière sélective de la ME (Nikaido, 2003). En effet, le canal central de ces protéines est hydrophile et assez large pour permettre la diffusion de différentes molécules dans la cellule. Il existe deux types de porines: les porines générales trimériques (OmpF, OmpC) qui permettent la diffusion aspécifique de molécules d'une taille inférieure à 700 Da et les porines spécifiques de certains substrats comme LamB chez *E. coli* ou KdgM et KdgN chez *D. dadantii* (Blot *et al.*, 2002 ; Condemine et Ghazi, 2007). Les autotransporteurs, une autre catégorie de PT β , sont impliqués dans la sécrétion des protéines. Ces PT β sont constituées d'un domaine formant un tonneau β dans la ME qui assure la sécrétion d'un domaine passager soluble (Leyton *et al.*, 2012). En outre, les PT β peuvent être impliquées dans une large gamme de fonction cellulaire comme l'efflux de composés toxiques, le transport actif, la biosynthèse de la ME, etc (Ricci et Silhavy, 2012).

Les PT β sont synthétisées dans le cytoplasme sous la forme de précurseurs dotés d'une séquence signal Sec et sont sujettes à l'agrégation. Elles doivent donc être maintenues tout au long de leur adressage dans un état permettant leur repliement et leur insertion dans la ME. Cette fonction est assurée par les chaperons cytoplasmiques associés au système Sec (cf Chapitre II II.A) et par les chaperons périplasmiques SurA, Skp et DegP (Figure II.10). Ces trois derniers ne sont cependant pas suffisants pour catalyser *in vivo* l'insertion des PT β dans la ME et cette dernière étape repose sur un complexe de ME très conservé dénommé Bam (β -barrel assembly machinery) (Hagan *et al.*, 2011). Ces différents facteurs périplasmiques et de ME assurent l'adressage et l'insertion des PT β dans un compartiment dépourvu de toute source d'énergie. Leur nature et leur fonctionnement sont décrits ci-dessous.

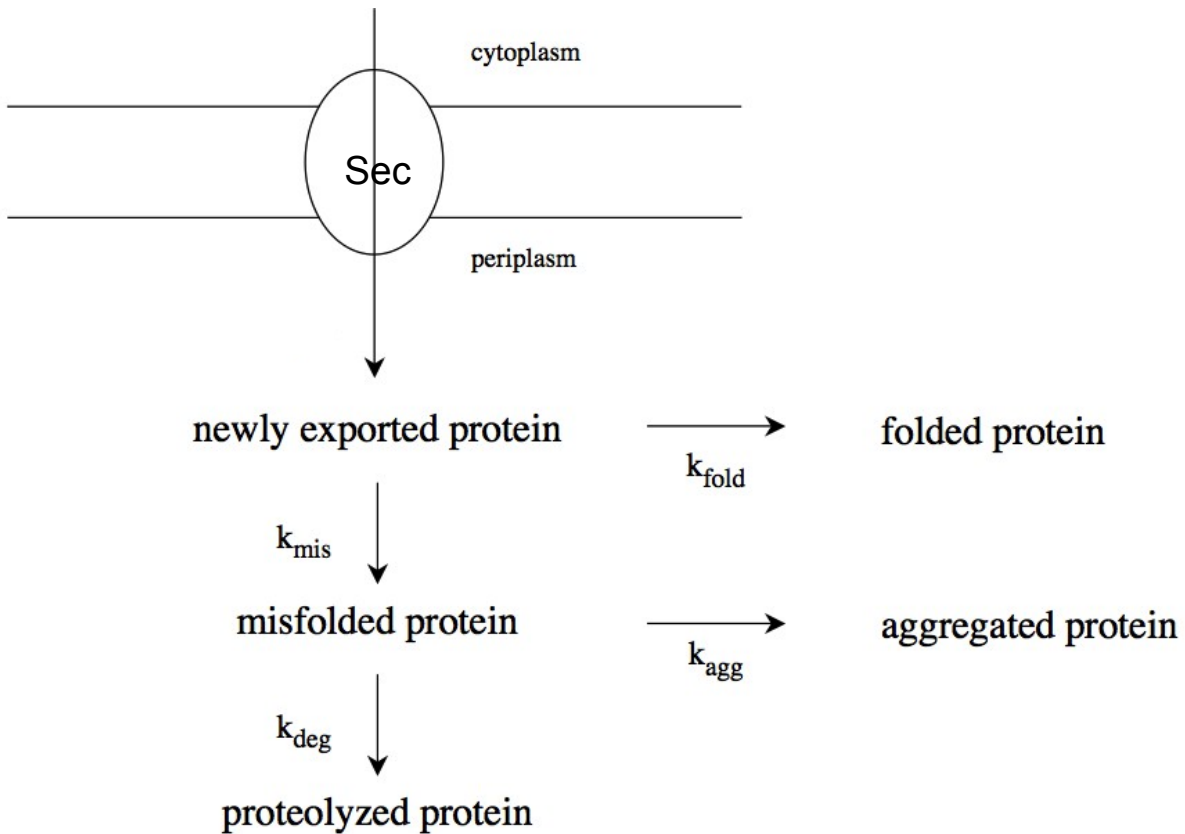


Figure II.11 : Compétition entre repliement, agrégation et dégradation dans le périplasm.

Les protéines nouvellement exportées peuvent schématiquement soit se replier correctement soit mal se replier. Le choix entre ces deux voies se fait selon un équilibre impliquant des constantes cinétiques de repliement (k_{fold}) et de mauvais repliement (k_{mis}). Le rôle des chaperons est de déplacer l'équilibre dans le sens du repliement. Les protéines mal repliées peuvent ensuite soit être dégradées soit s'agréger selon des constantes cinétiques de dégradation (k_{deg}) et d'agrégation (k_{agg}). Le rôle des protéases est de déplacer l'équilibre dans le sens de la dégradation. D'après Miot et Betton (2004).

III.B Les chaperons périplasmiques SurA, Skp et DegP

III.B.1 Généralités sur le repliement des protéines dans le périplasma

De manière générale, après exportation par le système Sec les protéines périplasmiques doivent se replier pour être fonctionnelles. Ce processus peut être spontané mais peut aussi nécessiter certains facteurs pour catalyser des réactions autrement limitantes dans le repliement des protéines. Ces facteurs peuvent être des disulfure isomérases comme DsbA, DsbC et DsbG qui assurent la formation de ponts disulfures ou des peptidyl prolyl isomérase comme PpiA, PpiD, FkpA et SurA qui assurent l'isomérisation cis-trans des prolines. Si pour diverses raisons la protéine ne parvient pas à se replier, elle peut soit s'agréger soit être dégradée par une protéase périplasmique (Figure II.11) (Miot et Betton, 2004). Il est important de noter que contrairement à ce qui se passe dans le cytoplasme tous ces processus se déroulent dans un environnement dépourvu de source d'énergie.

Dans le cas des PT β , la protéine n'est complètement repliée qu'au moment de son insertion dans la ME. La protéine doit donc être maintenue dans un état compatible avec son insertion tout au long de son adressage à la ME. Lorsque des PT β échappent au contrôle des chaperons périplasmiques elles s'accumulent sous forme non repliées dans le périplasma et finissent par s'agréger. Les bactéries ont donc mis en place différents systèmes de stress reconnaissant les PT β non repliées libres dans le périplasma et assurant la dégradation ou le repliement de ces dernières (Ruiz et Silhavy, 2005 ; Bury-Moné *et al.*, 2009). La plus étudiée de ces réponses est le système σ^E dont l'activation conduit à une diminution de la production des PT β et à une augmentation de l'expression des différents facteurs assurant l'adressage ou la dégradation des PT β (Ades, 2008).

Plusieurs chaperons tels que SurA, Skp, DegP, FkpA et PpiD ont été impliqués dans le repliement et l'adressage des PT β (Hagan *et al.*, 2011 ; Matern *et al.*, 2010). Cependant, l'importance relative de ces différents facteurs n'est pas la même. Ainsi, chez *E. coli*, FkpA et PpiD semblent jouer un rôle mineur alors que SurA semble être le principal facteur périplasmique pour l'adressage des PT β (Hagan *et al.*, 2011 ; Matern *et al.*, 2010 ; Denoncin *et al.*, 2012). Dans la suite de ce manuscrit nous nous concentrerons sur SurA, Skp et DegP qui sont les principaux facteurs impliqués dans la livraison de PT β au complexe Bam.

III.B.2 Le chaperon SurA

Le gène *surA* (pour survival) d'*E. coli* a tout d'abord été décrit dans les années 1990 comme nécessaire à la survie de la bactérie en phase stationnaire (Tormo *et al.*, 1990). Par la suite, SurA a été impliquée dans le repliement de plusieurs PT β et l'observation d'une interaction *in vitro* entre SurA et des PT β non repliées indique clairement que SurA joue un rôle de chaperon vis-à-vis de ce type de protéines (Lazar et Kolter, 1996 ; Behrens *et al.*, 2001 ; Bitto et McKay, 2004 ; Ureta *et al.*, 2007). De plus, la délétion de *surA* conduit à un défaut de la biosynthèse de la ME comme le montre la diminution de la densité de la ME ou l'activation du système σ^E dans des

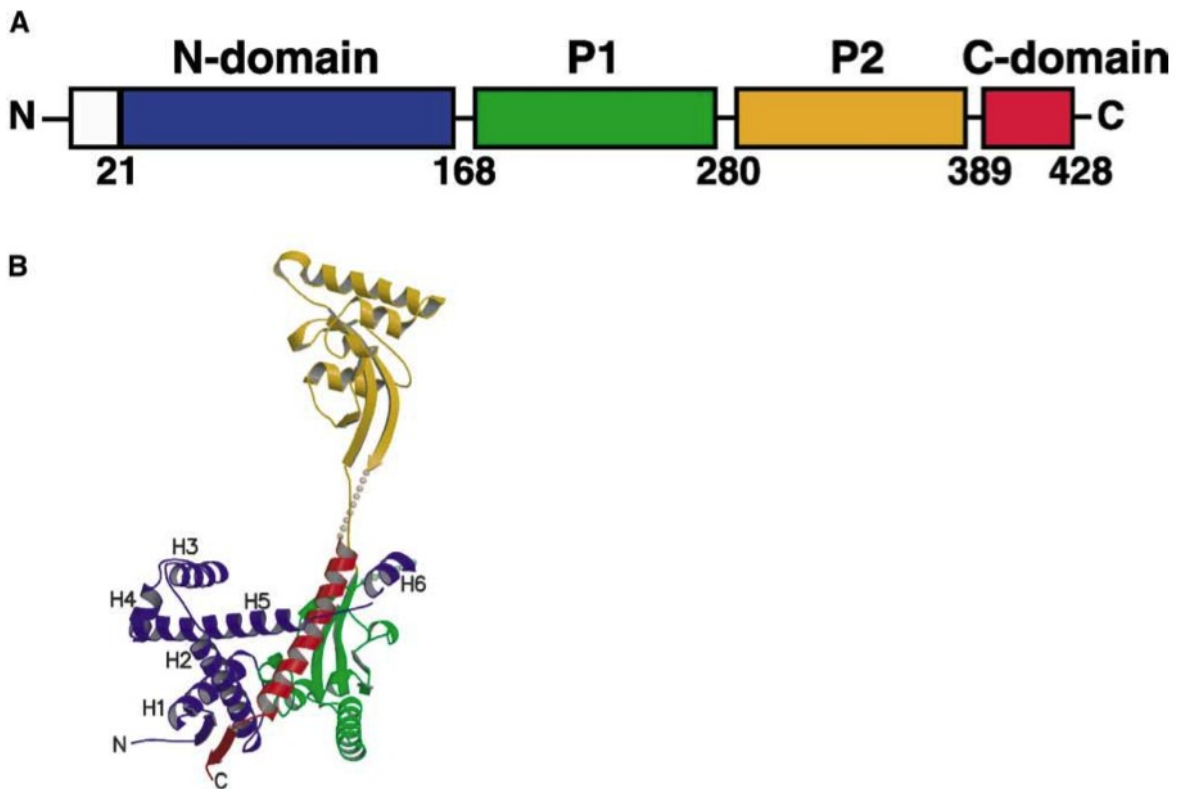


Figure II.12 : Structure du chaperon périplasmique SurA d'*E. coli*.

(A) Représentation schématique des différents domaines de SurA. La séquence signal Sec est indiquée en blanc, le domaine N en bleu, le domaine C en rouge et les domaines PPIase 1 et 2 en vert et jaune respectivement. Les chiffres indiquent la position sur la chaîne polypeptidique des résidus de début et de fin des différents domaines. (B) Représentation de la structure d'un monomère de SurA. Les domaines sont représentés de la même couleur qu'en A. Les régions non définies sont tracées en pointillées. D'après Bitto et McKay (2002).

mutants *surA* d'*E. coli* (Rouvière et Gross, 1996 ; Sklar *et al.*, 2007b). L'ensemble de ces observations et la détection d'interactions entre SurA et le complexe Bam ont conduit à l'idée selon laquelle SurA serait un chaperon dédié à l'adressage des PT β au système Bam (Sklar *et al.*, 2007b ; Vuong *et al.*, 2008 ; Bennion *et al.*, 2010). Cependant, SurA a également été impliquée dans le transport du domaine passager de l'autotransporteur EspP indiquant que sa spécificité d'action pourrait ne pas être limitée aux PT β (Ruiz-Perez *et al.*, 2009).

SurA est composée de deux domaines peptidyl-prolyl isomérase (PPIase) P1 et P2 qui sont encadrés par des domaines N et C terminaux (Figure II.12 A) (Bitto et McKay, 2002). Le domaine P2 confère à SurA une activité PPIase (Rouvière et Gross 1996), mais cette dernière n'est pas nécessaire au rôle de chaperon de SurA puisque des délétions des domaines P1 et / ou P2 n'altèrent pas la fonction de SurA (Behrens *et al.*, 2001 ; Alcock *et al.*, 2008). La structure au rayon X de SurA montre que les domaines N, P1 et C forment une structure globulaire et que le domaine P2 se place en satellite de cette structure (Figure II.12 B) (Bitto et McKay, 2002). Les domaines N, P1 et C forment également un sillon de 50 Å de long qui est un bon candidat pour accueillir des peptides non repliés (Bitto et McKay, 2003).

Contrairement aux protéines chaperons du cytoplasme qui ne montrent aucune spécificité de substrat, la protéine SurA semble agir préférentiellement sur les PT β . Des expériences de phage display ont montré que SurA se liait préférentiellement à des séquences consensus de type Ar-X-Ar (ou Ar est un résidu aromatique) (Bitto et McKay, 2003 ; Bitto et McKay, 2004). De plus, des criblages de banques de peptides représentant des PT β liés à une membrane de cellulose ont montré que SurA se liait préférentiellement à des peptides riches en résidus aromatiques dans une configuration spécifique (Hennecke *et al.*, 2005 ; Alcock *et al.*, 2008). De telles séquences ont une occurrence plus forte dans les PT β que dans d'autres protéines et pourraient expliquer la spécificité de SurA pour ces protéines. Cependant, une étude structurale a montré que SurA pouvait adapter ses structures tertiaires et quaternaires pour lier des peptides riches en résidus aromatiques mais qui diffèrent des consensus établis (Xu *et al.*, 2007). Cette même étude suggère que la spécificité de substrat de SurA pourrait être liée au domaine P1 alors que les domaines N et C pourraient former un sillon de liaison aux peptides non spécifique proche de celui du TF (Ludlam *et al.*, 2004). Ces données, associées au fait que SurA lie *in vitro* le domaine passager de EspP (Ruiz-Perez *et al.*, 2009), suggèrent que SurA pourrait lier d'autres types de substrat que les PT β .

III.B.3 Le chaperon Skp

La protéine trimérique Skp (Seventeen kilodalton protein) a tout d'abord été impliquée dans l'adressage des PT β grâce à sa capacité à lier *in vitro* la forme dénaturée de diverses PT β (Chen et Henning, 1996 ; Bulieris *et al.*, 2003 ; Qu *et al.*, 2007). D'autre part, des mutants *skp* d'*E. coli* présentent une altération de la biosynthèse de leur ME et une activation de la réponse σ^E (Chen et Henning, 1996 ; Missiakas *et al.*, 1996 ; Schäfer *et al.*, 1999 ; Sklar *et al.*, 2007b). L'ensemble de ces données indique que Skp joue un rôle de chaperon évitant l'agrégation des PT β dans le

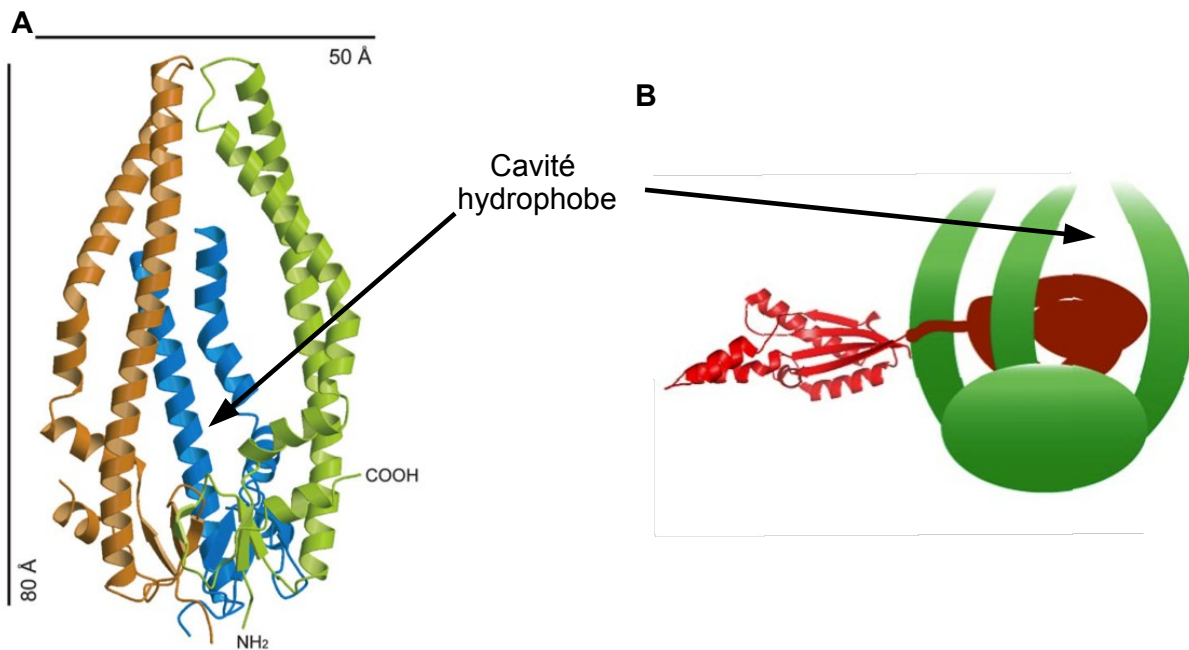


Figure II.13 : Structure de Skp d'*E. coli* et modèle d'interaction avec son substrat.

(A) Structure d'un trimère de Skp d'*E. coli*. Chaque monomère est représenté d'une couleur différente. La cavité hydrophobe formée par les hélices α des monomères de Skp est indiquée par une flèche. D'après Korndörfer et *al.* (2004). (B) Représentation schématique du mode d'interaction de Skp avec OmpA. La partie périplasmique de OmpA est représentée en rouge et est sous forme repliée dans le périplasm. La partie tonneau β de OmpA est représentée en marron et est présente sous forme non repliée dans la cavité hydrophobe formée par le trimère de Skp. D'après Walton et *al.* (2009).

périplasma. Cette idée est corroborée par des études structurales qui ont montré que les trois monomères de Skp s'associaient pour former une cavité hydrophobe (Figure II.13) pouvant accueillir des peptides non repliés tels que le tonneau β de OmpA (Korndörfer *et al.*, 2004 ; Walton et Sousa, 2004 ; Walton *et al.*, 2009). Le crosslink de Skp avec le système Sec et la capacité de Skp à catalyser l'insertion de OmpA dans des membranes chargées négativement suggère que Skp pourrait assurer l'adressage des PT β depuis leur sortie du système Sec jusqu'à la ME (Schäfer *et al.*, 1999 ; Harms *et al.*, 2001 ; Patel *et al.*, 2009) .

Skp semble également exercer un rôle de chaperon pour des protéines autres que les PT β . En effet, Skp prévient *in vitro* l'agrégation de protéines solubles et a été copurifiée avec des protéines périplasmiques (Entzminger *et al.*, 2012 ; Jarchow *et al.*, 2008). Enfin, Skp a été impliquée dans le transport des domaines passagers de certains autotransporteurs (Leyton *et al.*, 2012).

III.B.4 Le chaperon protéase DegP

La protéine DegP est une sérine protéase appartenant à la famille des protéines HtrA. Elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur doté d'une séquence signal Sec, d'un domaine amino terminal doté d'une activité protéolytique (avec la triade catalytique His₁₀₅, Asp₁₃₅ et Ser₂₁₀) et de deux domaines PDZ carboxy terminaux (PDZ1 et PDZ2) impliqués dans les interactions protéine-protéine (Figure II.14 A) (Clausen *et al.*, 2002). Le gène *degP* a initialement été identifié comme essentiel à la croissance d'*E. coli* à des températures supérieures à 42°C (Lipinska *et al.*, 1989) mais plusieurs données impliquent aujourd'hui DegP dans l'adressage des PT β . En effet, chez *E. coli*, *degP* est sous le contrôle des systèmes de stress σ^E et Cpx et un double mutant *surA* et *degP* montre un phénotype synthétique létal (Danese et Silhavy, 1997 ; Ruiz et Silhavy, 2005 ; Sklar *et al.*, 2007b). De plus, le produit de *degP* a été impliqué dans la dégradation de protéines de ME mal repliées (Misra *et al.*, 1991).

Le rôle de DegP dans l'adressage des PT β semble être double puisqu'il a été montré que DegP possède une activité chaperon à des températures inférieures à 28°C et une activité protéase à des températures supérieures à 30°C (Spiess *et al.*, 1999). A cet effet, il est intéressant de noter qu'un variant de DegP dépourvu d'activité protéolytique permet de compléter divers phénotypes liés à l'inactivation de *degP* (Spiess *et al.*, 1999 ; Misra *et al.*, 2000 ; CastilloKeller et Misra, 2003). En l'absence de substrat, DegP forme un hexamère constitué de deux anneaux trimériques qui délimitent une cavité centrale dans laquelle se trouvent les triades catalytiques (Figure II.14 B) (Krojer *et al.*, 2002 ; Krojer *et al.*, 2008 ; Jiang *et al.*, 2008). L'entrée de la cavité est restreinte par les domaines PDZ qui forment des portes latérales flexibles et les triades catalytiques d'un trimère sont rendues inaccessibles par une boucle provenant de l'autre trimère (Krojer *et al.*, 2002 ; Krojer *et al.*, 2008 ; Jiang *et al.*, 2008). L'interaction avec le substrat mal replié fournit l'énergie nécessaire à la formation de structures contenant 12, 18, 24 ou 30 monomères de DegP selon la taille du substrat (Krojer *et al.*, 2008 ; Jiang *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2011c ;

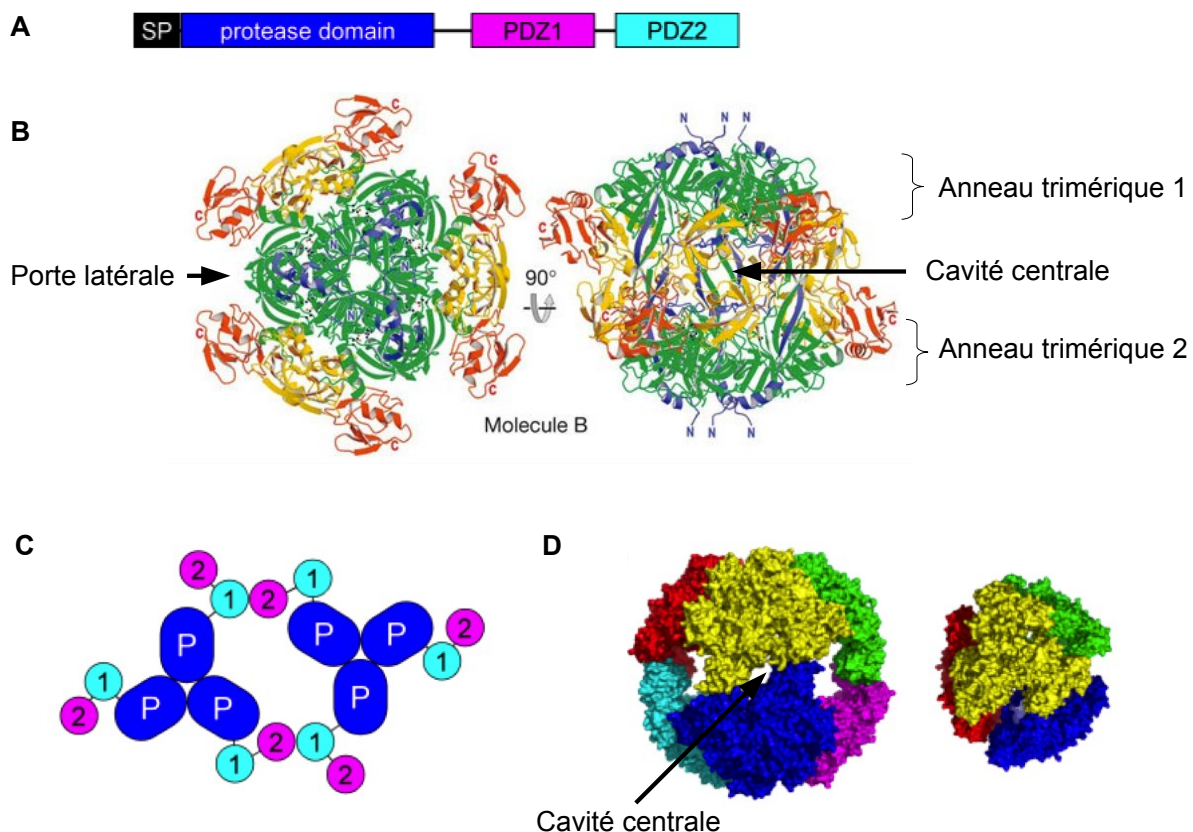


Figure II.14 : Analyse structurale de la protéine DegP d'*E. coli*.

(A) Représentation schématique des différents domaines de DegP. La séquence signal Sec est représentée en noir, le domaine protéolytique en bleu et les domaines PDZ1 et PDZ2 en violet et cyan respectivement. D'après Subrini et Betton (2009). (B) Représentation de la structure d'un hexamère de DegP en vue de dessus (à gauche) et en vue de côté (à droite). Pour chaque monomère, le domaine protéase est représenté en vert et les domaines PDZ1 et PDZ2 en jaune et rouge respectivement. L'hexamère est constitué de deux trimères formant deux anneaux qui se superposent pour former une cavité centrale contenant les triades catalytiques. Les domaines PDZ forment des portes latérales flexibles qui restreignent l'accès à la cavité centrale. D'après Krojer *et al.* (2002). (C) Représentation schématique des interactions des domaines PDZ de chaque trimère au sein de dodécamères et 24-mères de DegP. Le code couleur est le même que en (A). Pour chaque trimère un domaine PDZ1 d'un monomère interagit avec un domaine PDZ2 d'un monomère d'un trimère voisin. D'après Subrini et Betton (2009). (D) Représentation de la surface de 24-mère et de dodécamère de DegP. Ces assemblages sont issus de l'oligomérisation de trimères de DegP et chaque unité trimérique est représentée d'une couleur différente. D'après Subrini et Betton (2009).

Iwanczyk *et al.*, 2011). Ces assemblages sont constitués de plusieurs sous unités trimériques qui interagissent entre elles via leurs domaines PDZ (Figure II.14 C) pour former une cage (Figure II.14 D) au sein de laquelle les triades catalytiques sont accessibles au substrat (Krojer *et al.*, 2008 ; Jiang *et al.*, 2008). L'oligomérisation de DegP semble donc induire son activité protéolytique. Cependant, l'observation de la protéine OmpC sous forme repliée dans la cage d'un dodécamère de DegP suggère que sous cette forme DegP est également dotée d'une activité chaperon (Krojer *et al.*, 2008). De plus, un variant de DegP obligatoirement trimérique conserve son activité protéolytique indiquant que l'oligomérisation de DegP n'est pas à l'origine de l'activation de la protéolyse (Kim et Sauer, 2012). Dans ce contexte, la formation d'une cage par DegP pourrait faciliter la dégradation des protéines mal repliées, leur offrir un environnement facilitant leur repliement (Spiess *et al.*, 1999 ; Krojer *et al.*, 2008) ou les séquestrer pour éviter toute toxicité pour la cellule (CastilloKeller et Misra, 2003). Le mécanisme à l'origine de la transition entre activités chaperon et protéolytique est toujours discuté mais il pourrait être lié à la capacité de la PT β à se replier correctement au sein de la cage formée par DegP.

III.B.5 Organisation de l'adressage des PT β au complexe Bam

La présence dans le périplasme de trois protéines dotées d'une activité chaperon vis-à-vis des PT β soulève la question de la redondance de leur fonction. Chez *E. coli*, des simples mutations pour *skp*, *degP* ou *surA* affectent l'adressage des PT β à la ME sans pour autant l'abolir complètement, indiquant que les trois protéines correspondantes ont des fonctions redondantes (Rizzitello *et al.*, 2001). Toujours chez cet organisme, le mutant *surA* présente le défaut de biosynthèse de la ME le plus marqué. En effet, un mutant *surA* présente une diminution de la densité de sa ME (i.e. du nombre global de protéines dans la ME) qui n'est pas observée chez les simples mutants *skp* ou *degP* et chez le double mutant *skp degP* (Sklar *et al.*, 2007b). De plus, de récentes études protéomiques montrent que l'absence de SurA a un impact plus important sur le protéome de ME que l'absence de DegP ou Skp (Vertommen *et al.*, 2009 ; Denoncin *et al.*, 2012). Ces données indiquent que chez *E. coli*, SurA pourrait être le principal chaperon responsable de l'adressage des PT β au complexe Bam. Cette idée est renforcée par l'observation que SurA et le complexe Bam constituent le système minimal nécessaire à l'insertion *in vitro* de PT β dans des protéoliposomes (Hagan *et al.*, 2010 ; Hagan et Kahne, 2011). Cependant, à l'heure actuelle seule la protéine LptD montre une dépendance stricte à SurA pour son adressage à la ME (Vertommen *et al.*, 2009), indiquant que Skp et DegP peuvent remplir la fonction de SurA pour la majorité des PT β . De manière cohérente, seule une double délétion de *surA* et de l'un des gènes du couple *skp/depP* bloque la croissance d'*E. coli* (Rizzitello *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces données a conduit à l'idée que chez *E. coli* SurA, Skp et DegP agiraient dans deux voies parallèles : une voie principale constituée par SurA et une autre dite de secours constituée par Skp et DegP qui prendrait en charge les PT β qui ont échappé au contrôle de SurA (Figure II.15). Cependant, il est important de noter que le défaut d'adressage de LptD en absence

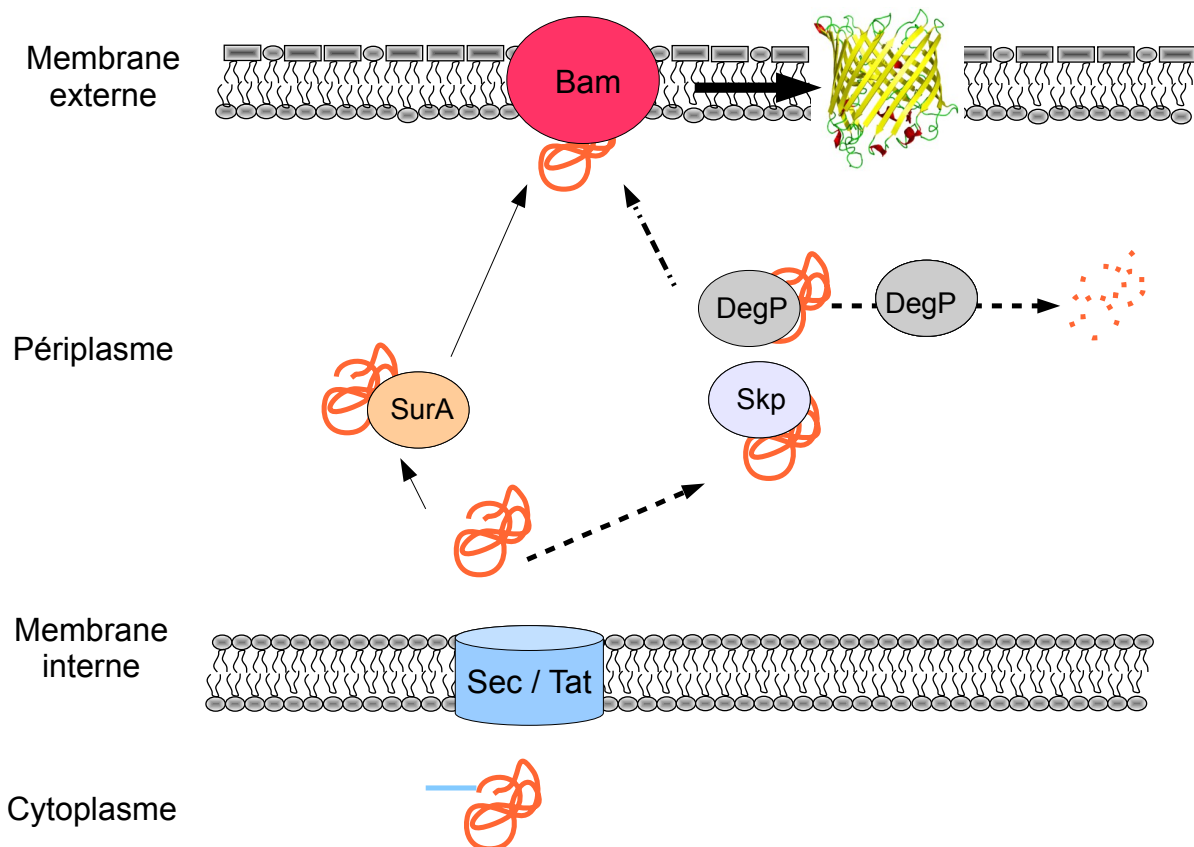


Figure II.15 : Représentation schématique de l'adressage des PT β au complexe Bam chez *E. coli*.

La PT β est synthétisée dans le cytoplasme sous forme de précurseur doté d'une séquence signal Sec. Après exportation par le système Sec, la séquence signal est clivée et SurA prend en charge la PT β pour la délivrer au complexe Bam qui assure le repliement et l'insertion de la PT β dans la ME. Lorsque, après exportation, la PT β ne peut être prise en charge par SurA, elle est prise en charge par Skp ou DegP qui assurent son adressage au complexe Bam. Si la PT β ne peut se replier ou être adressée correctement au complexe Bam, elle est dégradée par DegP.

de SurA pourrait également expliquer le fort impact d'une mutation *surA* sur la biosynthèse de la ME. En effet, LptD est indispensable à la biosynthèse des LPS, eux mêmes fortement impliqués dans le repliement et l'insertion des PT β dans la ME (Ricci et Silhavy, 2012). Ainsi, chez la β -protéobactérie *Neisseria meningitidis* l'absence de LPS dans la ME est tolérée par la bactérie et Skp plutôt que SurA semble être le chaperon principal pour l'adressage des PT β à la ME (Bos *et al.*, 2004 ; Volokhina *et al.*, 2011). De la même façon, SurA n'est pas présente chez toutes les α -protéobactéries et sa fonction est assurée par Skp et DegP dans ces organismes (Gatsos *et al.*, 2008).

III.C Insertion des PT β dans la ME par le complexe Bam

III.C.1 Généralités

Si l'insertion de PT β dans une membrane lipidique peut avoir lieu spontanément *in vitro*, ce processus est trop lent pour être physiologiquement significatif (Kleinschmidt, 2003). Chez les protéobactéries, le système catalysant ce processus est dénommé Bam pour β -barrel assembly machinery. Chez *E. coli*, il est constitué de la PT β BamA et de quatre lipoprotéines BamB, C, D et E (Ricci et Silhavy, 2012). La protéine BamA appartient à la famille Omp85 qui est très conservée chez les bactéries didermes, les mitochondries (Sam50/Tob55) et les chloroplastes (Toc75) (Schleiff et Soll, 2005). Les autres composants du système sont également présents chez d'autres protéobactéries mais de façon moins systématique (Tableau II.1). Ainsi, si *bamD* est présent de façon ubiquitaire chez les protéobactéries, *bamC* et *bamB* sont respectivement absents chez les α -protéobactéries et certaines espèces de *Neisseria* (Gatsos *et al.*, 2008 ; Volokhina *et al.*, 2009).

La nature des PT β que le système Bam doit insérer dans la ME est très variable. A titre d'exemple, la taille d'un tonneau β peut varier de 8 à 22 brins et certaines PT β , comme les autotransporteurs, disposent d'un long domaine soluble dont il faut assurer la sécrétion (Schulz, 2002 ; Leyton *et al.*, 2012). De plus, l'insertion de PT β dans la ME peut nécessiter d'autres facteurs que le système Bam. C'est notamment le cas de la protéine LptD dont l'insertion correcte dans la ME est dépendante de son interaction avec la lipoprotéine LptE (Chimalakonda *et al.*, 2011). Ainsi, le système Bam doit être assez modulable pour assurer l'insertion dans la ME d'une gamme variée de protéines et interagir avec de nombreux autres facteurs cellulaires pour remplir cette fonction. Les connaissances actuelles concernant ce système et son fonctionnement sont résumées ci-après.

III.C.2 Découverte et organisation

Le premier composant du système Bam à avoir été découvert est la PT β BamA. Elle est essentielle à la croissance bactérienne et a initialement été impliquée dans l'adressage des PT β à la ME de *N. meningitidis* en raison de son homologie avec la protéine chloroplastique Toc75 (Voulhoux *et al.*, 2003). Par la suite, l'utilisation de différentes molécules toxiques pour

Proteobacteria (class ^b)	GenBank accession no.	Homology no. (ORF)				
		BamA	BamD	BamE	BamB	BamC
<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655 (γ)	U00096	0.0 (b0177)	0.0 (b2595)	0.0 (b2512)	0.0 (b2617)	0.0 (b2477)
<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar El Tor strain N16961 (γ)	AE003852	0.0 (VC_2252)	1e-68 (VC_0708)	8e-19 (VC_0851)	3e-88 (VC_0762)	4e-32 (VC_2156)
<i>Haemophilus influenzae</i> 10810 (γ)	FQ312006	0.0 (HIB_10490)	4e-55 (HIB_02280)	2e-23 (HIB_09720)		1e-07 (HIB_03150)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01 (γ)	AE004091	e-166 (PA3648)	1e-44 (PA4545)	7e-13 (PA4765)	3e-45 (PA3800)	
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106a (β)	CP000572	e-137 (BURPS1106A_2484)	3e-38 (BURPS1106A_2206)	5e-09 (BURPS1106A_3454)	5e-38 (BURPS1106A_2225)	0.43 ^d (BURPS1106A_2618)
<i>Neisseria meningitidis</i> MCS8 (β)	AE002098	e-123 (NMB0182)	1e-44 (NMB0703)	5e-08 (NMB0204)		0.17 ^c (NMB0928)
<i>Brucella melitensis</i> ATCC 23457 (α)	CP001488	8e-82 (Bmea_A1198)	9e-21 (Bmea_A1470)	2e-04 (Bmea_A0811)		
<i>Caulobacter crescentus</i> CB15 (α)	AE005673	6e-77 (CC_1915)	2e-21 (CC_1984)	1.2 ^c (CC_1365)	1e-17 (CC_1653)	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17025 (α)	CP000661	1e-68 (Rsph17025_2146)	1e-15 (Rsph17025_0702)		5e-21 (Rsph17025_2161)	
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM1325 (α)	CP001622	6e-68 (Rleg_1783)	2e-18 (Rleg_2843)	0.67 ^d (Rleg_1282)		
<i>Myxococcus xanthus</i> DK 1622 (δ)	CP000113	1e-62 (Mxan_4728)	7e-20 (Mxan_1998)		7e-21 (Mxan_3768)	
<i>Helicobacter pylori</i> 26695 (ϵ)	AE000511	3e-24; 2e-05 ^c (HP0655)				

Tableau II.1: Composition et homologies de séquence du complexe Bam dans différentes espèces de protéobactéries (a).

(a) Le degré d'homologie est représenté par une e-valeur, avec un petit score indiquant une bonne homologie de séquence. Le nom des ORF de BamA-E dans les différentes espèces est indiqué entre parenthèse. (b) Les lettres grecques entre parenthèse indiquent la classe de protéobactérie à laquelle appartient l'espèce. Un (c) indique que la présence de l'élément du complexe Bam a été prouvée expérimentalement. Un (d) indique que la présence du composant a été déterminée soit par conservation de la localisation génétique du gène correspondant dans le cas de BamC ou par la présence de domaines conservés dans le cas de BamE.

sélectionner des mutations supprimeuses d'un défaut de perméabilité de la ME d'*E. coli* a permis d'identifier la lipoprotéine BamB comme potentiellement impliquée dans la biogénèse de la ME (Ruiz *et al.*, 2005). L'utilisation de techniques de chromatographie d'affinité a également montré que BamA formait un complexe stable avec BamB et trois autres lipoprotéines BamC, D et E (Wu *et al.*, 2005 ; Sklar *et al.*, 2007a). Un tel complexe a également été identifié chez *N. meningitidis* où il est constitué de BamA, C, D et E et de la protéine RmpM (Volokhina *et al.*, 2009). Chez *E. coli*, BamD est la seule des quatre lipoprotéines du complexe Bam à être essentielle et un mutant conditionnel *bamD* présente le même défaut d'adressage des PT β qu'un mutant conditionnel *bamA* (Wu *et al.*, 2005 ; Malinverni *et al.*, 2006). Le rôle des lipoprotéines BamB, C et E dans la biosynthèse de la ME a également été confirmé par des études génétiques. En effet, chez *E. coli*, *bamB* et *bamC* sont sous le contrôle de la réponse σ^E et des mutants pour *bamB*, C et E présentent des défauts plus ou moins marqués d'adressage des PT β et de perméabilité de la ME aux molécules toxiques (Onufryk *et al.*, 2005 ; Wu *et al.*, 2005 ; Malinverni *et al.*, 2006 ; Sklar *et al.*, 2007a).

Le complexe Bam est un complexe stable comme le montrent sa migration sous la forme d'une unique bande sur un gel non dénaturant ainsi que la possibilité de copurifier l'ensemble de ses composants (Wu *et al.*, 2005 ; Sklar *et al.*, 2007a ; Hagan *et al.*, 2010). Il est constitué d'une unique copie des protéines BamA, B, C et D et de un ou deux exemplaires de BamE, la petite taille de cette dernière empêchant de déterminer avec certitude sa stoechiométrie (Hagan *et al.*, 2010). Au sein du complexe Bam, les lipoprotéines sont organisées sous la forme de deux modules indépendamment associés à BamA, l'un comprenant BamC, D et E et l'autre comprenant uniquement BamB. En effet, BamC, D et E forment un sous complexe dont l'hétérotrimérisation précède l'interaction avec BamA. De plus, l'interaction de cet hétérotrimère avec BamA a lieu via BamD et est indépendante de BamB (Malinverni *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2007 ; Sklar *et al.*, 2007a ; Hagan *et al.*, 2010). Cette organisation du complexe Bam suggère que BamCDE et BamB pourraient jouer des rôles différents au cours de l'insertion des PT β dans la ME.

De nombreuses études structurales sur le système Bam ont grandement amélioré la compréhension de ce système. Ces études sont présentées et discutées ci-dessous pour chacun des composants du système Bam.

III.C.3 Analyse structurale

III.C.3.a BamA

La protéine BamA est constituée d'un domaine membranaire en tonneau β carboxy terminal et d'un long domaine périplasmique amino terminal. Aucune donnée structurale n'est actuellement disponible sur le tonneau β de BamA. Cependant, des informations ont pu être obtenues par homologie avec l'autotransporteur FhaC, un membre de la famille OMP85. Cette protéine possède un tonneau β constitué de 16 brins et dispose d'une longue boucle extracellulaire (L6) portant des motifs conservés dans la famille OMP85 (Figure II.16 A) (Clantin *et*

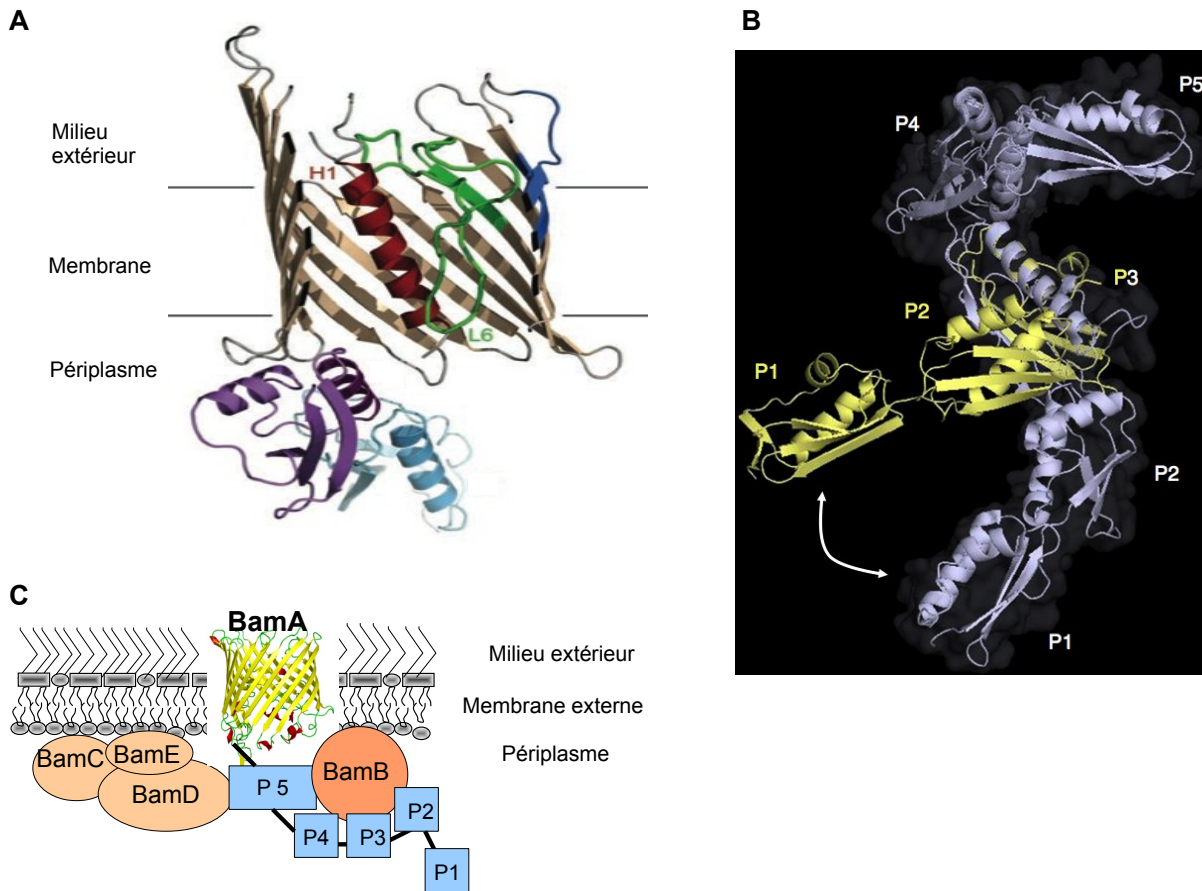


Figure II.16 : Analyse structurale de la protéine BamA.

(A) Vue de coté de la structure de FhaC de *Bordetella pertussis*, une protéine de la même famille (OMP85) que BamA. Le premier plan du tonneau β a été supprimé afin de mieux voir l'intérieur de celui ci. La boucle L6 est représentée en vert, les domaines POTRA 1 et 2 en cyan et violet respectivement. D'après Clantin *et al.*, (2007) (B) Superposition de deux structures des domaines POTRA de BamA, en jaune une structure présentant un coude entre les domaines P2 et P3 et en violet une structure où ce coude est absent. Les domaines POTRA 1 et 2 d'un coté et POTRA 3 à 5 de l'autre forment deux structures rigides séparées par un domaine flexible. D'après Ricci et Silhavy (2012) (C) Schéma représentatif de l'interaction des différents composants du système Bam avec les domaines POTRA de BamA (numérotés P1 à P5 sur le schéma). Le complexe BamCDE interagit avec le domaine POTRA 5 via BamD. BamB interagit avec les domaines POTRA 2 à 5.

al., 2007). La mutation ou la délétion de ces motifs altère fortement la fonction de FhaC (Delattre *et al.*, 2010). Cette boucle est également présente chez BamA et semble assez longue pour rejoindre le périplasma au travers du pore du tonneau β de BamA, indiquant qu'elle pourrait jouer un rôle dans l'insertion des PT β (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2009). Récemment, il a été démontré que les motifs conservés sur la boucle L6 étaient importants pour la fonction de BamA (Leonard-Rivera et Misra, 2012).

Le domaine périplasmique de BamA est constitué de cinq domaines POTRA (polypeptide translocation associated). Ces domaines POTRA numérotés de P1 à P5 depuis l'extrémité amino terminale possèdent une architecture particulière en $\beta - \alpha - \alpha - \beta - \beta$ (où β représente un brin β et α une hélice α). L'obtention de différentes structures de ces domaines montre que 1) malgré une faible conservation dans leur séquence, ces domaines ont des structures superposables 2) les domaines POTRA de BamA s'organisent en deux structures rigides (P1-P2 et P3-P4-P5) reliées par une boucle flexible (Figure II.16 B) (Kim *et al.*, 2007 ; Gatzeva-Topalova *et al.*, 2008 ; Gatzeva-Topalova *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2011).

Chez *E. coli*, la délétion d'un seul des domaines POTRA conduit à une diminution de l'efficacité de l'insertion des PT β dans la ME. Cependant, seule la structure rigide formée par les domaines P3 à P5 est essentielle à la survie de la cellule (Kim *et al.*, 2007). Des expériences de chromatographie d'affinité ont montré que le complexe BamCDE interagit avec BamA via le domaine P5 et que les domaines P2 à P5 sont nécessaires à l'interaction avec BamB (Figure II.16 C) (Kim *et al.*, 2007). Ces données montrent que les domaines POTRA de BamA sont nécessaires à la structuration du complexe et expliquent pourquoi les délétions de ces domaines affectent la fonctionnalité du complexe Bam. Cependant, il est important de noter que ces observations sur le rôle des domaines POTRA ne sont pas généralisables et qu'il existe des spécificités liées à l'espèce. En effet, il a été montré que chez *N. meningitidis* la délétion des domaines P1 à P4 n'a qu'un faible effet sur la viabilité de cette bactérie alors qu'elle est létale chez *E. coli* (Bos *et al.*, 2007b).

Les données structurales suggèrent également que BamA pourrait interagir avec ses substrats par β augmentation (type d'interaction entre brins β) au niveau de son domaine P3 (Kim *et al.*, 2007 ; Gatzeva-Topalova *et al.*, 2008). Si ces observations fournissent une explication à la façon dont BamA pourrait interagir avec les PT β , elles n'expliquent pas la spécificité de l'interaction entre les PT β et BamA. Chez *E. coli* et *N. meningitidis*, il a été suggéré que BamA pourrait reconnaître les PT β via une séquence carboxy terminale conservée spécifique à l'espèce (Tableau II.2). Cependant, ces séquences ne semblent pas être le seul facteur permettant l'interaction spécifique avec BamA puisque leur délétion n'abolit pas complètement l'adressage des PT β . De plus, ces séquences sont absentes chez certaines PT β (de Cock *et al.*, 1997 ; Robert *et al.*, 2006 ; Bos *et al.*, 2007a).

Protéines	Fonction	Distance de l'extrémité C terminale									
		10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
PT β d' <i>E. coli</i>											
PhoE	Porine	I	V	A	V	G	M	T	Y	Q	F
OmpC	Porine	I	V	A	L	G	L	V	Y	Q	F
OmpF	Porine	T	V	A	V	G	I	V	Y	Q	F
LamB	Maltoporine	T	F	G	A	Q	M	E	I	W	W
OmpT	Protéase	I	T	T	A	G	L	K	Y	T	F
PagP	Lipide A palmitoyl transférase	V	Y	F	A	W	M	R	F	Q	F
Tsx	Canal à nucléoside	G	G	Y	L	V	V	G	Y	N	F
FadL	Transporteur d'acides gras à longue chaîne	L	F	G	T	N	F	N	Y	A	F
Hbp	Autotransporteur	A	I	N	A	N	I	R	Y	S	F
Pet	Autotransporteur	A	I	N	A	N	F	R	Y	S	F
FhuA	Récepteur à sidérophore	Q	V	V	A	T	A	T	F	R	F
Séquence consensus pour les PT β de <i>E. coli</i>		X	Hy	X	Hy	X	Hy	X	Y ou Hy	X	F
PT β de <i>N. meningitidis</i>											
PorA	Porine	A	A	S	V	G	L	R	H	K	F
PorB	Porine	A	G	G	V	G	L	R	H	K	F
NspA	inconnue	E	L	S	A	G	V	R	V	K	F
Opa	Adhésine	E	V	S	L	G	M	R	Y	R	F
Opc	Adhésine	E	Y	G	L	R	V	G	I	K	F
Iga	Autotransporteur	S	G	Q	I	K	I	Q	I	R	F
App	Autotransporteur	S	A	G	I	K	L	G	Y	R	W
FrpB	Récepteur à sidérophore	D	V	R	L	G	V	N	Y	K	F
LbpA	Récepteur à lactoferrine	N	F	S	L	A	L	E	M	K	F
Séquence consensus pour les PT β de <i>N. meningitidis</i>		X	Hy	X	Hy	X	Hy	X	X	+	F

Tableau II.2 : Comparaison des séquences carboxy terminales de plusieurs protéines en tonneau β d'*E. coli* et *N. meningitidis*.

Les séquences carboxy terminales de plusieurs protéines en tonneau β d'*E. coli* et *N. meningitidis* ont été alignées et une séquence consensus a été déterminée pour chaque espèce. Dans les séquences consensus observées X définit un résidu quelconque, Hy désigne un résidu hydrophobe, + un résidu chargé positivement, Y un résidu tryptophane et F un résidu phénylalanine. D'après Robert *et al.* (2006).

III.C.3.b BamB

La structure de la lipoprotéine BamB d'*E. coli* a été déterminée par quatre groupes différents qui s'accordent tous sur le fait que BamB a une structure en hélice β (Figure II.17 A et B) (Albrecht et Zeth, 2011 ; Heuck *et al.*, 2011 ; Kim et Paetzel, 2011 ; Noinaj *et al.*, 2011). Cette hélice β est composée de 8 lames chacune constituée de 4 brins β et connectée aux lames voisines par des boucles dénommées IL (interconnecting loop). L'étude de ces structures suggère que les lames de l'hélice pourraient permettre l'interaction avec les PT β non repliées par β augmentation. Ces données montrent également que cinq résidus précédemment identifiés comme nécessaires à l'interaction avec BamA (Vuong *et al.*, 2008) sont localisés sur les IL 4 et 5 et sont regroupés au même endroit dans la structure cristalline de BamB (Figure II.17 B). De façon cohérente, des données bioinformatiques suggèrent que le domaine P3 de BamA pourrait interagir par β augmentation avec BamB au niveau de son IL4 (Noinaj *et al.*, 2011).

III.C.3.c Le sous complexe BamCDE

A ce jour, trois structures de BamD ont été obtenues : deux pour BamD d'*E. coli* et une pour BamD de *Rodothermus marinus* (Albrecht et Zeth, 2011 ; Sandoval *et al.*, 2011 ; Dong *et al.*, 2012). Chez *E. coli*, BamD est constituée de dix hélices α formant par paires 5 motifs TPR (tetraatricopeptide repeats) et chez *R. marinus*, une hélice α supplémentaire vient coiffer le motif TPR carboxy terminal (Figure II.18 A). Les motifs TPR sont connus pour servir d'échafaudage aux complexes multiprotéiques ce qui est cohérent avec le rôle de BamD dans la stabilisation du complexe Bam (Malinverni *et al.*, 2006).

La structure de la lipoprotéine BamC d'*E. coli* a été obtenue à deux reprises (Albrecht et Zeth, 2011 ; Warner *et al.*, 2011). Les deux structures montrent que BamC possède deux domaines helix grip et une région amino terminale non structurée (Figure II.18 B). La récente résolution de la structure d'un complexe entre BamD et la moitié amino terminale de BamC montre que la région non structurée de BamC interagit avec les 5 motifs TPR de BamD (Figure II.18 C) (Kim *et al.*, 2011a). Des expériences de copurification ont confirmé le rôle de la région non structurée de BamC dans l'interaction avec BamD (Webb *et al.*, 2012). Dans la même étude, les auteurs ont également montré que la partie carboxy terminale de BamC était exposée à la surface d'*E. coli*. Ces observations suggèrent que la partie amino terminale de BamC interagit dans le périplasme avec BamD tandis que la partie carboxy terminale est exposée à la surface de la cellule. Les TPR 1 et 2 de BamD forment une poche prédite pour être le lieu d'interaction avec l'extrémité carboxy terminale des PT β (Albrecht et Zeth, 2011 ; Sandoval *et al.*, 2011). Dans la structure du complexe BamCD cette poche est occupée par BamC ce qui a conduit à l'idée que BamC pourrait réguler l'interaction de BamD avec ses substrats (Kim *et al.*, 2011a). BamC n'est probablement pas le seul élément du complexe à réguler l'activité de BamD. En effet, il a été récemment suggéré que l'interaction du domaine POTRA 5 de BamA avec BamD était nécessaire au fonctionnement de BamD au sein du complexe Bam (Ricci *et al.*, 2012)

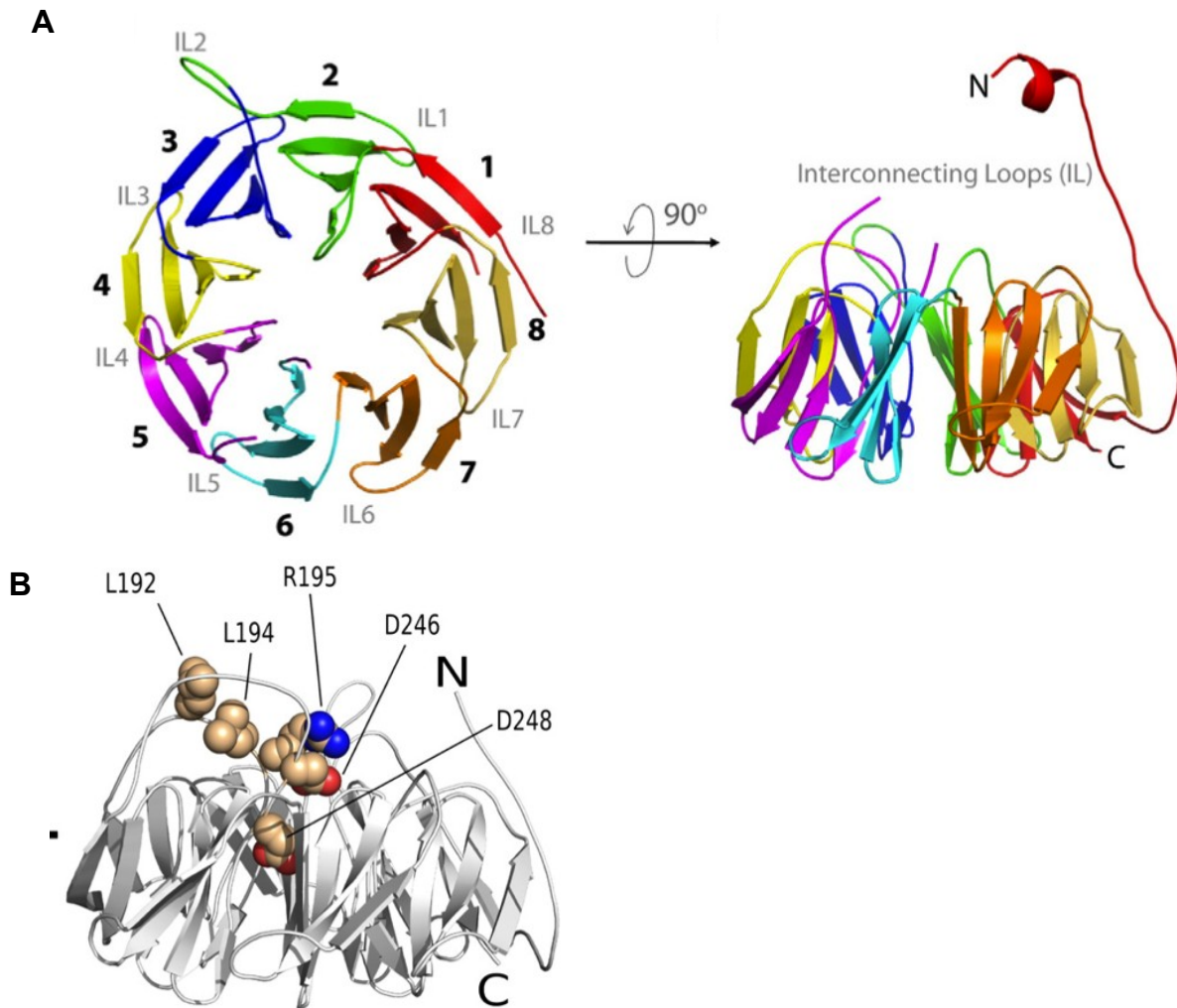


Figure II.17 : Analyse structurale de la protéine BamB d'*E. coli*.

(A) Représentation de la structure de BamB d'*E. coli* en vue de dessus (à gauche) et de côté (à droite). Les différentes lames de l'hélice β sont représentées de couleurs différentes et sont numérotées de 1 à 8 depuis l'extrémité amino terminale. Les boucles connectant les différentes lames (IL : interconnecting loop) sont numérotées de 1 à 8 depuis l'extrémité amino terminale. D'après Noinaj *et al.* (2011) (B) Représentation de la structure de BamB d'*E. coli* en vue de côté. Les résidus identifiés par Vuong *et al.* (2008) comme interagissant avec BamA sont représentés par des sphères et se regroupent dans la structure de BamB. D'après Kim et Paetzel (2011).

La structure de BamE a été résolue par trois groupes indépendants et est présentée en Figure II.18 D (Albrecht et Zeth, 2011 ; Kim *et al.*, 2011b ; Knowles *et al.*, 2011). Les travaux de Knowles *et al.* (2011) fournissent une première idée du rôle de BamE au sein du complexe Bam. Ils ont en effet montré que BamE formait un complexe ternaire avec BamD et des phosphatidylglycérols. Cette observation est particulièrement intéressante puisqu'elle suggère que BamE pourrait ancrer le complexe Bam au niveau de régions de la membrane riches en ce type de phospholipides. Or, il a été montré que ce type de phospholipides anioniques est favorable à l'insertion de PT β dans une bicouche lipidique (Patel *et al.*, 2009). De façon spéculative, il est aussi possible de lier l'interaction de BamE avec les phospholipides à sa capacité à stabiliser l'interaction de BamCDE avec BamA (Sklar *et al.*, 2007a). De récentes études génétiques ont également montré que BamE pourrait favoriser le repliement correct du tonneau β de BamA et moduler la conformation de BamA (Rigel *et al.*, 2012 ; Tellez et Misra, 2012).

III.C.4 Vers un modèle d'adressage et d'insertion des PT β dans la ME d'*E. coli* ?

La première étape de l'insertion d'une PT β dans la ME correspond à son adressage au complexe Bam. Le chaperon SurA semble être le principal facteur permettant cet adressage (Sklar *et al.*, 2007b ; Vertommen *et al.*, 2009 ; Denoncin *et al.*, 2012). Bennion *et al.* (2010) proposent que la majorité des PT β soient délivrées au complexe Bam par SurA au niveau du domaine POTRA 1 de BamA, lors d'un processus impliquant la lipoprotéine BamB (Figure II.19). Cependant, il convient de noter que l'insertion de la protéine TolC est indépendante de SurA et du domaine POTRA 1 de BamA et qu'elle est même améliorée en l'absence de BamB (Charlson *et al.*, 2006). De plus, BamA est indépendante de SurA pour son adressage au complexe Bam mais semble dépendre du domaine POTRA 1 pour sa propre insertion (Bennion *et al.*, 2010). Ces observations montrent l'existence d'autres voies permettant la livraison de certaines PT β au complexe Bam (Figure II.19). Ceci est cohérent avec le fait que seule la protéine LptD est strictement dépendante de SurA pour son adressage au complexe Bam (Vertommen *et al.*, 2009). En l'absence de SurA, Skp et DegP assurent l'adressage des PT β à la ME (Sklar *et al.*, 2007b ; Vertommen *et al.*, 2009 ; Denoncin *et al.*, 2012). Pour autant, aucune interaction entre le complexe Bam et l'un de ces deux chaperons n'a été détectée (Ricci et Silhavy, 2012) et la manière dont elles délivrent les PT β au complexe Bam reste inconnue.

Si la façon dont les PT β sont délivrées au complexe Bam commence à être cernée, la façon dont elles sont insérées dans la ME reste peu connue. Parmi les lipoprotéines du complexe Bam, BamB et BamD sont prédites pour interagir directement avec les PT β , indiquant qu'elles pourraient jouer un rôle direct dans le repliement et l'insertion de certaines PT β . (Albrecht et Zeth, 2011 ; Sandoval *et al.*, 2011 ; Ricci *et al.*, 2012). Dans le cas de BamD, ces prédictions ont été expérimentalement vérifiées par crosslink du tonneau β de l'autotransporteur EspP avec BamD (Ieva *et al.*, 2011) mais le rôle exact de BamD reste inconnu. Le fait que les lipoprotéines BamB, C et E ne soient pas essentielles à la croissance bactérienne indique qu'elles ne sont probablement

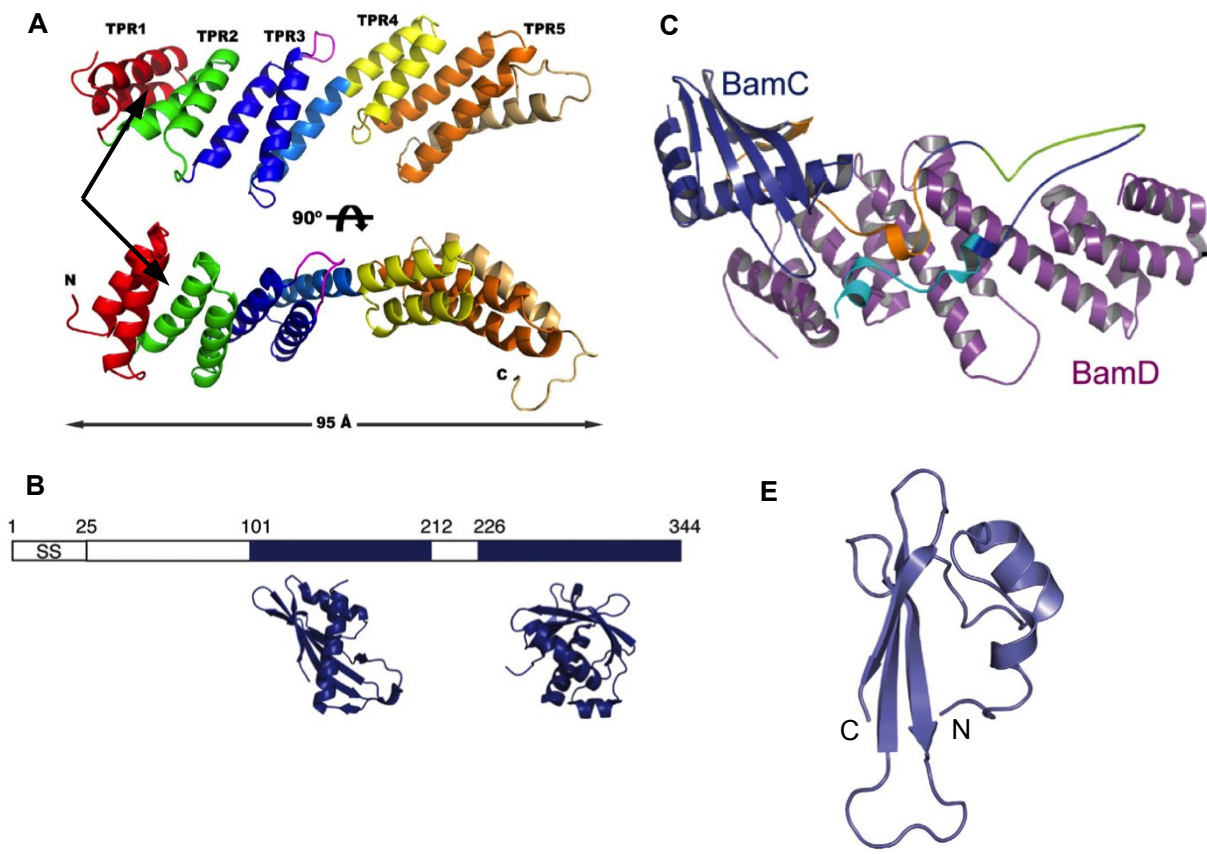


Figure II.18 : Analyse structurale du complexe BamCDE.

(A) Représentation de la structure de BamD de *Rodothermus marinus* vue de côté. Les différents motifs TPRs (constitués d'une paire d'hélices α) sont colorés de couleur différente. Dans la structure de BamD d'*E. coli*, l'hélice α carboxy terminale (représentée en saumon sur cette structure) est absente. Les flèches indiquent la position de la poche formée par les TPR1 et 2 et prédite pour interagir avec l'extrémité carboxy terminale des PT β . D'après Sandoval *et al.* (2011). (B) Représentation schématique de l'organisation de BamC d'*E. coli* et représentation des structures des domaines helix grip. Les numéros au dessus de la représentation des domaines de BamC indiquent la position des résidus dans la séquence linéaire de BamC. La région 1 à 25 correspond à la séquence signal Sec (SS) et la région 25 à 101 correspond à la région non structurée amino terminale. Les régions 101 à 212 et 226 à 344 correspondent aux deux domaines helix grips dont les structures sont présentées en dessous de chaque domaine. D'après Webb *et al.* (2012). (C) Représentation de la structure du complexe BamD BamC₍₂₈₋₂₁₃₎. BamD est représentée en violet. BamC₍₂₈₋₂₁₃₎ correspond à la forme mature de la protéine sans le domaine helix grip carboxy terminal (voir en B). Le domaine helix grip compris entre les résidus 101 et 212 est représenté en bleu. La partie non structurée de BamC interagissant avec BamB est représentée en orange, bleu, cyan et vert. D'après Webb *et al.* (2012). (D) Représentation de la structure de BamE. Les extrémités amino et carboxy terminales sont indiquées. D'après Knowles *et al.* (2011).

pas indispensables à l'insertion de toutes les PT β dans la ME. Ainsi, selon leur nature (taille, présence de longs domaines solubles...), les PT β pourraient nécessiter l'une ou l'autre de ces lipoprotéines au cours de leur insertion dans la ME.

Le fonctionnement de l'élément central du complexe Bam reste également à découvrir. En effet, s'il est admis que BamA interagit avec les PT β non repliées par β -augmentation au niveau de ses domaines POTRA (Robert *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2007 ; Knowles *et al.*, 2008), la façon dont elle assure l'insertion de la protéine dans la ME reste inconnue. Sur la base d'observations *in vitro*, il a été proposé que des tétramères de BamA puissent former des tunnels permettant le relargage des PT β repliées dans la ME (Robert *et al.*, 2006). Cependant, aucun tétramère de BamA n'a pour l'instant été observé *in vivo*. Les récents travaux sur la reconstruction du système Bam *in vitro* ont déjà montré que le processus d'insertion dans la ME était indépendant de toute source d'énergie et ils devraient permettre de mieux apprécier le rôle de chacun des composants du système dans les années à venir (Hagan *et al.*, 2010 ; Hagan et Kahne, 2011).

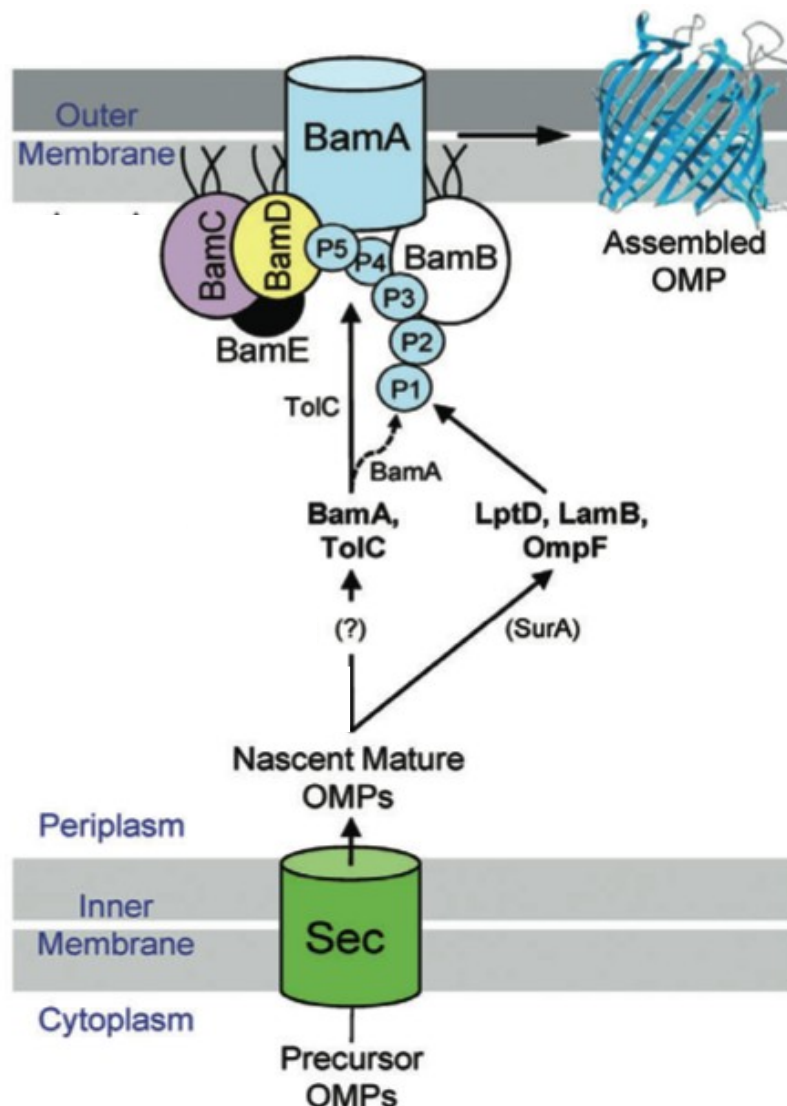


Figure II.19 : Schéma présentant un modèle d'acheminement des PT β à la membrane externe.

Les PT β sont synthétisées dans le cytoplasme sous forme de précurseurs dotés d'une séquence signal Sec. Les PT β sont exportées par le système Sec et leur séquence signal est clivée. Dans le périplasme la majorité des PT β (voie de droite sur le schéma) sont prises en charge par SurA et délivrées au système Bam au niveau du domaine POTRA 1 de BamA. Au cours d'un processus impliquant au minimum BamA et BamB, les PT β sont insérées dans la ME. Les protéines TolC et BamA sont indépendantes de SurA pour leur acheminement au système Bam (voie de gauche). La protéine TolC (trait plein) est ensuite insérée dans la ME par un processus indépendant de BamB et du domaine POTRA 1 de BamA. La protéine BamA est insérée dans la ME par un processus impliquant le domaine POTRA 1 de BamA (trait pointillé). D'après Bennion *et al.* (2010)

IV Biosynthèse des lipoprotéines

IV.A Introduction

Les lipoprotéines représentent en moyenne 1 à 3% des protéomes bactériens (Sutcliffe *et al.*, 2012) et sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires essentiels comme la biogénèse de la ME ou la synthèse du peptidoglycane (Ricci et Silhavy, 2012 ; Typas *et al.*, 2012). Il s'agit de protéines généralement solubles dont l'extrémité amino terminale est acylée et sert d'ancrage dans une membrane. Il est probable que les protéines périplasmiques diffusent dans l'intégralité du périplasme (Mullineaux *et al.*, 2006) et la présence d'une ancre lipidique pourrait donc permettre de localiser les lipoprotéines là où leur fonction est requise. De façon cohérente avec cette idée, la délétion de l'acylation amino terminale de certaines lipoprotéines n'altère pas leur fonctionnalité si en contre partie ces lipoprotéines sont produites en excès (Tsukahara *et al.*, 2009 ; Chng *et al.*, 2010).

Les lipoprotéines peuvent être associées à la MI ou à la ME. A titre d'exemple, parmi les 90 lipoprotéines codées par le génome d'*E. coli*, la grande majorité est présente dans la ME. De manière générale, les lipoprotéines présentes dans les deux membranes font face au périplasme mais certaines lipoprotéines de ME peuvent être exposées au milieu extérieur. De façon intéressante, la lipoprotéine Lpp d'*E. coli* semble avoir deux localisations cellulaires distinctes : soit à la face périplasmique de la ME soit à la face externe de la ME (Cowles *et al.*, 2011). Ainsi, l'adressage des lipoprotéines au bon compartiment cellulaire est un enjeu de taille pour la bactérie d'autant plus que lorsqu'elles sont localisées dans la mauvaise membrane, certaines lipoprotéines perdent leur fonction et peuvent devenir toxiques pour la cellule (Paradis-Bleau *et al.*, 2010).

Les lipoprotéines sont synthétisées dans le cytoplasme sous forme de précurseurs (apolipoprotéines) dotés de séquence signal Sec ou Tat. Après exportation, les lipoprotéines subissent un processus de maturation au cours duquel la séquence signal est clivée et leur extrémité amino terminale est acylée. Ce processus a pour effet d'ancrer les lipoprotéines dans la MI. La machinerie qui permet le passage de certaines lipoprotéines de la MI à la ME, le système Lol, a initialement été découverte chez *E. coli*. Les cinq protéines la constituant, LolA, B, C, D et E permettent le transfert spécifique des lipoprotéines de ME vers cette dernière. Les lipoprotéines de MI portent un signal de rétention dans la MI qui bloque leur interaction avec le système Lol et assure ainsi leur localisation dans la MI (Okuda et Tokuda, 2011).

Le système Lol est présent chez de nombreuses bactéries didermes et est essentiel à la croissance bactérienne, notamment en raison de l'importance de certaines lipoprotéines dans la biogénèse de l'enveloppe bactérienne (Paradis-Bleau *et al.*, 2010 ; Ricci et Silhavy, 2012 ; Sutcliffe *et al.*, 2012). La compréhension de son fonctionnement est donc un enjeu de taille et pourrait fournir des cibles pour de nouveaux antibiotiques. Les connaissances acquises sur le système Lol sont résumées ci-après. Dans un premier temps, les découvertes du système et de la nature du signal assurant l'adressage des lipoprotéines à la bonne membrane seront présentées. Les mécanismes moléculaires permettant le fonctionnement du système Lol seront ensuite discutés.

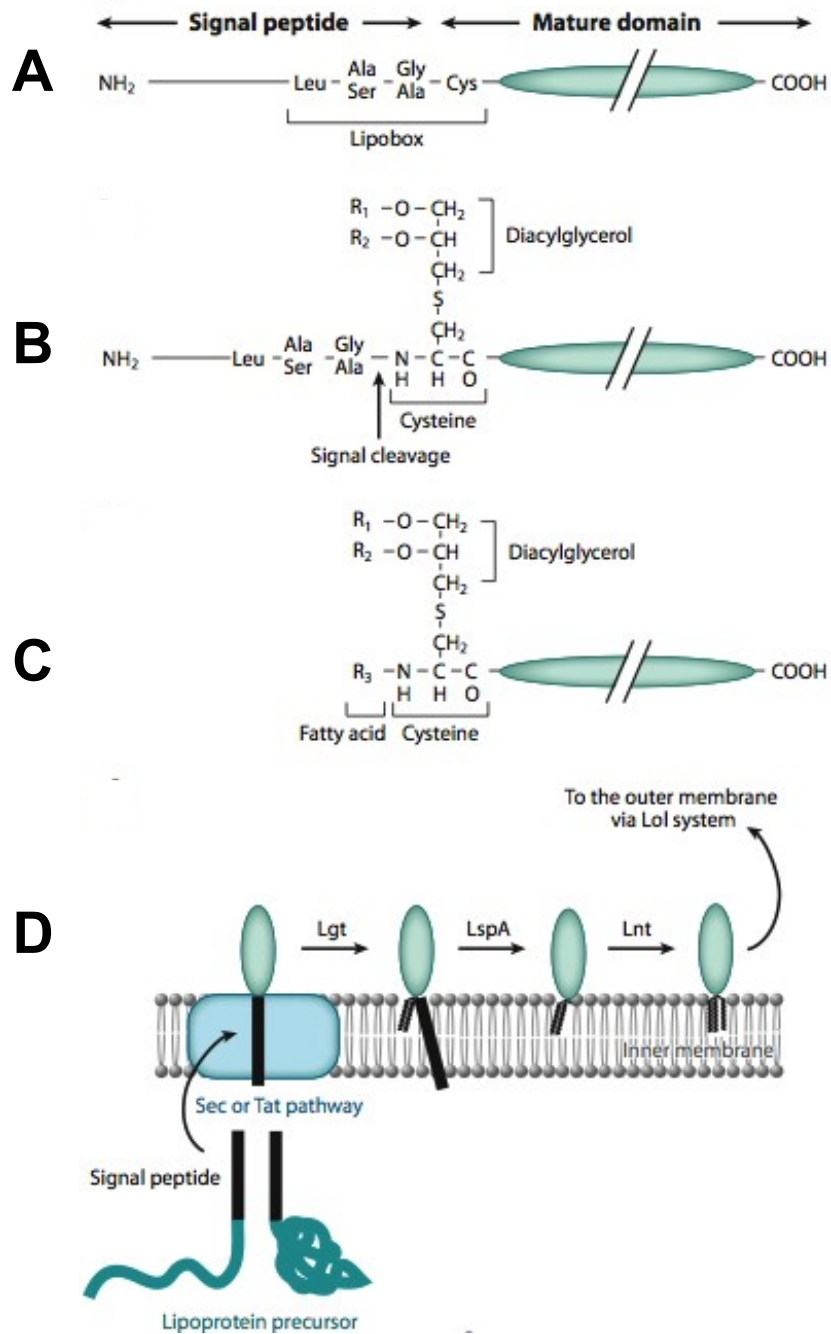


Figure II.20 : Exportation et maturation des lipoprotéines.

(A) Représentation schématique d'une apolipoprotéine et de sa Lipobox. (B) Ajout d'un diacylglycerol sur le soufre de la cystéine de la Lipobox par l'enzyme Lgt. (C) Clivage par LspA de la séquence signal en amont de la cystéine de la Lipobox. Ajout d'un acide gras au niveau de la fonction amine de la cystéine de la lipobox par l'enzyme Lnt. (D) Représentation schématique des étapes successives de l'exportation et de la maturation d'une lipoprotéine. D'après Okuda et Tokuda (2011).

IV.B Exportation et maturation des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont synthétisées dans le cytoplasme sous la forme d'apolipoprotéines. La majorité d'entre elles sont dotées d'une séquence signal Sec et seul un petit nombre dispose d'une séquence signal Tat (Gralnick *et al.*, 2006 ; Palmer et Berks, 2012). Cependant, quelle que soit leur nature, les séquences signal des apolipoprotéines possèdent un motif conservé dans leur partie carboxy terminale. Ce motif est dénommé Lipobox et se rapproche du consensus : L – A/S – G/A – C (Hayashi et Wu, 1990). Après exportation, la séquence signal est clivée au niveau de la Lipobox par la signal peptidase II LspA. Ce clivage a lieu en amont de la cystéine de la Lipobox et fait partie d'un processus de maturation de l'apolipoprotéine indispensable à l'adressage de la lipoprotéine à l'une ou l'autre des deux membranes (Figure II.20) (Fukuda *et al.*, 2002). La maturation des apolipoprotéines débute par l'action de l'enzyme Lgt (Apolipoprotéine diacylglycérol transférase) qui transfère un groupement diacylglycéryl à partir d'un phosphatidylglycérol (phospholipide) au soufre de la cystéine de la Lipobox. Ensuite, la signal peptidase II LspA clive la séquence signal en amont de la diacylglycérylcystéine +1 qui devient donc le premier acide aminé de la forme mature de la lipoprotéine. Enfin, l'enzyme Lnt (Apolipoprotéine N-Acyl transférase) achève la maturation de la lipoprotéine en catalysant l'acylation de la diacylglycérylcystéine +1 (Gupta *et al.*, 1993 ; Sankaran et Wu, 1994). Ce processus a lieu au niveau de la face périplasmique de la MI et les trois enzymes impliquées dans la maturation des lipoprotéines semblent être des protéines intégrales de MI (Daley *et al.*, 2005 ; Robichon *et al.*, 2005 ; Pailler *et al.*, 2012). Cependant, il convient de noter qu'une étude suggère que Lgt est simplement associée à la MI sans être insérée dans celle-ci (Selvan et Sankaran, 2008).

Les gènes codant pour Lgt et LspA ont été retrouvés dans les génomes de représentants de chacun des phyla bactériens pour lesquels les séquences sont disponibles, indiquant que les deux premières étapes de la maturation des lipoprotéines sont bien conservées chez les bactéries. Ces deux premières étapes sont suffisantes pour ancrer une lipoprotéine dans les membranes bactériennes ce qui pourrait expliquer pourquoi le gène codant pour Lnt, qui assure la dernière étape de la maturation des lipoprotéines, n'est pas présent dans tous les génomes bactériens (Sutcliffe *et al.*, 2012). Chez les protéobactéries, *Int* est ubiquitaire ce qui est cohérent avec le caractère obligatoire de la dernière étape de la maturation des lipoprotéines pour l'adressage des lipoprotéines à la ME de ces organismes (Fukuda *et al.*, 2002 ; Robichon *et al.*, 2005).

IV.C Le système Lol : découverte et informations générales

IV.C.1 Identification et rôle des protéines LolA et LolB

Les premiers pas vers l'identification du système Lol ont été réalisés grâce à l'étude de sphéroplastes d'*E. coli*. Partant du constat que les lipoprotéines de ME sont retenues dans la MI des sphéroplastes, Matsuyama *et al.* (1995) ont montré que l'ajout d'une fraction périplasmique sur des sphéroplastes permettait d'extraire la lipoprotéine Lpp de leur membrane. Des expériences de fractionnement du périplasme ont ensuite permis de montrer que la protéine périplasmique LolA

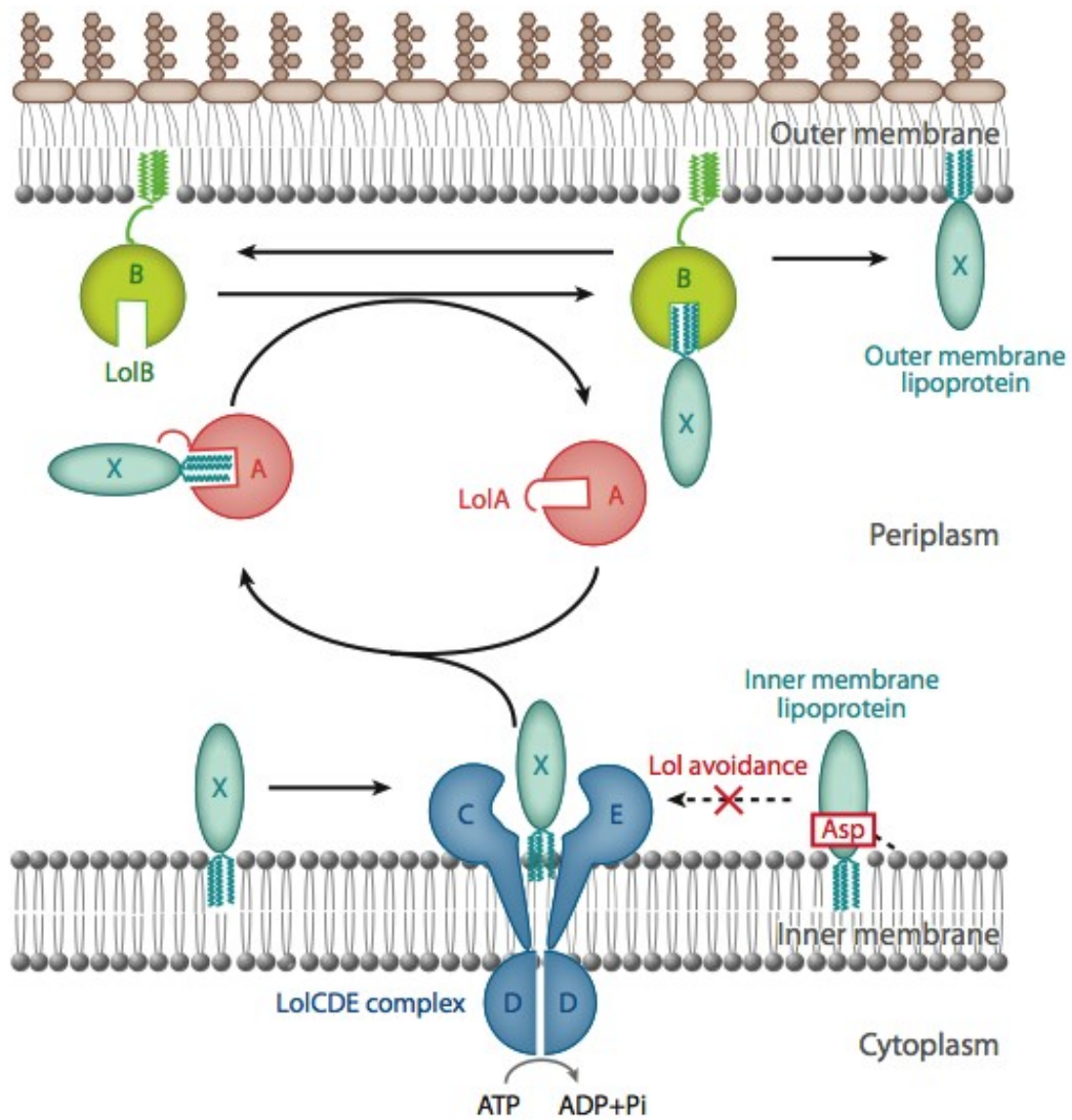


Figure II.21 : Modèle d'adressage des lipoprotéines à la membrane externe.

Les lipoprotéines de ME interagissent dans la MI avec le complexe LolCDE qui assure le transfert ATP dépendant des lipoprotéines vers LolA. LolA forme un complexe soluble avec la lipoprotéine et assure son transfert à LolB, localisée dans la ME. LolB assure ensuite l'insertion de la lipoprotéine dans la ME. Les lipoprotéines de MI n'interagissent pas avec le complexe LolCDE et restent localisées dans la MI. D'après Okuda et Tokuda (2011).

était à l'origine de ce processus en formant un complexe soluble de stoechiométrie 1:1 avec Lpp. Le rôle de LolA dans l'adressage des lipoprotéines à la ME a ensuite été confirmé par l'étude d'un mutant conditionnel *lolA* d'*E. coli* (Tajima *et al.*, 1998). Matsuyama *et al.* (1997) ont ensuite exploité le fait que l'incubation d'un complexe LolA/Lpp avec des vésicules de ME permet l'insertion de Lpp dans ces vésicules pour identifier la lipoprotéine de ME LolB comme accepteur de Lpp dans la ME. L'utilisation d'un mutant conditionnel de *lolB* a ensuite montré qu'en l'absence de LolB les lipoprotéines de ME s'accumulaient dans la MI ou dans le périplasme, complexées avec LolA (Tanaka *et al.*, 2001). Lorsque LolB est produite sans son ancre lipidique (mLolB) dans un mutant *lolB* d'*E. coli*, un haut niveau d'expression de mLolB est nécessaire à la croissance bactérienne. De plus, mLolB catalyse l'insertion de lipoprotéines à la fois dans la MI et la ME. Ces données indiquent que l'insertion des lipoprotéines dans une membrane par LolB n'est pas spécifique de la ME. Ainsi, l'ancre lipidique de LolB assure son adressage à la ME afin que LolB ne catalyse l'insertion des lipoprotéines que dans la ME (Tsukahara *et al.*, 2009).

L'ensemble de ces données montre que LolA prend en charge les lipoprotéines de ME au niveau de la MI et assure leur acheminement jusqu'à la ME ou elle les transfère à LolB qui assure leur insertion dans la ME.

IV.C.2 Identification et rôle du complexe LolCDE

Une fois insérées dans la ME par LolB, les lipoprotéines ne peuvent plus être extraites de cette dernière par LolA. Ceci indique que le processus d'extraction des lipoprotéines de la MI par LolA nécessite d'autres facteurs localisés dans la MI. De manière cohérente, le transfert des lipoprotéines depuis des vésicules de MI RSO (Right Side Out) vers LolA n'est possible qu'en présence d'ATP, indiquant qu'il existe un système couplant l'énergie disponible dans le cytoplasme sous forme d'ATP à l'extraction des lipoprotéines de la MI (Yakushi *et al.*, 1998). Partant de cette observation Yakushi *et al.* (2000) ont utilisé des protéoliposomes reconstitués à partir de différentes fractions de MI pour identifier le système LolCDE comme responsable du transfert des lipoprotéines de la MI vers la protéine périplasmique LolA en présence d'ATP. Le système membranaire LolCDE est un membre atypique de la superfamille des transporteurs ABC (ATP binding cassette) puisqu'il n'assure ni l'import ni l'export de molécules au travers de la MI. Il est constitué d'un monomère de chacune des protéines LolC et LolE ainsi que d'un homodimère de LolD (Yakushi *et al.*, 2000). LolC et LolE présentent des séquences en acides aminés similaires (27% d'identité) et sont toutes les deux des protéines intégrales de MI avec 4 TMs et un long domaine périplasmique entre les TMs 1 et 2. Pour autant, les deux protéines remplissent des fonctions différentes au sein du complexe Lol (Yasuda *et al.*, 2009). LolD est une protéine cytoplasmique dotée d'un domaine de liaison aux nucléotides et s'associe avec LolC et LolE à la face cytoplasmique de la MI.

L'ensemble de ces découvertes a permis d'établir un modèle de fonctionnement du système Lol (Figure II.21). Dans un premier temps le complexe de la membrane interne LolCDE

permet le transfert ATP dépendant des lipoprotéines ancrées dans la MI vers le chaperon périplasmique LolA. LolA forme un complexe soluble avec la lipoprotéine en masquant la partie lipidique de celle-ci, ce qui lui permet de traverser le périplasme. Enfin, LolA transfère indépendamment d'une source d'énergie la lipoprotéine au chaperon membranaire LolB qui assure enfin l'ancrage de la lipoprotéine dans la ME.

IV.C.3 Répartition phylogénétique de système Lol

Si les enzymes responsables de la maturation des lipoprotéines sont présentes de façon ubiquitaire au sein des protéobactéries, le système Lol est bien moins conservé. Ainsi, le gène codant la lipoprotéine LolB est notamment absent chez les α et ϵ protéobactéries. De la même façon, le gène codant LolE n'est présent que chez les γ protéobactéries (Narita, 2011, Sutcliffe *et al.*, 2012). Ces données montrent que malgré le rôle essentiel du système Lol dans la biogénèse de la ME, l'organisation et le fonctionnement de ce dernier peuvent fortement varier au sein des protéobactéries. Ainsi, il est probable que des mécanismes alternatifs encore non identifiés assurent l'adressage des lipoprotéines à la ME en l'absence de certains composants du système Lol.

IV.D Signal d'adressage des lipoprotéines à la ME

Si la majorité des lipoprotéines semble être présente dans la ME, certaines lipoprotéines restent dans la MI. Cette observation implique l'existence d'un signal qui adresse les lipoprotéines à la MI ou à la ME. La nature de ce signal est discutée ci-dessous.

IV.D.1 Identification d'un signal de rétention des lipoprotéines dans la MI chez *E. coli*.

IV.D.1.a La règle du +2

Les premiers travaux pour l'identification du signal qui permet l'adressage des lipoprotéines à la bonne membrane ont été réalisés chez *E. coli*. Yamaguchi *et al.* (1988) ont utilisé des lipoprotéines chimériques pour montrer que la substitution de l'acide aminé +2 (juste après la cystéine de la lipobox ou cystéine +1) par un aspartate dans des lipoprotéines de ME était responsable de la localisation de ces lipoprotéines dans la MI. Les auteurs ont également montré que le remplacement de l'aspartate +2 d'une lipoprotéine de MI par une sérine entraînait un adressage de cette lipoprotéine à la ME. Une étude ultérieure a montré que la présence d'un glutamate en position +2 ne suffisait pas à la localisation de lipoprotéines chimériques dans la MI, indiquant qu'une charge négative en position +2 n'est pas suffisante à la localisation des lipoprotéines dans la MI. De plus, cette étude a montré que lorsque l'acide aminé en position +3 était une lysine ou une histidine, la présence d'un aspartate en position +2 ne suffisait plus à localiser les lipoprotéines dans la MI (Gennity et Inouye, 1991). L'importance de la nature de l'acide aminé en position +3 a ensuite été confirmée par Terada *et al.* (2001) qui ont

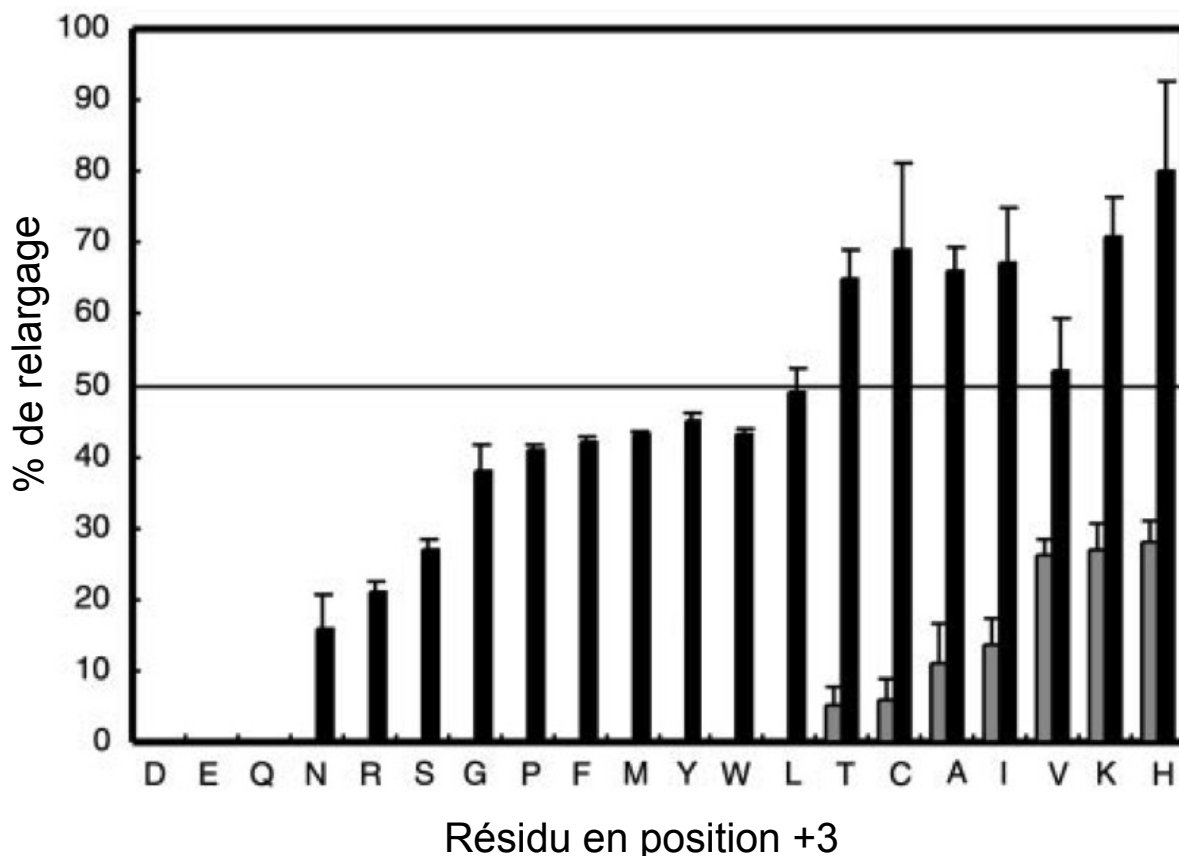


Figure II.22 : Analyse du signal de rétention des lipoprotéines dans la membrane interne d'*E. coli*.

Des protéoliposomes contenant LolCDE et un dérivé de Lpp avec un aspartate en position +2 et un des 20 acides aminés en position +3 ont été incubés avec de l'ATP et 2 (barres grises) ou 20 (barres noires) µg/mL de LolA. Le % de transfert des différents dérivés à LolA a été déterminé et reporté sur le graphique. D'après Terada *et al.* (2001).

systématiquement testé la combinaison d'un aspartate +2 avec chacun des 20 acides aminés en +3 (Figure II.22). Les auteurs en ont conclu que la présence d'un aspartate en +2 a tendance à localiser les lipoprotéines dans la MI mais que la nature du résidu en +3 influence fortement ce processus. Ils ont également montré que les combinaisons d'un aspartate en position +2 et d'un aspartate, un glutamate ou une glutamine en position +3 constituent les signaux les plus forts pour la rétention des lipoprotéines dans la MI. L'utilisation de la lipoprotéine Pal dont la sérine +2 a été substituée par une cystéine a montré qu'ajouter chimiquement une charge négative sur la cystéine +2 ne causait la rétention de Pal dans la MI que lorsque la distance entre la charge négative ajoutée et le carbone α de la cystéine était similaire à celle observée pour un aspartate (Hara *et al.*, 2003). Cette observation explique pourquoi un aspartate en +2 cause une localisation des lipoprotéines dans la MI alors qu'un glutamate n'a pas cet effet. Il convient de noter que certaines lipoprotéines de MI ne disposent pas d'un aspartate en +2. C'est notamment le cas de la lipoprotéine AcrE dont les résidus en position +2 et +3 sont respectivement une asparagine et un aspartate. De façon cohérente, Seydel *et al.* (1999) ont montré qu'une phénylalanine, un tryptophane, une tyrosine, une glycine ou une proline pouvaient localiser une lipoprotéine dans la MI. Cependant, ces résidus sont rares en position +2 dans les lipoprotéines natives de *E. coli*.

IV.D.1.b La notion de signal de rétention.

Des expériences de transfert de lipoprotéines de ME à partir de protéoliposomes vers LolA en présence d'ATP ont montré que le transfert d'une lipoprotéine de ME donnée était inhibé en présence d'un large excès d'une autre lipoprotéine de ME mais pas en présence d'un excès de lipoprotéine de MI. Ces résultats indiquent que les lipoprotéines de MI n'entrent pas en compétition avec les lipoprotéines de ME pour l'interaction avec LolCDE. Cette étude montre également que, dans des protéoliposomes, les lipoprotéines de ME activent l'activité ATPasique de LolCDE alors que les lipoprotéines de MI en sont incapables (Masuda *et al.*, 2002). Ces observations ont conduit à l'idée selon laquelle la présence d'un aspartate en position +2 diminue l'affinité des lipoprotéines pour le système LolCDE et conduit ainsi à leur maintien dans la MI. Cette idée a été renforcée par l'identification de mutants du système LolCDE qui adressent les lipoprotéines de MI à la ME (Narita *et al.*, 2003 ; Sakamoto *et al.*, 2010). Ces études montrent également que LolA et LolB peuvent interagir normalement avec les lipoprotéines dotées d'un aspartate en position +2, montrant que l'aspartate +2 localise les lipoprotéines dans la MI uniquement en bloquant l'interaction de ces dernières avec LolCDE. Ces observations, ajoutées au fait que la majorité des lipoprotéines d'*E. coli* sont localisées dans la ME, ont conduit à l'idée que les lipoprotéines étaient localisées par défaut dans la ME et que les lipoprotéines de MI disposaient d'un signal de rétention dans la MI, souvent sous la forme d'un aspartate en +2.

IV.D.1.c Autres facteurs influençant l'adressage des lipoprotéines

Outre les règles énoncées ci-dessus, plusieurs facteurs ont été décrits comme influençant l'adressage des lipoprotéines à l'une ou l'autre des membranes d'*E. coli*.

La dernière étape de la maturation des lipoprotéines, catalysée par Lnt, est absente dans de nombreuses bactéries monodermes (Sutcliffe *et al.*, 2012). Par conséquent, il a longtemps été considéré que les lipoprotéines de MI n'étaient pas modifiées par Lnt. Cependant, Fukuda *et al.*, (2002) ont montré que Lnt permettait l'acylation des lipoprotéines de MI comme de ME. De plus, ils ont montré que cette étape de la maturation des lipoprotéines était indispensable pour que les lipoprotéines de ME puissent interagir avec LolCDE. De façon cohérente un mutant d'*E. coli* pour *lnt* n'est pas viable. Cependant, de récents travaux ont montré que la surproduction de LolCDE permettait la croissance de mutants *lnt*, indiquant que l'acylation des lipoprotéines par Lnt augmente l'affinité de ces dernières pour le complexe LolCDE (Narita et Nokuda, 2011).

Chez *E. coli* la composition des membranes en phospholipides est de 70 à 75% de phosphatidyléthanolamine (PE), 20 à 25% de phosphatidylglycérol et d'environ 5% de cardiolipine (CL). La reconstruction de protéoliposomes avec différentes compositions en phospholipides a montré que le PE était indispensable à la rétention des lipoprotéines de MI. Il a également été déterminé que la phosphatidylcholine pouvait remplacer le PE pour cette fonction. Ces deux types de phospholipides sont chargés positivement et il est possible que l'association de la charge négative de l'aspartate +2 et de la charge positive des phospholipides soit nécessaire au blocage de l'interaction entre les lipoprotéines de MI et le complexe LolCDE. Au contraire, la CL stimule l'activité de LolCDE et favorise le relargage de lipoprotéines de MI (Miyamoto et Tokuda, 2007). Ainsi, les différents phospholipides ont des effets différents sur l'adressage des lipoprotéines et un équilibre précis dans la composition en phospholipides de la MI est important pour un adressage correct des lipoprotéines.

IV.D.2 Le signal de rétention dans les autres protéobactéries.

La nature du signal de rétention des lipoprotéines dans la MI a également été étudiée chez d'autres bactéries. Lewenza *et al.* (2006) ont montré que le signal de rétention des lipoprotéines est conservé pour plusieurs espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* (γ -protéobactéries). Cependant, ces règles ne semblent pas être universelles. La lipoprotéine MexA de *Pseudomonas aeruginosa* est ancrée dans la MI et possède une glycine et une lysine respectivement en position +2 et +3. Une étude a montré que chez cet organisme le signal de rétention des lipoprotéines dans la MI résidait majoritairement dans la nature des acides aminés +3 et +4 (lysine et serine étant respectivement les plus efficaces), contredisant ainsi les règles établies chez *E. coli* (Narita et Tokuda, 2007). Cependant, un aspartate en position +2 constitue également un signal de rétention à la MI chez cet organisme. Il est intéressant de noter que des lipoprotéines dotées de lysines et serines en position +3 et +4 sont transférées à LolA à partir d'un protéoliposome doté d'un complexe LolCDE de *P. aeruginosa* mais pas à partir d'un protéoliposome doté d'un complexe

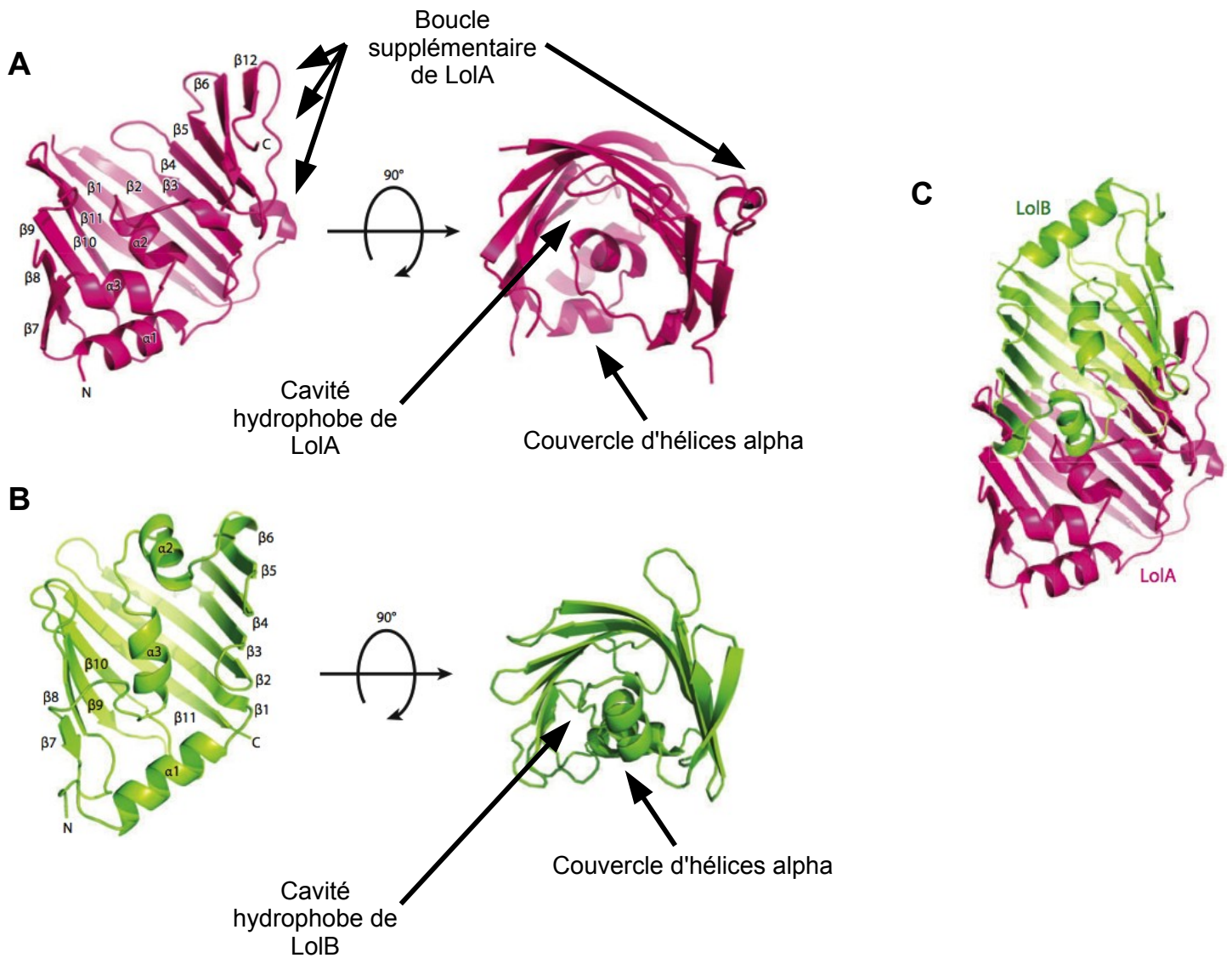


Figure II.23 : Analyse structurale des protéines LolA et LolB.

Représentation de côté (gauche) et de dessus (droite) de la structure de LolA d'*E. coli*. Les brins β sont numérotés de 1 à 12 depuis l'extrémité amino terminale. Les brins β 1 à 11 constituent un tonneau β non complet. Ce tonneau β est fermé par un couvercle constitué des hélices α 1 à 3. Le tonneau β non fermé et le couvercle d'hélices α délimitent une cavité hydrophobe qui accueille l'extrémité amino terminale acylée des lipoprotéines. Le brin β 12 et l'hélice α carboxy terminale forment une boucle absente dans la structure de LolB. (B) Représentation de côté (gauche) et de dessus (droite) de la structure de LolB d'*E. coli*. Les brins β sont numérotés de 1 à 11 depuis l'extrémité amino terminale et forment un tonneau β non complet. Ce tonneau β est fermé par un couvercle constitué des hélices α 1 à 3. Le tonneau β non fermé et le couvercle d'hélices α délimitent une cavité hydrophobe qui accueille l'extrémité amino terminale acylée des lipoprotéines. (C) Modèle d'interaction « bouche à bouche » de LolA et LolB. Les deux protéines interagissent au niveau de l'entrée de leur cavité hydrophobe pour constituer un environnement hydrophobe favorable au transfert des lipoprotéines de LolA vers LolB. D'après Okuda et Tokuda (2011).

LoICDE d'*E. coli*. Ces données montrent clairement le rôle du complexe LoICDE dans la spécificité inter-espèce du signal de rétention des lipoprotéines dans la MI (Tanaka *et al.*, 2007).

IV.E Mécanismes de fonctionnement du système Lol

IV.E.1 Le bouche à bouche des lipoprotéines LolA et LolB

Les structures des lipoprotéines LolA et LolB montrent que, malgré de fortes différences de séquence, ces deux protéines adoptent un repliement semblable (Takeda *et al.*, 2003). Les deux protéines possèdent 11 brins β formant un tonneau β incomplet qui est fermé par un couvercle formé de trois hélices α (Figure II.23 A et B). Le tonneau β incomplet et le couvercle d'hélices α délimitent une cavité hydrophobe qui semble suffisamment grande pour accueillir l'extrémité amino terminale acylée des lipoprotéines (Okuda et Tokuda, 2009 ; Okuda et Tokuda, 2011). Malgré ces similarités, LolA et LolB présentent quelques différences structurales importantes pour leur fonction. Les résidus présents dans la cavité hydrophobe de LolA sont majoritairement des acides aminés aromatiques alors que ceux présents dans la cavité de LolB sont majoritairement des leucines et isoleucines, suggérant que l'affinité de LolB pour l'extrémité amino terminale acylée des lipoprotéines est plus forte que celle de LolA. Cette différence d'affinité a été vérifiée expérimentalement par le fait que la présence d'une forte concentration de LolA libre n'entrave en rien le transfert de la lipoprotéine Pal de LolA vers LolB (Watanabe *et al.*, 2007). La découverte d'un variant de LolA (LolAR43L) pour lequel les complexes LolA – lipoprotéines s'accumulent dans le périplasme a permis d'identifier une autre particularité de LolA importante pour sa fonction. En effet, la substitution de l'arginine 43 de LolA en leucine (LolAR43L) conduit à une plus forte affinité de LolA pour l'extrémité amino terminale acylée des lipoprotéines et à un défaut de transfert des lipoprotéines à LolB (Miyamoto *et al.*, 2001 ; Taniguchi *et al.*, 2005). Dans la structure de LolA, l'arginine 43 (brin β 2) de LolA établit des liaisons hydrogènes avec les hélices α du couvercle et ferme ainsi la cavité hydrophobe de LolA (Takeda *et al.*, 2003). L'obtention de la structure de LolAR43L a montré que LolA pouvait exister sous deux formes : une dite ouverte dans laquelle la cavité hydrophobe de LolA est ouverte sur le milieu extérieur et une fermée dans laquelle l'accès à la cavité est bloquée par les interactions entre l'arginine 43 et les hélices α du couvercle. Ce passage d'une conformation ouverte à une conformation fermée (et *vice-versa*) est indispensable à la fonction de LolA et il a été montré que la cavité de LolA s'ouvrait au moment de l'interaction avec la lipoprotéine et se fermait après transfert de la lipoprotéine vers LolB (Oguchi *et al.*, 2008 ; Watanabe *et al.*, 2008 ; Tao *et al.*, 2010b). Une dernière différence importante dans les structures de LolA et LolB réside dans la présence chez LolA d'une boucle supplémentaire formée d'un douzième brin β et d'une courte hélice α (Figure II.23 A). Cette boucle prévient le transfert des lipoprotéines depuis LolA vers la MI en inhibant l'interaction entre LolA et les phospholipides (Okuda *et al.*, 2008).

L'ensemble de ces données a permis d'avancer une hypothèse expliquant comment les lipoprotéines pouvaient être transférées de LolA vers LolB de façon indépendante de toute source

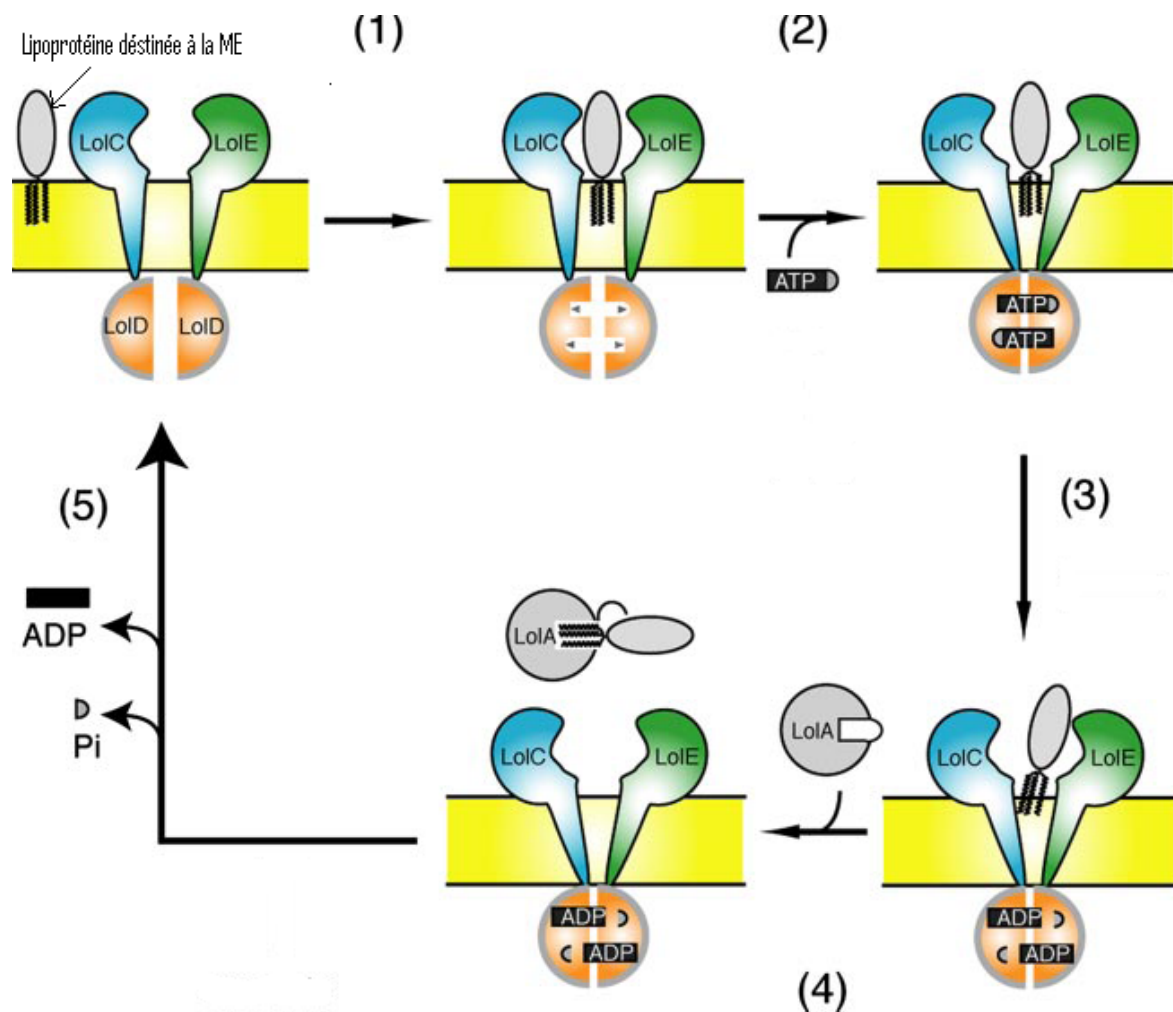


Figure II.24 : Cycle du transfert d'une lipoprotéine depuis la membrane cytoplasmique vers LolA par le système LolCDE.

(1) La lipoprotéine ne portant pas de signal de rétention dans la MI est prise en charge par LolC et LolE. Cette liaison induit un changement de conformation des sous unités LolD qui augmente leur affinité pour l'ATP. (2) La liaison de deux molécules d'ATP aux sous unités LolD conduit à une diminution de l'affinité de LolC et LolE pour la lipoprotéine. (3) L'affinité de LolC et LolE pour la lipoprotéine est encore diminuée par l'hydrolyse des deux molécules d'ATP. (4) La lipoprotéine est transférée au chaperon périplasmique LolA. (5) Les phosphates inorganiques puis les ADP sont relâchés des sous unités LolD et le système LolCDE retrouve son état initial. D'après Taniguchi *et al.* (2008).

d'énergie. En effet, l'affinité de LolB pour l'extrémité amino terminale acylée des lipoprotéines est plus forte que celle de LolA pour ces dernières. Le transfert des lipoprotéines de LolA vers LolB est donc un processus thermodynamiquement favorable et est probablement aidé par le passage de LolA d'une conformation ouverte à fermée. De manière cohérente, des expériences de RMN et de cross link montrent que LolA et LolB interagissent au niveau de l'entrée de leur cavité hydrophobe (Figure II.23 C) (Nakada *et al.*, 2009 ; Okuda et Tokuda, 2009). Cette interaction crée un environnement hydrophobe propice au transfert de l'extrémité amino terminale acylée des lipoprotéines de LolA vers LolB, la forte affinité de LolB pour l'extrémité amino terminale acylée des lipoprotéines servant de moteur au transfert. En revanche, la façon dont LolB assure l'insertion de l'extrémité amino terminale des lipoprotéines dans la ME reste inconnue.

IV.E.2 Le fonctionnement du complexe LolCDE

Un élégant modèle de fonctionnement du complexe LolCDE a été récemment proposé. Tirant parti du fait que le complexe LolCDE-lipoprotéine peut être purifié, Taniguchi et Tokuda (2008) ont utilisé différents mutants de LolCDE ainsi que différents inhibiteurs ou activateurs de son activité pour déterminer *in vitro* l'ordre des événements moléculaires intervenant dans le cycle de transfert des lipoprotéines depuis la membrane cytoplasmique vers la protéine LolA (Figure II.24). La liaison spécifique d'une lipoprotéine destinée à la ME aux sous unités LolC et LolE entraîne la liaison de deux molécules d'ATP à l'homodimère LolD. Cette liaison entraîne en retour une diminution de l'affinité de LolC et LolE pour la lipoprotéine. Ce phénomène est accentué par l'hydrolyse des deux ATP par LolD. Toutes ces étapes semblent être indépendantes de LolA puisqu'elles se déroulent *in vitro* en son absence. L'ajout de LolA à ce point du cycle permet le transfert de la lipoprotéine de LolCDE vers LolA. Ce transfert est suivi de la libération du phosphate inorganique puis de l'ADP ce qui permet la régénération du complexe LolCDE.

Ce modèle peut être complété par différentes études. Des expériences de cross link *in vivo* ont montré que LolA interagit avec LolC mais pas avec LolE (Okuda et Tokuda, 2009). Il a également été montré que LolE mais pas LolC interagit avec les lipoprotéines (Okuda et Tokuda, 2011). Ceci suggère que LolC sert d'échafaudage pour amener LolA à proximité du complexe LolE-lipoprotéines. Cette idée est appuyée par l'observation qu'un complexe LolDE reste fonctionnel *in vitro* (Kanamaru *et al.*, 2007). De façon intéressante, les domaines périplasmiques de LolC et LolE présentent des séquences comparables à celles de LolA et LolB indiquant qu'elles pourraient avoir le même type de repliement. De plus, LolA interagit avec LolC au niveau de l'entrée de sa cavité hydrophobe (Okuda et Tokuda, 2009). Il est donc possible que le transfert de la lipoprotéine de LolE vers LolA soit réalisé selon un modèle bouche à bouche proche de celui du transfert des lipoprotéines de LolA vers LolB.

V Protéines atypiques de membrane externe

V.A Introduction

Ces dernières années les travaux intensifs sur la biogénèse des protéines de la ME des protéobactéries ont permis de mettre en évidence deux principales voies d'adressage des protéines à la ME. Le système Lol assure l'adressage à la ME des lipoprotéines et la combinaison des chaperons périplasmiques SurA, Skp et DegP et du système Bam assure l'adressage et l'insertion des PT β (Ricci et Silhavy, 2012). Cependant, de nombreux travaux soulignent également l'existence de PT β ou de lipoprotéines dotées de caractéristiques particulières ainsi que de protéines associées à la ME par d'autres structures qu'une acylation amino terminale ou un repliement en tonneau β (Dong *et al.*, 2006 ; Ferrandez et Condemine, 2008 ; Douzi *et al.*, 2012 ; Reusch, 2012). Ces structures et/ou les voies d'adressage permettant *in fine* l'insertion de ces protéines dans la ME restent mal connues. Ce paragraphe se propose de présenter quelques exemples de protéines de ME dotées d'une structure atypique ou de particularités dans leur voie d'adressage.

V.B Modification post traductionnelle d'une PT β

La PT β OmpA est une protéine majeure de ME chez *E. coli* (environ 100 000 copies par cellule) et remplit de nombreuses fonctions comme maintenir la forme de la cellule ou participer à la formation de biofilms. OmpA a été décrite comme constituée d'un domaine amino terminal formant un tonneau β (8 brins β) dans la ME et d'un domaine carboxy terminal périplasmique qui s'associe avec le peptidoglycane. Cependant, d'autres études contradictoires montrent que OmpA peut également former dans la ME un large tonneau β constitué à la fois des domaines amino et carboxy terminaux (Reusch, 2012).

OmpA dépend de SurA, Skp et du complexe Bam pour son adressage et son insertion dans la ME (Reusch, 2012). Cependant, l'insertion de OmpA dans la ME nécessite également certaines modifications post traductionnelles. En effet, il a été démontré que dans le cytoplasme des molécules de oligo-(R)-3-hydroxybutyrate (OHB) étaient ajoutées de façon covalente aux sérines d'un motif SLGVSYRF situé dans la partie amino terminale de OmpA (résidues 163 à 171) (Xian *et al.*, 2007). La délétion de ce motif (dénommé sorting signal) ou la substitution des sérines 163 et 167 en glycine altère l'insertion de OmpA dans une membrane lipidique indiquant que l'ajout de OHB à OmpA est nécessaire à son insertion dans la ME (Klose *et al.*, 1988 ; Negoda *et al.*, 2010a). De la même façon, il a été montré qu'un ajout de OHB au segment carboxy terminal de OmpA (résidues 264 à 325) avait lieu dans le périplasma (Negoda *et al.*, 2010b). Les OHB sont des molécules amphipathiques constituées d'une alternance de groupements méthyles hydrophobes et de groupements esters polaires. De ce fait, ces molécules peuvent altérer la solubilité des protéines en créant une surface hydrophobe sur des peptides polaires. Ainsi, il est

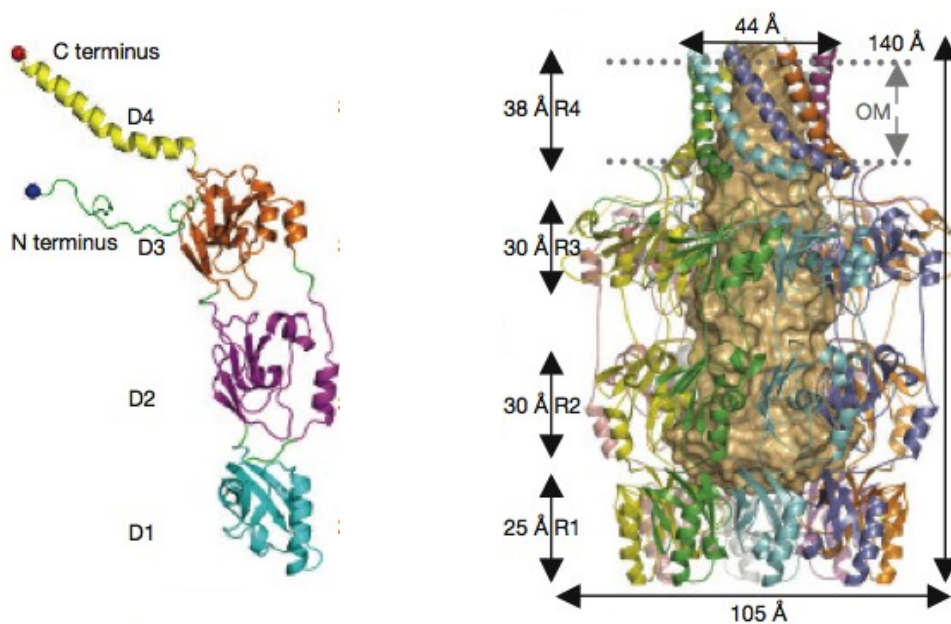


Figure II.25 : Structure de la lipoprotéine Wza d'*E. coli*.

Structure d'un monomère (à gauche) et d'un octamère (à droite) de Wza. Dans la structure du monomère les 4 domaines de Wza (D1 à D4) sont indiqués d'une couleur différente. L'extrémité amino terminale acylée est indiquée par une boule bleue et l'extrémité carboxy terminale par une boule rouge. Dans la structure de l'octamère chaque monomère est indiqué d'une couleur différente. L'octamère est constitué de 4 anneaux R1 à R4 constitués par les domaines correspondants des huit monomères (D1 à D4). Les 4 anneaux délimitent une cavité centrale représentée en marron. L'octamère forme dans la membrane externe (indiquée comme OM) un tonneau d'hélices α (R4). D'après Dong *et al.* (2006).

possible que l'ajout de OHB à OmpA favorise son insertion dans la ME en augmentant l'hydrophobicité de la protéine (Reusch, 2012).

Si chez *E. coli* l'ajout de OHB à OmpA semble être important pour son insertion dans la ME, l'homologue de OmpA chez *P. aeruginosa*, OrpF, ne semble pas dépendre d'un tel mécanisme pour son insertion dans la ME. Ainsi, il est actuellement difficile de déterminer si une telle modification post traductionnelle est spécifique de OmpA ou si plusieurs PT β dépendent de ce mécanisme (Reusch, 2012).

V.C Cas des lipoprotéines Wza et PelC

La lipoprotéine Wza d'*E. coli* est une protéine de la famille OMA (Outer Membrane Auxiliary) qui est impliquée dans la sécrétion d'exopolysaccharides. Wza est une lipoprotéine de la ME qui assure la sécrétion des exopolysaccharides au travers d'un pore constitué par 8 unités de Wza qui forment un tonneau d'hélices α dans la ME (Dong *et al.*, 2006). Dans cette structure particulière, les hélices α amphipathiques carboxy terminales de chacune des unités de Wza s'assemblent pour former un tonneau exposant les résidus hydrophobes à l'extérieur et les résidus hydrophiles à l'intérieur (Figure II.25). Une telle structure a également été proposée pour la lipoprotéine PelC de *P. aeruginosa* (Kowalska *et al.*, 2010) ainsi que pour d'autres protéines de ME comme certaines sécrétines (Collins et Derrick, 2007).

La présence d'hélices α dans la ME peut paraître surprenante puisque des hélices α hydrophobes constituent de forts signaux de rétention des protéines dans la MI. Cependant, dans le cas de Wza et PelC, les hélices α sont amphipathiques et la surface hydrophobe nécessaire à l'insertion dans la ME n'est formée qu'au moment de l'oligomérisation (Dong *et al.*, 2006 ; Kowalska *et al.*, 2010).

L'existence de protéines insérées dans la ME par un tonneau d'hélices α soulève la question de leur adressage et du mécanisme permettant l'insertion de ces protéines dans la ME. Une étude sur PelC montre que l'acylation de son extrémité amino terminale est nécessaire à son insertion dans la ME (Vasseur *et al.*, 2007). En revanche, la façon dont le tonneau d'hélices α est formé et inséré dans la ME reste inconnue à ce jour.

V.D Sécrétines

Les sécrétines appartiennent à une famille de protéines de ME qui a été impliquée dans le fonctionnement des systèmes de sécrétion de type II, III et IV et des systèmes d'assemblage des phages filamenteux. Ces protéines ont une organisation bipartite avec un long domaine amino terminal périplasmique et un domaine carboxy terminal membranaire (Douzi *et al.*, 2012). Une structure de faible résolution de la sécrétine EspD_Q du système de sécrétion de type II de *Vibrio cholerae* montre que EspD_Q s'oligomérisent pour former un pore dans la ME qui permet la sécrétion des substrats (Figure II.26 A et B) (Reichow *et al.*, 2010). En revanche, la résolution de cette structure n'est pas assez précise pour identifier le type de structure qui permet l'ancrage de la

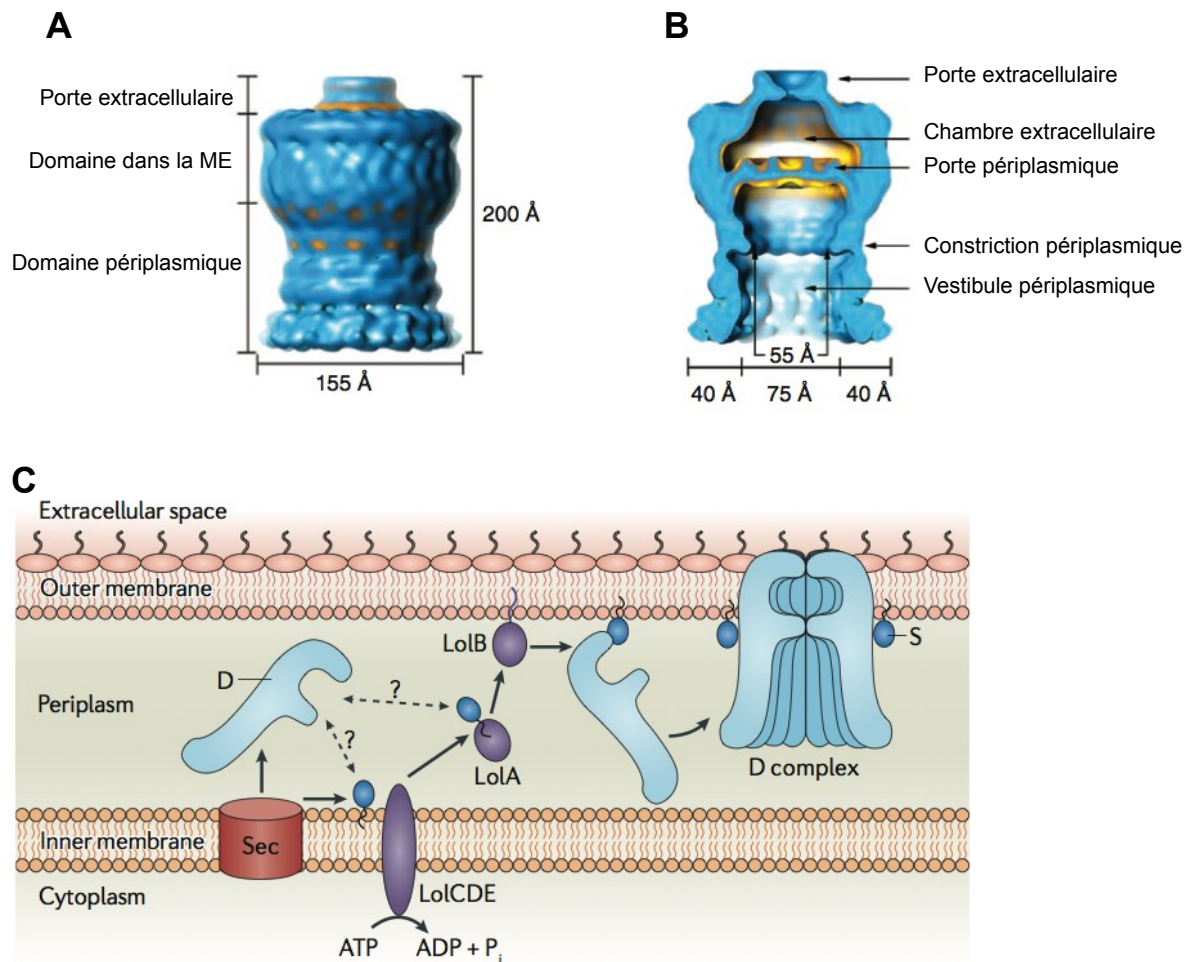


Figure II.26 : Structure et adressage des sécrétines du système de sécrétion de type II.

(A) Vue de coté de la reconstruction tridimensionnelle de la structure d'un dodécamère de la sécrétine EspD_Q du système de sécrétion de type II de *Vibrio cholerae*. La structure est déduite d'observation de cryomicroscopie électronique. D'après Reichow *et al.* (2010) (B) Coupe longitudinale de la reconstruction tridimensionnelle de la structure d'un dodécamère de la sécrétine EspD_Q du système de sécrétion de type II de *V. cholerae*. Cette coupe permet de voir la chambre extracellulaire, la porte périplasmique, le site de constriction et le vestibule périplasmique. D'après Reichow *et al.* (2010) (C) Adressage à la membrane externe des sécrétines pilotine dépendantes. La sécrétine (en bleu clair) est exportée dans le périplasm par le système Sec. La pilotine (en bleu foncé) est adressée à la ME par le système Lol. La pilotine interagit avec la sécrétine pour assurer son insertion et sa multimérisation dans la ME. Le moment exact de l'interaction de la pilotine avec la sécrétine reste inconnu. Il est possible que la sécrétine interagisse avec la pilotine lorsque celle-ci est localisée dans la MI, dès lors le complexe pilotine-sécrétine est adressé à la ME par LolA. Une autre possibilité est que la pilotine interagisse avec la sécrétine uniquement une fois localisée dans la ME. D'après Korotkov *et al.* (2012).

partie carboxy terminale des sécrétines dans la ME. Il a été montré que l'insertion dans la ME de la sécrétine PulD de *Klebsiella oxytoca* est indépendante de BamA, suggérant que PulD pourrait ne pas être insérée dans la ME par une structure en tonneau β (Collin *et al.*, 2007). De façon cohérente, des observations de microscopie électronique suggèrent que Wza et la sécrétine PilQ de *Neisseria meningitidis* adoptent une organisation similaire dans la ME (Collins et Derrick, 2007). Ainsi, la structure qu'adopte la partie carboxy terminale des sécrétines dans la ME reste inconnue et une structure atypique comme le tonneau d'hélices α décrit pour Wza ne peut être exclue.

L'adressage des sécrétines à la ME présente également certaines particularités qui les différencient des lipoprotéines ou des PT β de ME. En effet, si toutes les sécrétines sont exportées dans le périplasme par le système Sec, la façon dont les sécrétines sont ensuite adressées à la ME dépend de la sécrétine considérée. Ainsi, l'adressage à la ME de certaines sécrétines de systèmes de sécrétion de type II dépend de lipoprotéines de ME dénommées pilotines. C'est notamment le cas des sécrétines OutD, PulD et GspD β de *D. dadantii*, *K. oxytoca* et *E. coli* dont l'adressage à la ME dépend respectivement des pilotines OutS, PulS et GspS β (Hardie *et al.*, 1996 ; Shevchik *et al.*, 1997 ; Strozen *et al.*, 2012). En l'absence de leur pilotine respective PulD et GspD β sont localisées dans la MI et OutD est fortement dégradée. Il a également été montré que OutS se liait à OutD au niveau de son extrémité carboxy terminale et permettait le repliement de cette région sous la forme d'une hélice α (Gu *et al.*, 2012). Ainsi, les pilotines semblent exercer une fonction de chaperon vis-à-vis de la partie carboxy terminale des sécrétines qui leur sont associées. Les pilotines étant des lipoprotéines, elles sont adressées à la ME par le système Lol et il est possible que l'interaction d'une sécrétine avec sa pilotine permette son adressage à la ME via le système Lol (Figure II.26 C) (Collin *et al.*, 2011). Dans plusieurs organismes dotés d'un système de sécrétion de type II, aucun homologue des pilotines OutS, PulS et GspS β n'a été identifié (Korotkov *et al.*, 2012). Si dans ces organismes la présence de protéines jouant un rôle semblable à celui des pilotines ne peut toujours être exclu, il est désormais clair que l'adressage à la ME de certaines sécrétines dépend de mécanismes tout à fait différents. Ainsi, *P. aeruginosa* dispose de deux sécrétines, HxcQ et XcpQ, dont l'adressage semble indépendant d'une pilotine. En effet, HxcQ est une lipoprotéine qui est acheminée à la ME par le système Lol (Viarre *et al.*, 2009) et XcpQ semble être acheminée à la ME par la protéine périplasmique PA0943 (Seo *et al.*, 2009).

Outre une structure particulière et un mode d'adressage à la ME externe parfois atypique, certaines sécrétines semblent également différer des lipoprotéines et des PT β par la manière dont leur extrémité carboxy terminale est insérée dans la ME. En effet, les sécrétines PulD et XcpQ de *K. oxytoca* et *P. aeruginosa* sont insérées dans la ME de façon indépendante du système Bam (Collin *et al.*, 2007 ; Hoang *et al.*, 2011) et un modèle d'insertion spontanée dans la ME a été proposé pour ces deux sécrétines (Guilvout *et al.*, 2008 ; Hoang *et al.*, 2011). Cependant, cette observation est difficilement généralisable puisque la sécrétine PilQ de *N. meningitidis* semble dépendre du système Bam pour son insertion dans la ME (Voulhoux *et al.*, 2003).

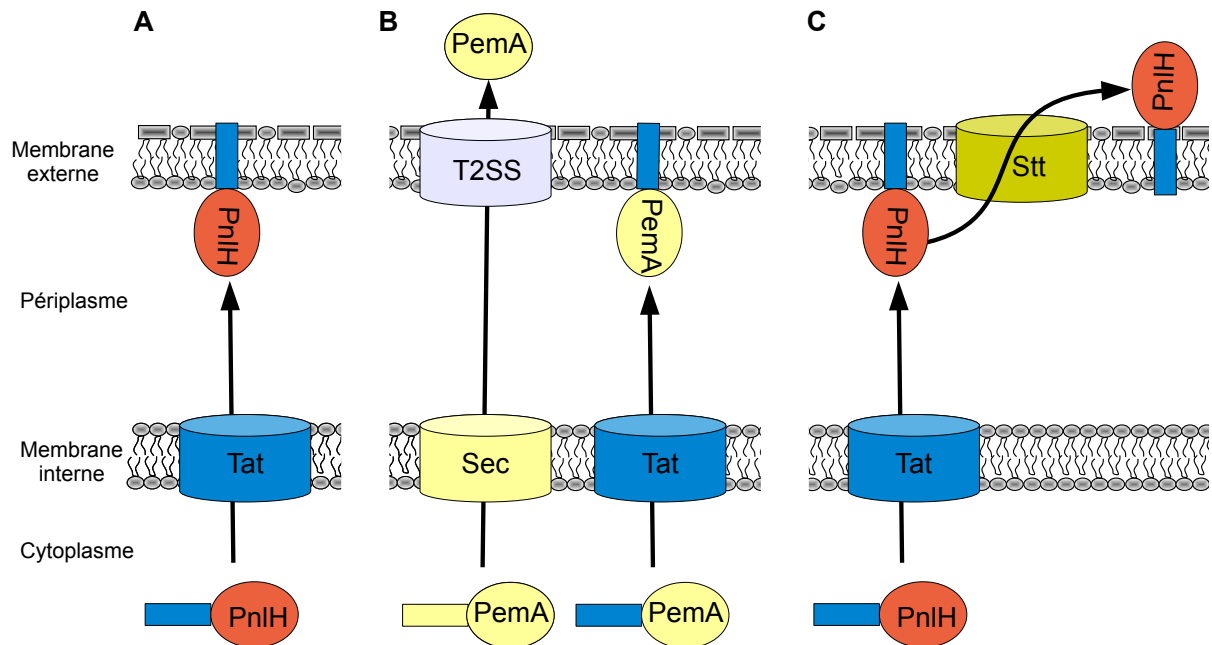


Figure II.27 : PnlH une protéine de surface ancrée dans la membrane externe par une séquence signal Tat.

(A) PnlH est ancrée dans la membrane externe par une séquence signal Tat non clivée après exportation. (B) PmA est une protéine extracellulaire exportée dans le périplasm par le système Sec et sécrétée dans le milieu extérieur par un système de sécrétion de type II (T2SS). La fusion de la séquence signal Tat de PnlH à la forme mature de PmA adresse PmA à la membrane externe de façon Tat dépendante. La séquence signal Tat de PnlH ancre la protéine de fusion dans la membrane externe. (C) Une fois adressée à la membrane externe par sa séquence signal Tat, PnlH est sécrétée à la face externe de la membrane externe par un système de sécrétion de type II dénommé Stt. D'après les données de Ferrandez et Condemine (2008).

V.E PnlH, une protéine ancrée dans la ME par une séquence signal Tat

Des travaux portant sur la recherche de nouveaux facteurs de virulence chez la protéobactérie phytopathogène *D. dadantii* ont permis de mettre en évidence un nouveau type de protéine de ME (Ferrandez et Condemine, 2008). La protéine PnlH est un homologue de pectine lyase dotée d'une séquence signal Tat non clivée après exportation et permettant l'ancrage de PnlH dans la ME (Figure II.27 A). La fusion de la séquence signal de PnlH à diverses protéines permet leur adressage et leur insertion dans la ME, indiquant que toute l'information nécessaire à ces processus est contenue dans la séquence signal de PnlH (Figure II.27 B).

PnlH possède également la particularité d'être présente à la surface de *D. dadantii*. La sécrétion de PnlH à la face externe de la ME est assurée par un système de sécrétion de type II (stt : Second Type Two) (Figure II.27 C). Dans un mutant *stt* de *D. dadantii*, PnlH est localisée dans la ME, indiquant que l'insertion de PnlH dans la ME et sa sécrétion à la face externe de la bactérie sont deux évènements indépendants. De plus, lorsque PnlH est exprimée chez *E. coli* elle est correctement adressée à la ME indiquant que le système permettant l'adressage de PnlH à la ME est conservé chez *D. dadantii* et *E. coli*. Ces observations suggèrent que d'autres protéines ancrées dans la ME par une séquence signal Tat non clivée pourraient exister. Cependant, la recherche de telles séquences signal dans les bases de données n'a donné aucun résultat en raison de l'importance des sites de clivage dans les algorithmes de prédiction de séquence signal.

VI Conclusion, hypothèses et objectifs de l'étude

La ME des protéobactéries est un compartiment cellulaire de composition complexe qui, tout en étant imperméable à de nombreuses molécules toxiques, est également une interface dynamique entre la cellule et le milieu extérieur (Nikaido, 2003). Si sa composition lipidique particulière explique son imperméabilité, les protéines qui la composent assurent de nombreuses fonctions essentielles comme l'import de molécules nécessaires au métabolisme ou la sécrétion de molécules toxiques ou impliquées dans l'interaction avec l'environnement. La biosynthèse et la mise en place de ces protéines est donc d'une importance particulière pour les protéobactéries.

Chez les protéobactéries deux grands types de protéines de ME ont été identifiées. Les lipoprotéines sont ancrées dans la ME par un domaine amino terminal acylé et sont adressées à la ME par le système Lol (Okuda et Tokuda, 2011). Les protéines en tonneau β sont des protéines intégrales de ME et sont adressées à la ME par les chaperons périplasmiques SurA, Skp et DegP avant d'être insérées dans la membrane par le complexe Bam (Ricci et Silhavy, 2012). Les systèmes assurant l'adressage et l'insertion de ces protéines sont conservés au sein des protéobactéries ce qui est cohérent avec l'importance de ces systèmes dans la biogénèse d'une ME fonctionnelle. Outre ces lipoprotéines et PT β dites canoniques, la ME de nombreuses bactéries accueille également des protéines atypiques ancrées dans la ME par des structures ou des systèmes d'adressage particuliers (Dong *et al.*, 2006 ; Ferrandez et Condemine, 2008 ; Korotkov *et al.*, 2012). Ces protéines semblent moins conservées au sein des protéobactéries et remplissent des fonctions bien spécifiques. Ainsi, la connaissance des mécanismes d'adressage et d'insertion de ces protéines est importante à la fois d'un point de vue fondamental pour comprendre comment, au cours de l'évolution, les bactéries ont pu mettre en place une structure comme la ME, mais aussi d'un point de vue appliqué car elle pourrait fournir de nouvelles cibles plus spécifiques pour les antibiotiques.

Parmi les protéines atypiques de ME, la protéine PnIH est ancrée dans la ME de *D. dadantii* par une séquence signal Tat non clivée et représente donc un nouveau type de protéine de ME. La séquence signal de PnIH porte toute l'information nécessaire à la localisation cellulaire de PnIH. Elle ne possède aucune des structures spécifiques des lipoprotéines ou des PT β qui assurent la prise en charge de ces dernières par leur voie d'adressage respective. Ainsi, PnIH pourrait dépendre d'une voie d'adressage différente de celles des PT β et des lipoprotéines. Le gène codant PnIH appartient à un cluster de 15 gènes codant également un système de sécrétion de type II (Stt). Ce cluster de gènes est encadré par deux t-ARN valine et les gènes le constituant présentent un pourcentage G+C inférieur au reste du génome de *D. dadantii*, suggérant que ce cluster a été acquis par transfert horizontal. De manière intéressante, aucun gène codant une protéine impliquée dans l'adressage de PnIH à la membrane externe n'a pu être mis en évidence au sein de ce cluster, indiquant que l'adressage de PnIH repose sur une voie d'adressage déjà présente chez *D. dadantii*. De plus, lorsque PnIH est exprimée chez *E. coli*, elle est retrouvée à la face interne de la membrane externe, indiquant que la voie d'adressage de PnIH pourrait être

conservée chez ces deux bactéries (Ferrandez et Condemine, 2008). L'ensemble de ces données nous a conduit à émettre les hypothèses suivantes :

- PnIH pourrait représenter un nouveau type de protéines de ME présent chez plusieurs protéobactéries.
- L'adressage de PnIH à la membrane externe pourrait dépendre d'un système conservé chez certaines protéobactéries et différent de celui des PT β et des lipoprotéines.

Mon projet de thèse a donc consisté à caractériser la voie d'adressage de PnIH, c'est à dire à identifier les protéines périplasmiques et de ME impliquées dans l'acheminement et l'insertion de PnIH dans la ME. J'ai également tenté d'identifier la nature de l'information portée par la séquence signal de PnIH afin de comprendre les mécanismes sous jacents à l'adressage de PnIH. De plus cette analyse avait pour but d'établir une signature des séquences signal Tat non clivées afin de faciliter la recherche dans les banques de données d'autres protéines ancrées dans la ME par une séquence signal Tat.

Lors de ce travail nous avons utilisé plusieurs stratégies pour identifier les partenaires de PnIH au cours de son adressage à la membrane externe. Dans le Chapitre III sont présentés les résultats concernant une approche sans à priori au cours de laquelle nous avons utilisés différentes techniques de purification pour identifier les protéines qui interagissent avec PnIH. Dans le Chapitre IV sont présentés les résultats d'une approche au cours de laquelle nous avons ciblé plusieurs facteurs impliqués dans l'adressage des protéines à la ME et étudié l'impact de leur délétion sur l'adressage de PnIH. Dans ce chapitre les résultats concernant l'étude de la séquence signal de PnIH sont également développés.

Nom	Caractéristiques importantes	Source ou Référence
Souches		
Dérivées de <i>D. dadantii</i> 3937		
A350	<i>rafR ganB</i>	Hugouvieux-Cotte-Pattat et Charaoui (2009)
A4229	<i>rafR ganB ompF::kan^r</i>	Collection Laboratoire
<i>Escherichia coli</i>		
NM522	<i>F' proAB lac^f Δ(lacZ)M15/Δ(lac-proAB) thi hsd-5</i>	Stratagene
BL21(DE3)	<i>F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i>	Collection Laboratoire
MC4100	<i>F⁻ araD139 deoC1 flbB5301 ptsF25 rbsR relA1 rpsL150 Δ(argF-lac)U169</i>	Casadaban (1976)
Plasmides		
pGEM-T	Amp ^r ; permet le clonage AT de produit de PCR	Promega
pGEM-T PnIH-6His	pGEM-T contenant la séquence codante de PnIH-6His	Ferrandez et Condemine (2008)
pBluescript	pUC ori, Amp ^r	Stratagene
pBAD18	Amp ^r , pBR322 ori, promoteur pBAD	Guzman <i>et al.</i> (1995)
pBAD18 PnIH-6His	pBAD18 avec la séquence codante pour PnIH-6His sous le contrôle du promoteur pBAD	Ferrandez et Condemine (2008)
pACT3	pACYC ori, Cm ^r	Maneewannakul <i>et al.</i> (1994)
pPnIH	pACT3 avec la séquence codante pour PnIH-6His sous le contrôle du promoteur <i>lac</i>	Ce travail
pGEX-6P3	pBR322 ori, Amp ^r , code pour la glutathion-S-transferase	GE Healthcare
Xss20	pGEX-6P3 contenant une fusion de la GST avec les 41 premiers acides aminés de PnIH	Ce travail
Oligonucléotides		
	Séquence 5' à 3'	
Xss20+	CCCGGATCCCAAAAAAATACGATGCCAAAG	
Xss20-	CCCGTCTCAATCAGACTGGGCAATTCTGGC	

Tableau III.1 : Souches, plasmides et oligonucléotides utilisés dans ce travail.

Chapitre III Identification de partenaires de PnIH par des méthodes biochimiques.

I Introduction

Ces dernières années, l'identification des protéines impliquées dans les voies d'adressage des protéines à la ME a été entreprise par différentes méthodes génétiques et biochimiques sans *a priori*. Concernant l'adressage des PT β , des cribles génétiques ont permis d'identifier les protéines SurA et BamB (Tormo *et al.*, 1990 ; Ruiz *et al.*, 2005) et des techniques de copurification ont permis d'identifier le chaperon Skp et le système Bam (Chen *et al.*, 1996 ; Wu *et al.*, 2005 ; Sklar *et al.*, 2007a). L'identification du système Lol quant à elle, a initialement été permise par l'étude de la localisation des lipoprotéines dans des sphéroplastes (Matsuyama *et al.*, 1995). De telles techniques ont donc été envisagées pour identifier les protéines impliquées dans l'adressage de PnIH à la ME. Dans des travaux antérieurs, réalisés au laboratoire, Yann Ferrandez et Guy Condemine ont utilisés différents cribles génétiques pour identifier des mutants défectueux dans l'adressage à la ME de protéines de fusion entre la séquence signal de PnIH et une protéine rapporteur. Malheureusement, ces tests n'ont pas permis l'identification de partenaires de PnIH. Des techniques semblables à celles mise en œuvre pour l'identification du chaperon Skp ou du système Lol ont donc été utilisées. Ce chapitre traite de la mise au point de techniques de copurification de PnIH et de ses partenaires et de l'étude du comportement de PnIH dans des sphéroplastes d'*E. coli*.

II Matériel et méthodes

II.A Souches bactériennes, plasmides et milieux de culture

Les différentes souches d'*E. coli* et *D. dadantii* utilisées lors de ce travail sont répertoriées dans le Tableau III.1. Les souches ont été cultivées en milieu LB (Luria Bertani) à 30°C, sous agitation. Lorsque cela était nécessaire, des antibiotiques ont été ajoutés au milieu de culture aux concentrations suivantes : ampicilline 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et chloramphénicol 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Les transductions par le phage ϕEC2 ont été réalisées selon le protocole décrit par Résibois *et al.* (1984).

Les oligonucléotides et les plasmides utilisés dans ce travail sont répertoriés dans le Tableau III.1. Pour obtenir le plasmide pPnIH, le plasmide pGEM-T PnIH-6His a été digéré par ScaI et ApaI et la séquence codante de PnIH-6His résultante sous clonée dans pBluescript. Le plasmide résultant a été digéré par ScaI et KpnI et la séquence codante de PnIH-6His sous clonée dans pACT3. Pour obtenir Xss20, la séquence codant la séquence signal de PnIH a été amplifiée par PCR avec les primers Xss20+ et Xss20-. Le produit de PCR résultant a été cloné en phase avec l'extrémité carboxy terminale de la GST entre les sites BamHI et Sall du site multiple de clonage de pGEX-6P3. Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage.

Sauf lorsque le contraire est stipulé, l'expression des différentes protéines d'intérêt a été induite par l'ajout de 0,1% d'arabinose (série pBAD18) ou de 1mM d'IPTG (série pGEX-6P3) à une DO₆₀₀ d'environ 0,6. Les cellules ont ensuite été cultivées pendant 2 h supplémentaires.

II.B Fractionnement cellulaire

Pour préparer le périplasme, les cellules ont été cultivées sur la nuit à 30°C dans un milieu LB. Les cellules ont été récoltées par centrifugation 7 min à 5000 x g et le périplasme a été préparé par traitement au lysozyme et choc osmotique (Allen *et al.*, 2002).

Pour déterminer la localisation cellulaire de PnlH-6His, la fraction « cellules » a été préparée en concentrant à une DO₆₀₀ d'environ 7,5 les cellules d'une culture en phase exponentielle. Pour obtenir les fractions lysat, débris cellulaires, soluble et membranaire, le reste de la culture a été concentré à une DO₆₀₀ d'environ 7,5 dans du TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) 1mM PMSF. Les cellules ont ensuite été cassées par trois passages à la presse de French. Après une centrifugation de 20 min à 7000 x g, le culot a été considéré comme la fraction « débris cellulaires » et le surnageant comme la fraction « lysat ». Le lysat a ensuite été soumis à une ultracentrifugation pendant 1h à 100 000 x g et le surnageant a été considéré comme la « fraction soluble » et le culot comme la « fraction membranaire ». Si nécessaire, les membranes ont été séparées par ultracentrifugation 48h à 200 000 x g sur un gradient de saccharose de 38 à 65 % (m/m) (Shevchik *et al.*, 1996). Les fractions ont été collectées par le bas du tube d'ultracentrifugation et précipitées à l'éthanol.

II.C Copurification de PnlH-6His et de ses partenaires à partir de membranes d'*E. coli*

Les fractions membranaires des souches NM522/pBAD18 et NM522/pBAD18 PnlH-6His ont été préparées comme décrit ci-dessus. Le culot d'ultracentrifugation (fraction membranaire) a été repris dans du Tampon P (50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0, 150 mM NaCl), 10mM imidazole. La solubilisation a été effectuée par ajout de 2% (vol/vol) de Triton X-100 et agitation pendant 2 h sur roue tournante à 15°C. Une centrifugation à 10 500 x g pendant 2 min a permis d'isoler la fraction membranaire solubilisée dans le Triton X-100 2% (surnageant) de la fraction insoluble dans le Triton X-100 2% (culot).

Pour la purification de PnlH-6His toutes les manipulations ont été réalisées à 15°C. Les lavages ont été effectués par agitation pendant 5 min sur roue tournante d'un mélange de 5 mL de solution de lavage et de résine. La solution de lavage a ensuite été éliminée par centrifugation à 500 g pendant 2 min. Après deux lavages de 1 mL de résine His-Select HF Nickel Affinity gel (SIGMA) avec 5 mL de Tampon P, une fraction membranaire solubilisée a été incubée avec la résine pendant 2 h sur roue tournante. La résine a ensuite été lavée par trois solutions de tampon P de concentration croissante en imidazole (10, 20 et 50 mM). La moitié de la résine a été prélevée et les protéines fixées éluées par une solution de Laemmli 2X. L'autre moitié a été incubée pendant 1 h 30 avec une fraction périplasmique dont les concentrations salines et le pH

ont été amenés aux valeurs suivantes : 150 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 10 mM Imidazole, pH 8,0. La résine a ensuite été lavée par deux solutions de Tampon P de concentration croissante en imidazole (10 et 20 mM), puis les protéines fixées sur la résine ont été éluées par une solution de Laemmli 2X.

II.D Purification de PnlH-6His à partir de membranes de *D. dadantii*

Les fractions membranaires des souches A350/pACT3 et A350/pPnlH ont été préparées comme décrit ci-dessus. Le culot d'ultracentrifugation (fraction membranaire) a été repris dans du TrisFix (50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl). La solubilisation a été effectuée par ajout de 2% (vol/vol) de Triton X-100 ou 2% (m/vol) de Sarkosyl et agitation pendant 2 h sur roue tournante à 15°C. Une ultracentrifugation à 100 000 x g pendant 1 h a permis d'isoler la fraction membranaire solubilisée (surnageant) de la fraction insoluble (culot).

Pour la purification de PnlH-6His toutes les manipulations ont été réalisées à 15°C. Les lavages ont été effectués par agitation pendant 5 min sur roue tournante d'un mélange de 2 mL de solution de lavage et de résine. La solution de lavage a ensuite été éliminée par centrifugation à 500 g pendant 2 min. Après trois lavages de 1 mL de résine His-Select HF Nickel Affinity gel (SIGMA) avec 5 mL de TrisFix, une fraction membranaire solubilisée par le sarkosyl 2% a été incubée avec la résine pendant 2 h sur roue tournante. La résine a ensuite été lavée par quatre solutions de tampon TrisFix de concentration croissante en imidazole (0, 20, 50 et 100 mM). Les protéines fixées sur la résine ont été éluées par une solution de Laemmli 2X.

II.E Copurification de la séquence signal de PnlH et de ses partenaires

Les souches NM522/pGEX-6P3 et NM522/Xss20 ont été cultivées en milieu LB à 30°C et la production de la GST et de GST-PnlHss a été induite. Les fractions « cellules » ont été préparées en concentrant un aliquot de chaque culture à une DO₆₀₀ d'environ 7,5. Le reste des cultures a été concentré à une DO₆₀₀ d'environ 7,5 dans du TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) 1mM PMSF. Les cellules ont ensuite été cassées par trois passages à la presse de French. Après une centrifugation de 20 min à 7000 x g, le culot a été considéré comme la fraction « débris cellulaires » et le surnageant comme la fraction « lysat ». Les débris cellulaires de NM522/Xss20 ont été repris dans du TES (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA, 100mM NaCl) 1 mM PMSF et traités pendant 2 h par du sarkosyl 10 % (m/vol). Après centrifugation 20 min à 7000 x g le surnageant a été dilué 5 fois dans du TES 1 mM PMSF pour amener la concentration en sarkosyl à 2% (m/vol). Du Triton X-100 et du CHAPS ont ensuite été ajoutés à des concentrations finales respectives de 2% (vol/vol) et 40 mM pour obtenir la GST-PnlHss solubilisée (Tao *et al.*, 2010a).

Pour la purification de GST-PnlHss, toutes les manipulations ont été réalisées à 15°C. Les lavages ont été effectués par agitation pendant 5 min sur roue tournante d'un mélange de 5 mL de solution de lavage et de résine. La solution de lavage a ensuite été éliminée par centrifugation à 500 g pendant 2 min. La GST-PnlHss solubilisée a été incubée 2 h sur une résine Protino

Glutathione Agarose 4B (Macherey Nagel) précédemment équilibrée avec du TES-D (TES 2% (m/vol) sarkosyl, 2% (vol/vol) Triton X-100, 40 mM CHAPS). La résine a ensuite été lavée trois fois par du TES-D. La moitié de la résine a été prélevée et les protéines fixées éluées par ajout d'une solution de Laemmli 2X. L'autre moitié a été incubée pendant 1 h 30 avec une fraction soluble ou une fraction membranaire solubilisée dans 2% (vol/vol) de Triton X-100 de *D. dadantii* A4922. Après 2 lavages avec du TES-D, les protéines fixées sur la résine ont été éluées avec du tampon Laemmli 2X.

II.F Préparation des sphéroplastes d'*E. coli*

5 mL de cultures à DO_{600} 0,5 ont été centrifugées 5 min à 5000 x g et le culot a été lavé par 500 μ L de Tris-HCl 0,2 M, pH 8.0. Après centrifugation 2 min à 8000 x g, le culot a été resuspendu dans 210 μ L de Tris-HCl 0,2 M, pH 8.0. Par la suite, 220 μ L de Tris-HCl 0,2 M, pH 8.0, saccharose 1 M, 16 μ L d'EDTA 10 mM, pH 8.0 et 12 μ L de lysozyme 0,5 mg/mL ont été ajoutés. La suspension a été mélangée par inversion douce et incubée 15 min sur la glace. Après l'ajout de 1 mL de Tris-HCl 0,2 M, pH 8.0, saccharose 0,16 M, $MgCl_2$ 5 mM, la suspension a été incubée 20 min à 30°C avant d'être centrifugée 2 min à 16 000 x g. Les sphéroplastes, contenus dans le culot, ont été repris dans une solution tampon pH 8.0 et cultivés à 30 °C (la nature du tampon pH 8.0 varie selon les expériences et est donc décrite dans les résultats). La formation de sphéroplastes a été vérifiée par microscopie optique.

La lyse des sphéroplastes a été testée par dosage de l'activité malate deshydrogénase dans les sphéroplastes et le surnageant de culture (Allen *et al.*, 2002).

II.G Analyse des protéines

La séparation des protéines par SDS-PAGE a été effectuée selon Laemmli (1970). La coloration des gels pour la visualisation des protéines a été réalisée au bleu de Coomassie. Pour l'immunodétection des protéines, les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF par transfert demi-sec (Transblot Biorad) dans du tampon glycine 40 mM, Tris 50 mM, SDS 0,1%, méthanol 20%. Après transfert, la membrane a été saturée 1 h dans une solution de TBS-T (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 140 mM NaCl, 0,1% Tween-20) avec de la gélatine à 3% (m/vol). Ensuite, la membrane a été incubée 1 h avec l'anticorps primaire (anti PnlH, dilution 1/2 000) puis 1 h avec l'anticorps secondaire (anti immunoglobulines de lapin couplé à la peroxydase, dilution 1/20 000). Chaque étape a été suivie de trois lavages de 5 min au TBS-T. Enfin, la révélation a été effectuée par détection par chimioluminescence des produits de la peroxydase (Kit ECL, GE Healthcare).

Les protéines copurifiées avec PnlH-6His ou GST-PnlHss ont été séparées par SDS-PAGE. Après coloration au bleu de Coomassie, les bandes correspondantes ont été découpées et envoyées à l'IBCP de Lyon pour identification par LC-MS-MS.

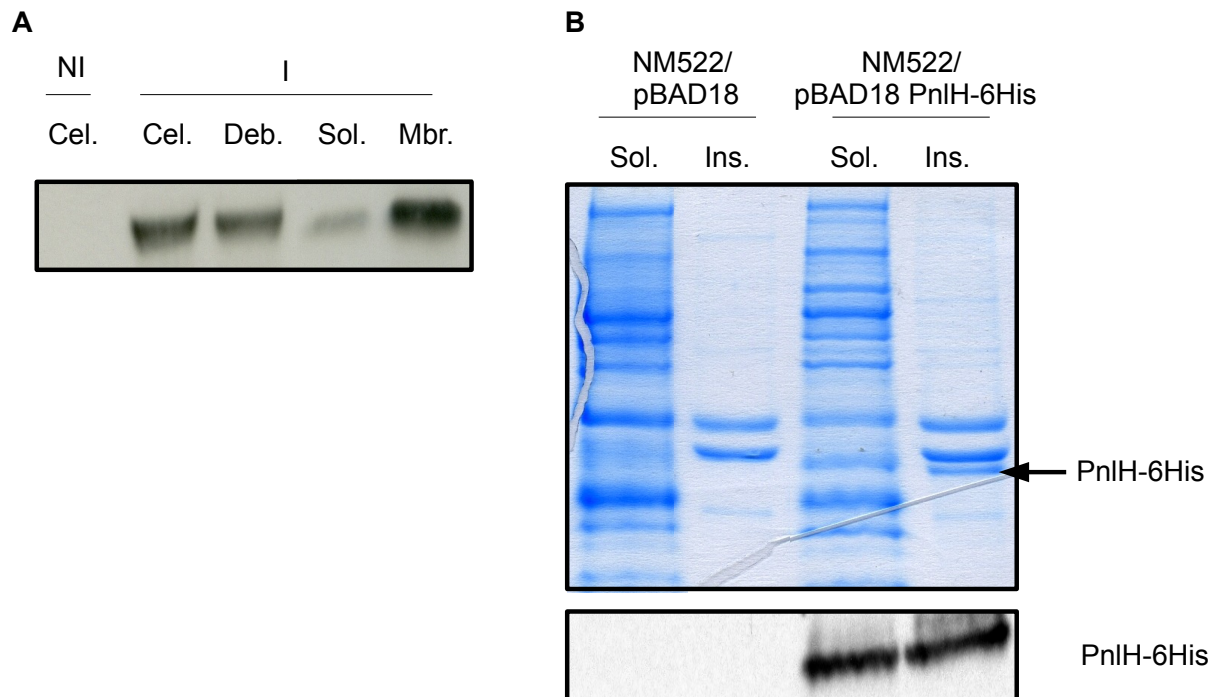


Figure III.1 : Surproduction et solubilisation de PnlH-6His chez *E. coli* NM522.

(A) Immunodétection de PnlH-6His dans les cellules (Cel.), les débris cellulaires (Deb.) et les fractions soluble (Sol.) et membranaire (Mbr.) de la souche NM522/pBAD18 PnlH-6His d'*E. coli*. La production de PnlH-6His a été induite par l'ajout de 0,1% d'arabinose à une culture de NM522/pBAD18 PnlH-6His en phase exponentielle (I). Une culture de NM522/pBAD18 PnlH-6His pour laquelle la production de PnlH-6His n'a pas été induite (NI) sert de contrôle.

(B) Solubilisation de PnlH-6His membranaire par un traitement au Triton X-100 2%. Les membranes des souches NM522/pBAD18 et NM522/pBAD18 PnlH-6His ont été traitées par du Triton X-100 2% puis les fractions soluble (Sol.) et insoluble (Ins.) dans le Triton X-100 ont été séparées par centrifugation. Le contenu protéique de ces fractions a été analysé par SDS PAGE (panneau du haut) et par immunodétection avec un anticorps dirigé contre PnlH (panneau du bas).

III Résultats

III.A Copurification de PnlH et de ses partenaires

III.A.1 Surproduction de PnlH chez *E. coli* et copurification sur résine Ni-NTA

L'identification des partenaires de PnlH a tout d'abord été entreprise grâce à une méthode de copurification sur résine d'affinité au nickel. Pour cette technique, une matrice est générée, en purifiant PnlH sur une résine Ni-NTA grâce à une étiquette polyhistidine carboxy terminale. Dans un second temps, la matrice est incubée avec une fraction protéique choisie. En interagissant avec PnlH, les partenaires de cette dernière se retrouvent liés indirectement à la résine ce qui permet leur purification. Après élution et analyse sur SDS-PAGE, ces protéines peuvent être identifiées par spectrométrie de masse.

PnlH étant ancrée dans la ME par sa séquence signal Tat, la première étape de ce travail a consisté à trouver des conditions de surproduction et de solubilisation de PnlH. A cet effet, PnlH dotée d'une étiquette 6 histidines carboxy terminale (PnlH-6His) a été surproduite chez *E. coli* NM522 à partir d'un vecteur à haut nombre de copies : pBAD18. Après fractionnement cellulaire, PnlH-6His est principalement présente dans les débris cellulaires et la fraction membranaire (Figure III.1 A). La présence d'une grande quantité de PnlH-6His dans les débris cellulaires peut être attribuée à un mauvais cassage des cellules ou à la formation de corps d'inclusion par des protéines mal repliées ou mal adressées. Ainsi, pour éviter tout problème lié au mauvais repliement de PnlH-6His ou à la présence d'agrégats sur la résine, la fraction membranaire contenant PnlH-6His a été utilisée pour la suite de l'expérience. Afin de solubiliser PnlH-6His sans altérer son repliement, les membranes de NM522/pBAD18 PnlH-6His ont été traitées avec un détergent non ionique (Triton X-100 2%) et centrifugées pour éliminer les protéines insolubles. Ce procédé a permis de solubiliser environ 50 % de la protéine présente dans la fraction membranaire (Figure III.1 B).

Les matrices de copurification PnlH-6His et contrôle ont ensuite été générées en incubant respectivement des fractions membranaires solubilisées de NM522/pBAD18 PnlH-6His et NM522/pBAD18 sur une résine Ni-NTA. Les protéines fixées sur ces matrices ont ensuite été éluées et analysées sur SDS-PAGE. De façon surprenante, plusieurs protéines sont présentes sur la matrice PnlH-6His mais pas sur la matrice contrôle, indiquant qu'elles interagissent avec PnlH-6His (Figure III.2 A). Trois protéines présentes en quantité suffisante (indiquées par une étoile sur la Figure III.2 A) ont pu être identifiées par spectrométrie de masse comme étant la sous unité β d'ARN polymérase (P0A8T7|RPOC_ECOLI) de 155 kDa, la protéase ATP dépendante Lon (P0A9M0|LON_ECOLI) de 87 kDa et le facteur d'élongation EF-Tu (P0A6N1|EFTU_ECOLI) de 43 kDa. Ces trois protéines sont cytoplasmiques et ne correspondent donc pas au type de protéines (périplasmiques ou de membrane externe) recherchées. Les matrices PnlH-6His et contrôle ont ensuite été incubées avec des fractions périplasmiques d'*E. coli* NM522 ou de *D. dadantii* A4922. Après élution et analyse sur SDS-PAGE, aucune protéine présente uniquement sur la matrice

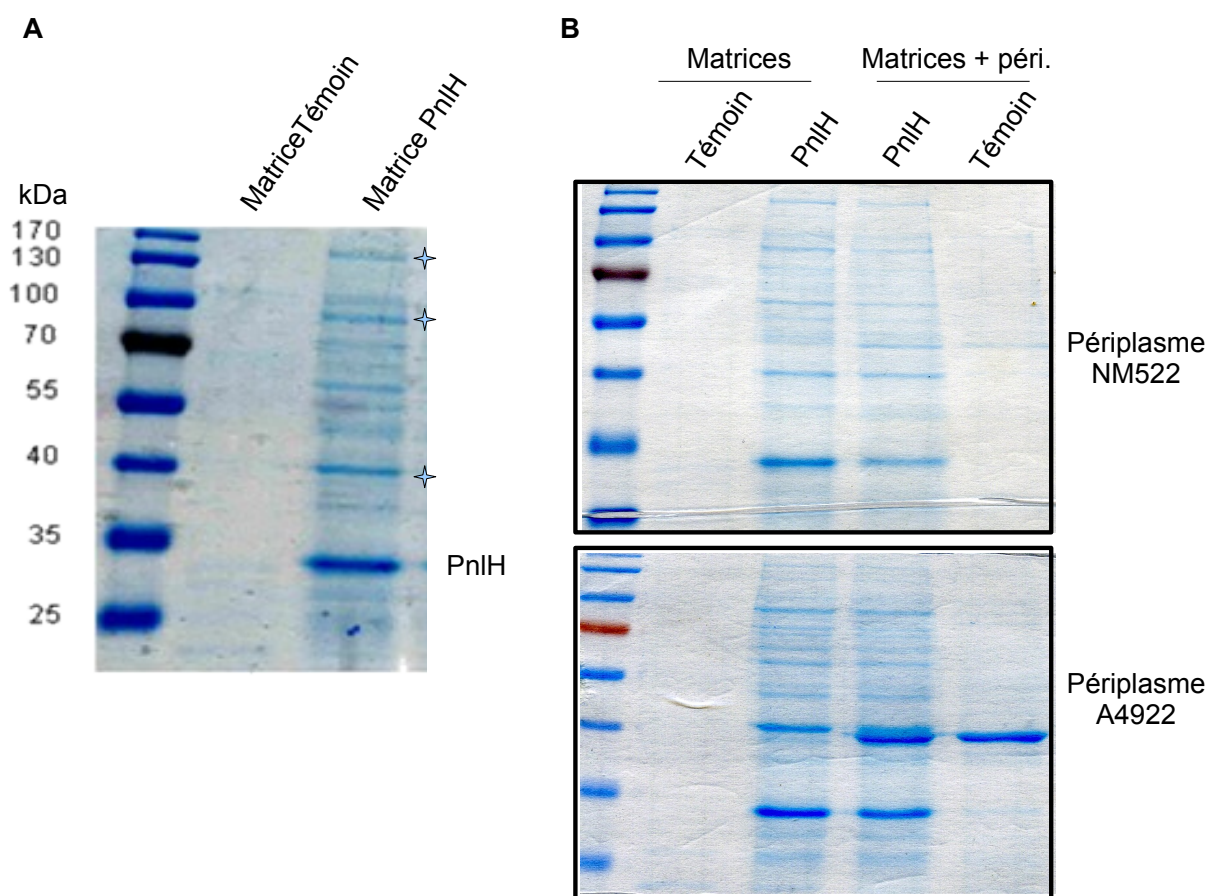


Figure III.2 : Copurification de PnlH-6His et de ses partenaires.

(A) Analyse par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie des protéines fixées sur les matrices Témoin et PnlH. La matrice PnlH a été obtenue en purifiant PnlH-6His sur résine Ni-NTA à partir d'une fraction membranaire de NM522/pBAD18 PnlH-6His solubilisée au Triton X-100 2%. Une fraction membranaire de NM522/pBAD18 solubilisée au Triton X-100 2% a été incubée sur résine Ni-NTA dans les mêmes conditions pour former la matrice Témoin. Les protéines marquées par des étoiles ont été identifiées par spectrométrie de masse. (B) Analyse par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie des protéines fixées sur les matrices Témoin et PnlH avant et après incubation des matrices avec un périplasma d' *E.coli* NM522 (panneau du haut) ou de *D. dadantii* A4922 (panneau du bas).

PnlH-6His incubée avec l'un ou l'autre des périplasmes n'a pu être détectée (Figure III.2 B). Cette observation indique que, dans les conditions utilisées, aucune protéine périplasmique d'*E. coli* ou de *D. dadantii* n'interagit assez fortement ou en assez grande quantité avec PnlH-6His immobilisée sur résine Ni-NTA pour permettre son identification.

Plusieurs autres conditions de surproduction (couple hôte-vecteur), de lyse cellulaire et de purification (stringence et nombre des lavages, résine streptavidine et étiquette Strep, immunoprécipitation sur Protéine A sépharose) ont été testées et ont donné des résultats semblables. La présence de protéines cytoplasmiques sur les matrices PnlH-6His indique que les fractions membranaires utilisées pour créer ces matrices sont contaminées avec un contenu cytoplasmique. De plus, les protéines identifiées à partir de ces matrices sont toutes liées à la synthèse des protéines et il est possible que la surproduction de PnlH-6His entraîne la formation d'agrégats cytoplasmiques qui précipitent avec les membranes lors de leur préparation. Pour palier à ce problème, une méthode de production de PnlH-6His plus douce a été mise au point.

III.A.2 Production de PnlH chez *D. dadantii* et purification sur résine Ni-NTA

PnlH étant une protéine de ME de *D. dadantii*, il est possible que son adressage soit moins efficace chez *E. coli* entraînant l'agrégation de la protéine dans le cytoplasme. Ainsi, afin de limiter l'impact de la surproduction de PnlH-6His sur son adressage, PnlH-6His a été exprimée sans induction dans la souche A350 de *D. dadantii* à partir d'un vecteur à nombre de copies moyen : pACT3 (pPnlH). Dans ces conditions, un fractionnement cellulaire a montré que PnlH-6His était répartie de façon équitable entre fraction soluble (cytoplasme + périplasme) et fraction membranaire (MI + ME) (Figure III.3 A). La séparation des membranes interne et externe par flottaison sur gradient de saccharose a montré que PnlH-6His était majoritairement localisée dans la ME. L'absence de PnlH-6His dans les fractions à forte densité en saccharose suggère également que la fraction membranaire obtenue n'est que peu ou pas contaminée par des agrégats cytoplasmiques de PnlH-6His (Figure III.3 B). Les membranes de A350/pPnlH ont été traitées avec du Triton X-100 2% pour solubiliser PnlH-6His puis ultracentrifugées pour éliminer un maximum de protéines insolubles. Dans ces conditions, PnlH-6His a été retrouvée dans la fraction insoluble au Triton X-100 2% et a finalement été solubilisée par du sarkosyl 2% (Figure III.3 C). Malheureusement, la purification sur résine Ni-NTA de PnlH-6His solubilisée n'a fourni qu'un très faible rendement. En effet, l'analyse des protéines fixées sur la résine par SDS-PAGE et coloration au Bleu de Coomassie n'a pas permis de détecter PnlH-6His même si la présence d'une faible quantité de PnlH-6His a pu être confirmée par Western Blot (Figure III.3 D). Cette approche n'a donc pas été poursuivie.

III.B Copurification de la séquence signal de PnlH et de ses partenaires

Les données précédentes indiquent que l'adressage de PnlH-6His à la membrane externe est une étape limitante pour sa surproduction. La fusion de la séquence signal de PnlH à diverses

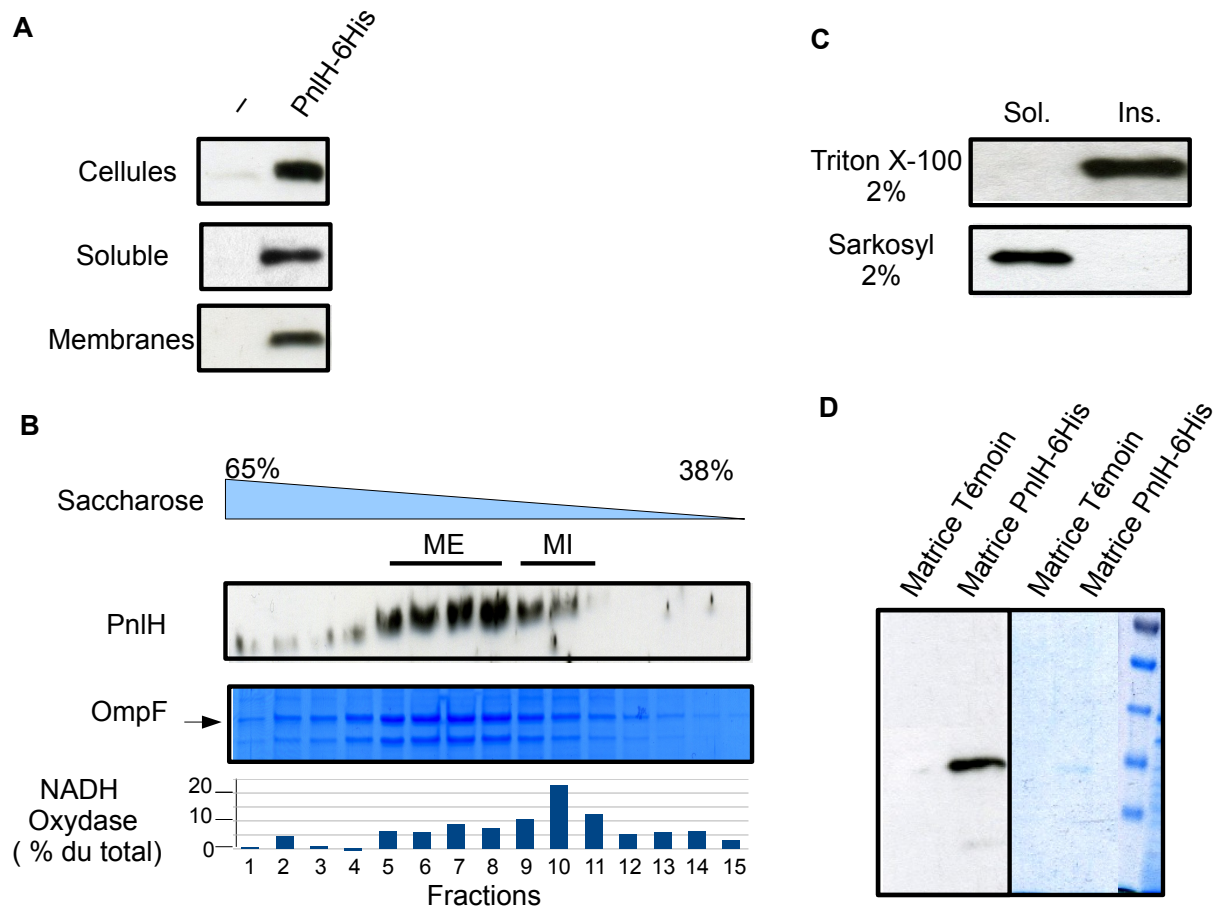


Figure III.3 : Copurification de PnIH-6His après production chez *D. dadantii* A350.

(A) Immunodétection de PnIH-6His dans les cellules, les fractions solubles et les membranes de la souche A350 de *D. dadantii* dotée soit d'un vecteur vide pACT3 (-) ou du plasmide pPnIH (PnIH-6His). (B) Séparation des membranes de A350/pPnIH par flottaison sur gradient de saccharose (38 à 65 %). Après ultracentrifugation, les fractions ont été collectées à partir du bas du tube. La présence de PnIH-6His dans chacune des fractions a été testée par immunodétection avec un anticorps dirigé contre PnIH. La porine OmpF (visualisée par coloration de la membrane d'immunodétection au bleu de Coomassie) et l'activité NADH oxydase reflètent respectivement la présence de la membrane externe et la présence de la membrane interne dans les différentes fractions. (C) Solubilisation de PnIH-6His membranaire par du Triton X-100 2% ou du sarkosyl 2%. Les membranes de A350/pPnIH ont été traitées soit par du Triton X-100 2% soit par du sarkosyl 2%. Les fractions soluble (Sol.) et insoluble (Ins.) dans les détergents ont été séparées par ultracentrifugation. La présence de PnIH-6His dans l'une ou l'autre des fractions a été testée par immunodétection avec un anticorps dirigé contre PnIH. (D) Purification de PnIH-6His sur résine Ni-NTA. Les membranes solubilisées au sarkosyl 2% de A350/pACT3 et A350/pPnIH ont été incubées sur résine Ni-NTA pour former respectivement les matrices Témoins et PnIH-6His. La présence de PnIH-6His sur les matrices a été testée par immunodétection avec un anticorps dirigé contre PnIH (panneau de gauche) et SDS-PAGE suivi d'une coloration au bleu de Coomassie (panneau de droite).

protéines étant suffisante pour les adresser à la ME (Ferrandez et Condemine, 2008), il est probable que les facteurs permettant l'adressage de PnlH à la ME interagissent avec la séquence signal de PnlH. Ainsi, pour palier aux problèmes de surproduction de PnlH-6His et permettre la copurification des partenaires de PnlH, la séquence signal de PnlH (41 acides aminés) a été fusionnée en phase avec l'extrémité carboxy terminale de la glutathion-S-transférase (GST-PnlHss). La présence de la séquence signal de PnlH en position carboxy terminale de la GST ne permet pas l'adressage de GST-PnlHss au système Tat et la protéine de fusion devrait s'accumuler dans le cytoplasme. La GST-PnlHss devrait ainsi être aisément purifiable sur résine glutathion agarose et servir de matrice dans des expériences de copurification.

La GST et GST-PnlHss ont été surproduites dans *E. coli* NM522 respectivement à partir des plasmides pGEX-6p3 et Xss20, les cellules ont été cassées à la presse de French et les lysats correspondants centrifugés pour éliminer les débris cellulaires. L'analyse SDS-PAGE des fractions correspondantes a montré que, si la GST était présente dans le lysat cellulaire, la GST-PnlHss était présente sous forme d'agrégats dans les débris cellulaires (Figure III.4 A). La combinaison des détergents sarkosyl, Triton X-100 et CHAPS a précédemment été décrite comme permettant la solubilisation et la purification à partir de corps d'inclusion de fusions entre certaines protéines insolubles et la GST (Tao *et al.*, 2010a). Un tel protocole a donc été appliqué aux débris cellulaires contenant la GST-PnlHss et a effectivement permis la purification de cette dernière sur résine glutathion agarose (Figure III.4 B, première piste). Il convient de noter que pour diverses raisons ce traitement n'a pas été appliqué à la GST soluble et une matrice contrôle contenant la GST n'est pas disponible pour la suite des expériences de copurification. Cependant, ces expériences ayant valeur de criblage exploratoire, nous avons jugé qu'il était souhaitable de continuer sans la matrice contrôle, la validité des interactions observées étant ensuite vérifiée par différents types d'expériences *in vivo* et *in vitro*. L'incubation de la matrice GST-PnlHss avec une fraction soluble (cytoplasme + périplasme) de *D. dadantii* A4922, a permis la purification et l'identification par spectrométrie de masse de trois protéines : un produit de dégradation de la GST d'environ 25 kDa, le facteur d'élongation EF-Tu d'environ 40 kDa (indiqués par des étoiles sur la deuxième piste de la Figure III.4 B) et la protéine GroEL d'environ 60 kDa (non montré). De la même façon, l'incubation de la matrice GST-PnlHss avec une fraction membranaire de *D. dadantii* A4922 solubilisée par 2% de Triton X-100 a permis la purification et l'identification de la protéine de ME OmpF (Figure III.4 B, dernière piste).

GroEL étant une protéine chaperon, sa fixation sur une protéine avec une séquence hydrophobe entraînant son agrégation, comme la séquence signal de PnlH, n'est pas surprenante. De plus, sa localisation cytoplasmique en fait un mauvais candidat pour intervenir dans l'adressage de PnlH après exportation dans le périplasme. En revanche, OmpF est une protéine de ME et un rôle quelconque de cette dernière dans l'insertion de PnlH dans la ME ne peut être exclu. Pour tester cette hypothèse, PnlH-6His a été exprimée sans induction à partir d'un vecteur pACT3 dans A350 ainsi que dans le mutant *ompF* correspondant. Après fractionnement cellulaire, l'immunodétection de PnlH-6His n'a révélé aucune différence dans la quantité de PnlH-6His

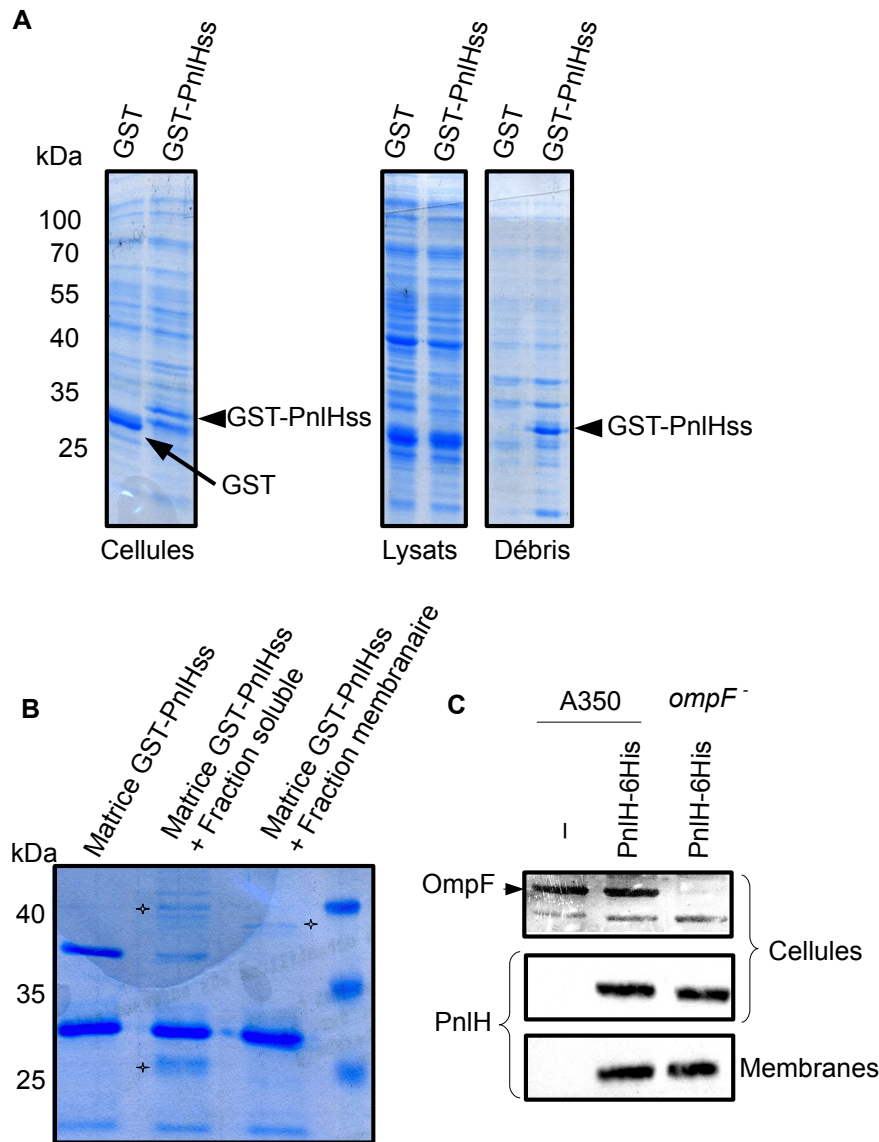


Figure III.4 : Copurification de partenaires de la séquence signal de PnIH.

(A) Analyse par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie des cellules, lysats cellulaires et débris cellulaires de NM522/pGEX-6P3 (GST) et NM522/Xss20 (GST-PnIHss). Les souches ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle où la production de la GST ou de GST-PnIHss a été induite par l'ajout de 1 mM d'IPTG. (B) Analyse par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie des expériences de copurification de GST-PnIHss et de ses partenaires sur résine glutathion agarose. GST-PnIHss a été solubilisée à partir des débris cellulaires de NM522/Xss20 par un cocktail Sarkosyl, Triton X-100, CHAPS (Tao *et al.*, 2010), puis purifiée sur résine glutathion agarose pour former la matrice GST-PnIHss (piste de gauche). La matrice GST-PnIHss a ensuite été incubée avec une fraction soluble (piste du milieu) ou une fraction membranaire solubilisée au Triton X-100 2% (piste de droite) de *D. dadantii* A4922. Les protéines indiquées par des étoiles dans les pistes 2 et 3 ont été identifiées par spectrométrie de masse. (C) Fractionnement cellulaire de la souche A350 de *D. dadantii* et du mutant *ompF*⁻, dotées soit d'un vecteur vide pACT3 (-) soit du plasmide pPnIH (PnIH-6His). La présence de PnIH-6His dans les cellules et les membranes a été testée par immunodétection avec un anticorps dirigé contre PnIH. OmpF a été visualisée par coloration de la membrane d'immunodétection au bleu de Coomassie. Des quantités

équivalentes de cellules en phase exponentielle ont été chargées sur le gel.

présente dans les fractions membranaires de la souche sauvage et du mutant *ompF* (Figure III.4 C), indiquant que l'insertion de PnlH dans la ME n'est pas altérée en l'absence de OmpF. Il est donc probable que la présence de OmpF sur la matrice GST-PnlHss soit un artefact.

III.C Utilisation des sphéroplastes pour identifier les partenaires de PnlH

Les différentes techniques de copurification mises au point n'ayant pas permis d'identifier des partenaires de PnlH, des techniques alternatives ont été recherchées. La séquence signal de PnlH est hydrophobe et il est possible qu'après exportation par le système Tat, cette dernière soit insérée dans la MI. Par analogie avec ce qui est observé pour les lipoprotéines (Okuda et Tokuda, 2011), il est possible qu'un système de MI assure le transfert de PnlH depuis la MI vers un chaperon périplasmique. Le chaperon périplasmique LolA responsable de ce processus pour les lipoprotéines a été identifié grâce à l'utilisation de sphéroplastes (Matsuyama *et al.*, 1995). Les auteurs ont exploité le fait que des lipoprotéines ancrées dans la MI de sphéroplastes étaient relâchées dans le milieu de culture des sphéroplastes en présence d'une fraction périplasmique pour identifier le récepteur périplasmique des lipoprotéines. Une approche semblable a donc été mise au point pour identifier le ou les partenaires périplasmiques de PnlH. Brièvement, PnlH a été produite dans des sphéroplastes d'*E. coli* et ces derniers ont ensuite été incubés avec une fraction périplasmique. La relargage de PnlH dans le milieu culture a ensuite été testé. Les mises au point de cette approche sont résumées ci-dessous.

La première étape de la mise au point de cette technique a été le choix d'une souche d'*E. coli* appropriée à la préparation des sphéroplastes. En effet, les sphéroplastes sont particulièrement fragiles et ont tendance à lyser lorsqu'ils sont incubés dans des conditions non appropriées. Des sphéroplastes de plusieurs souches d'*E. coli* dotées d'un plasmide pBAD18 PnlH-6His ont donc été préparés. Les sphéroplastes ont ensuite été incubés 15 min en présence d'un inducteur de la production de PnlH-6His (0,1% arabinose) et la lyse des sphéroplastes a été mesurée en déterminant le pourcentage d'activité de malate déshydrogénase (une enzyme cytoplasmique) présent dans le surnageant d'incubation. Dans ces conditions, la souche BL21(DE3)/pBAD18 PnlH-6His présente le plus fort taux de lyse alors que les souches NM522/pBAD18 PnlH-6His et MC4100/pBAD18 PnlH-6His présentent un taux de lyse équivalent (Figure III.5 A). Par conséquent, la souche MC4100/pBAD18 PnlH-6His a été retenue pour le reste des expériences.

Les résultats obtenus précédemment montrent qu'une forte induction de la production de PnlH semble favoriser la formation d'agrégats piégés dans le cytoplasme. Pour éviter ce phénomène des conditions d'induction de PnlH plus douces ont été testées. L'induction de PnlH-6His par un traitement des sphéroplastes de MC4100/pBAD18 PnlH-6His avec 0,01 et 0,001% d'arabinose n'a pas permis la production de PnlH-6His en quantité suffisante pour permettre sa détection sans ambiguïté (Figure III.5 B). En revanche, lorsque la production de PnlH-6His a été induite par 0,01% d'arabinose dans les cellules entières 5 minutes avant que les sphéroplastes ne

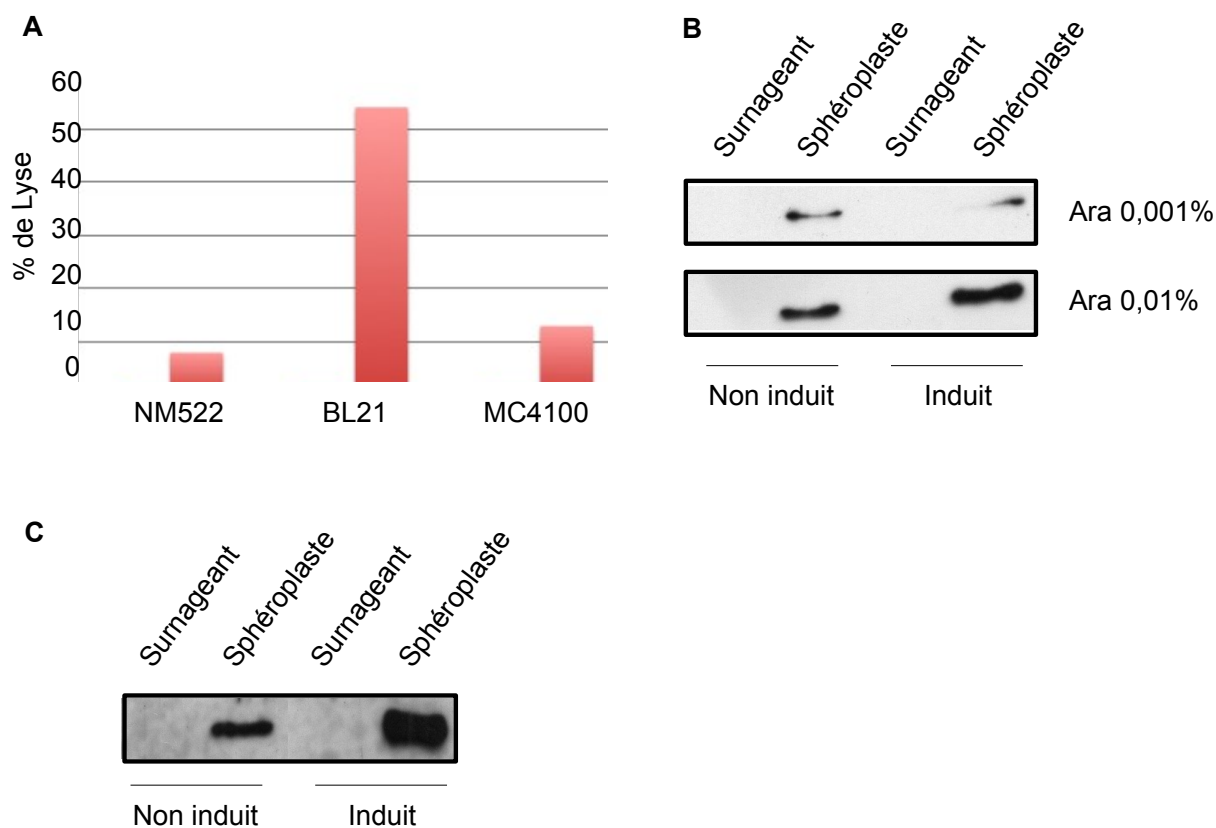


Figure III.5 : Mise au point de la production de PnIH-6His dans des sphéroplastes d'*E. coli*.

(A) Mesure de la lyse des sphéroplastes de différentes souches d'*E. coli*. Les sphéroplastes des souches BL21(DE3), NM522 et MC4100 d'*E. coli* dotées d'un plasmide pBAD18 PnIH-6His ont été préparés et incubés 15 min dans un milieu M63 pH 8, saccharose 0,25 M, MgCl₂ 2mM, arabinose 0,1 %. Le pourcentage de lyse des sphéroplastes a été déterminé en calculant le pourcentage d'activité malate deshydrogénase présent dans le surnageant d'incubation des sphéroplastes. (B) Induction de PnIH-6His dans des sphéroplastes de MC4100/pBAD18 PnIH-6His. Les sphéroplastes de MC4100/pBAD18 PnIH-6His ont été préparés puis incubés 15 min dans un milieu Tris 0,2 M pH8, saccharose 0,16 M, MgCl₂ 5mM contenant 0,01 ou 0,001 % d'arabinose. Un témoin d'induction (non induit) a été réalisé en incubant des sphéroplastes dans le même milieu en l'absence d'arabinose. La présence de PnIH-6His dans les sphéroplastes et les surnageants d'incubation a été recherchée par immunodétection avec un anticorps dirigé contre PnIH. (C) La production de PnIH-6His dans la souche MC4100/pBAD18 PnIH-6His a été induite par 0,01 % d'arabinose 5 min avant la préparation des sphéroplastes. Une fois préparés, les sphéroplastes ont été incubés 15 min dans un milieu Tris 0,2 M pH8, Saccharose 0,16 M, MgCl₂ 5mM. La présence de PnIH-6His dans les sphéroplastes et les surnageants d'incubation a été testée par immunodétection avec un anticorps dirigé contre PnIH. Une souche MC4100/pBAD18 PnIH-6His non traitée à l'arabinose avant la préparation des sphéroplastes sert de témoin d'induction.

soient préparés puis cultivés, PnlH-6His a pu être facilement détectée dans les sphéroplastes mais pas dans le surnageant d'incubation des sphéroplastes (Figure III.5 C). Une cinétique de relargage de PnlH-6His à partir des sphéroplastes a ensuite été réalisée. La production de PnlH-6His dans des cellules de MC4100/PnlH-6His a été induite par 0,01% d'arabinose pendant 30 min et les sphéroplastes correspondants ont été préparés. Les sphéroplastes ont ensuite été incubés 30 min en présence d'une fraction périplasmique d'*E. coli* NM522 ou d'un milieu tampon témoin. Un aliquot du surnageant de culture des sphéroplastes a été prélevé au bout de 0, 10, 20 et 30 min et la présence de PnlH-6His a été recherchée par immunodétection (Figure III.6). L'incubation des sphéroplastes avec une fraction périplasmique semble permettre un léger relargage de PnlH-6His dans le surnageant de culture par rapport à ce qui est observé lorsque les sphéroplastes sont incubés avec le milieu témoin. Cependant, ce phénomène a pu être corrélé à une lyse plus forte des sphéroplastes en présence de la fraction périplasmique, indiquant qu'il n'est pas lié à un mécanisme actif d'adressage de PnlH-6His. L'ensemble de ces données montre que PnlH-6His n'est pas secrétée dans le milieu de culture des sphéroplastes dans les différentes conditions utilisées et nous avons donc décidé de mettre un terme à cette approche.

IV Discussion et Conclusion

La séquence signal de PnlH assure son adressage et son insertion dans la ME (Ferrandez et Condemine, 2008). La nature hydrophobe de cette séquence signal rend PnlH sensible à des phénomènes d'agrégation comme le montre le caractère insoluble d'une fusion entre la GST et la séquence signal de PnlH. Il est donc probable qu'au cours de l'adressage de PnlH à la ME, la séquence signal de PnlH interagisse avec des protéines masquant son hydrophobicité. De plus, l'ancrage d'une protéine dans une membrane est un processus rarement spontané (Ricci et Silhavy, 2012) et un ou plusieurs facteurs protéiques sont probablement impliqués dans l'insertion de la séquence signal de PnlH dans la ME. Le but de ce travail était donc d'identifier par des techniques sans à priori les partenaires de PnlH au cours de son adressage. Les mécanismes cytoplasmiques permettant le repliement des substrats du système Tat étant relativement bien décrits (Palmer *et al.*, 2011), nous nous sommes donc concentrés sur la recherche de partenaires périplasmiques et de membrane externe.

La purification de PnlH dotée d'une étiquette polyhistidine à partir de fraction membranaire solubilisée d'*E. coli* a permis de copurifier la protéase Lon, le facteur d'élongation EF-Tu et la sous unité β de l'ARN polymérase. Ces protéines sont directement liées aux mécanismes de surproduction des protéines. En effet, le facteur d'élongation EF-Tu et la sous unité β de l'ARN polymérase sont respectivement impliqués dans les processus de traduction et de transcription. Quant à la protéase Lon, elle permet la dégradation des protéines mal repliées (Gur et Sauer, 2008). La présence de ces protéines sur la résine est surprenante puisqu'il s'agit de protéines cytoplasmiques alors que PnlH-6His a été purifiée à partir de fractions membranaires solubilisées. Une explication à ce phénomène est que, lorsqu'elle est surproduite, PnlH-6His forme des

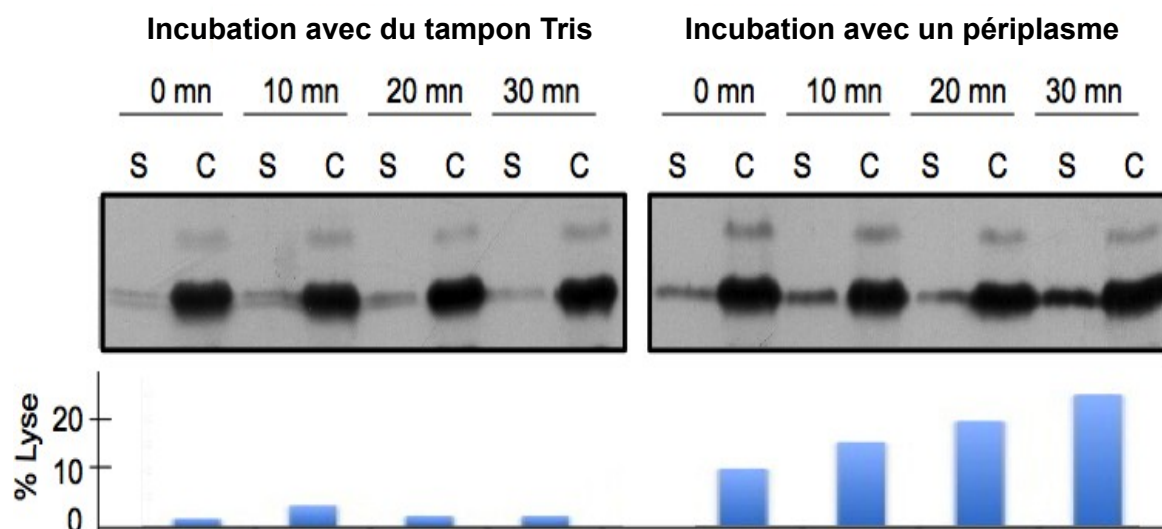


Figure III.6 : Cinétique de relargage de PnIH-6His par des sphéroplastés d'*E. coli*.

La production de PnIH-6His a été induite par l'ajout de 0,01% d'arabinose à une culture de la souche MC4100/pBAD18 PnIH-6His. 15 min après induction, des sphéroplastés ont été préparés. Les sphéroplastés ont ensuite été incubés 30 min avec, soit un périplasma de NM522 dilué 2x dans du Tris 0,4 M pH8, Saccharose 0,5 M, MgCl₂ 10 mM, soit un milieu Tris 0,2 M pH8, saccharose 0,25 M, MgCl₂ 5mM. Des aliquots de sphéroplastés (C) et de surnageant d'incubation (S) ont été prélevés au bout de 0, 10, 20 et 30 min. La présence de PnIH-6His dans les sphéroplastés et les surnageants d'incubation a été recherchée par immunodétection avec un anticorps dirigé contre PnIH. Le pourcentage de lyse des sphéroplastés a été déterminé en calculant le pourcentage d'activité malate deshydrogenase présent dans le surnageant d'incubation des sphéroplastés.

agrégats cytoplasmiques dans lesquels ces protéines se retrouvent « piégées ». Par la suite, lorsque les membranes sont préparées par ultracentrifugation, les agrégats peuvent sédimenter avec les membranes. La copurification de la protéase Lon, impliquée dans la dégradation de protéines mal repliées (Gur et Sauer, 2008), tend à conforter l'idée d'une accumulation de PnlH-His mal repliées dans le cytoplasme d'*E. coli*. Cependant, il est intéressant de noter que l'utilisation d'une fusion entre la GST et la séquence signal de PnlH (GST-PnlHss) a également permis de copurifier le facteur d'élongation EF-Tu. Dans ce cas, EF-Tu n'a été purifié qu'après avoir incubé une fraction soluble de *D. dadantii* avec une résine sur laquelle est fixée GST-PnlHss, indiquant que l'interaction entre GST-PnlHss et EF-Tu détectée précédemment n'est peut être pas due uniquement à la formation d'agrégats cytoplasmiques par PnlH-6His. Si la fonction principale de EF-Tu réside dans la livraison des ARN de transfert au ribosome (Kavaliuskas *et al.*, 2012), il peut également se fixer sur des peptides hydrophobes et jouer un rôle de chaperon vis-à-vis des protéines mal repliées (Caldas *et al.*, 1998 ; Malki *et al.*, 2002). De plus, il a été montré que l'interaction de EF-Tu avec la protéine MreB était nécessaire à la localisation et à la fonction de cette protéine (Defeu Soufo *et al.*, 2010). Ainsi, un rôle direct de EF-Tu dans le repliement ou l'adressage de PnlH au système Tat ne peut être exclu. L'utilisation de la fusion GST-PnlHss a également permis de copurifier la protéine cytoplasmique GroEL. Le rôle de chaperon de GroEL en fait un candidat idéal pour interagir avec des peptides hydrophobes ou mal repliés (Walter, 2002). L'absence d'une matrice témoin GST ne permet pas d'affirmer qu'au cours de la copurification, GroEL interagit avec la séquence signal de PnlH. Cependant, la fusion GST-PnlHss a pu être purifiée sur résine glutathion agarose indiquant que la partie GST de la protéine de fusion est correctement repliée et a donc peu de chance d'interagir avec GroEL. Il est donc possible que GroEL ait été purifiée grâce à son interaction avec la séquence signal hydrophobe de PnlH. De façon cohérente avec cette idée, GroEL a été retrouvée dans un criblage des protéines chaperons capables de se fixer à une séquence signal Tat (Graubner *et al.*, 2007) et a été impliquée dans le repliement de la protéine Tat-dépendante AmiA (Kerner *et al.*, 2005). Des travaux supplémentaires sont donc nécessaires pour déterminer si les protéines EF-Tu et GroEL jouent un rôle dans les étapes cytoplasmiques de l'adressage de PnlH.

L'objectif initial de cette approche était d'identifier des protéines périplasmiques ou de membrane externe impliquées dans l'adressage de PnlH. Cependant, l'utilisation des différentes matrices pour cribler des fractions périplasmiques ou de membrane externe n'a fourni aucun résultat. D'un point de vue technique ceci peut s'expliquer par plusieurs facteurs. De part sa nature hydrophobe, la séquence signal de PnlH a tendance à s'agréger ce qui rend difficile la surproduction de PnlH. Les matrices obtenues sont donc pauvres en PnlH, ce qui rend difficile la purification d'un partenaire en assez grande quantité pour permettre son identification. Chen et Henning (1996) avaient utilisé une technique similaire pour identifier Skp comme un chaperon spécifique des PT β . Cependant, la quantité de protéine substrat de Skp fixée sur leur matrice était bien plus importante que la quantité de PnlH que nous avons réussi à fixer sur la résine Ni-NTA, indiquant que ce paramètre est probablement un facteur limitant dans notre étude. La solubilisation

de PnIH-6His peut également constituer un obstacle à la copurification de ses partenaires. En effet, l'efficacité de solubilisation de PnIH constitue une étape limitante dans la quantité de PnIH possiblement fixée sur la résine. De plus, la séquence signal de PnIH est particulièrement hydrophobe et est donc localisée dans des micelles de détergent après solubilisation. Il est probable que ces micelles diminuent l'efficacité de l'interaction entre la séquence signal de PnIH et ses partenaires. Ces observations et l'identification de plusieurs autres facteurs limitants, comme la nature transitoire des interactions recherchées, nous ont conduit à utiliser une autre technique que la copurification pour identifier les partenaires de PnIH.

Lorsqu'une protéine de membrane externe est produite dans des sphéroplastes elle peut être soit secrétée sous forme soluble dans le milieu extérieur comme les PT β (Sen et Nikaido, 1991 ; Mastuyama *et al.*, 1993) soit ancrée dans la MI comme les lipoprotéines (Matsuyama *et al.*, 1995). Dans le cas de PnIH, l'utilisation de sphéroplastes n'a pas permis de retrouver cette dernière dans le surnageant d'incubation des sphéroplastes quelles que soient les conditions utilisées. L'absence de PnIH dans le surnageant de culture ne semble pas être liée à un système Tat non fonctionnel dans les sphéroplastes puisque ces derniers conservent la capacité d'exporter la diméthyl-sulfoxyde reductase qui est un substrat du système Tat (Masui *et al.*, 1994). En revanche, il est possible que les conditions de production de PnIH utilisées favorisent la formation d'agrégats cytoplasmiques non compétents pour l'exportation. Cependant, l'absence de sécrétion de PnIH lorsque les sphéroplastes sont cultivés en milieu tamponné pourrait également indiquer qu'il existe une étape intermédiaire dans l'adressage de PnIH durant laquelle cette dernière est localisée dans la MI. L'incubation de sphéroplastes d'*E. coli* avec une fraction périplasmique permet de transférer la lipoprotéine Lpp depuis la MI vers le surnageant d'incubation des sphéroplastes où elle forme un complexe soluble avec LolA (Mastuyama *et al.*, 1995). Dans le cas de PnIH, l'incubation de sphéroplastes avec une fraction périplasmique n'a pas permis de retrouver PnIH dans le surnageant d'incubation des sphéroplastes. L'absence d'un relargage de PnIH en présence de périplasma peut s'expliquer par des conditions d'incubations inappropriées et notamment par une concentration trop faible du périplasma utilisé. A cet effet, il convient de noter que lorsqu'ils ont été incubés avec une fraction périplasmique les sphéroplastes ont montré un taux de lyse élevé, indiquant que les conditions d'incubation n'étaient pas optimales. En somme, trop d'incertitude sur les conditions expérimentales rendent difficile toute conclusion sur le comportement de PnIH dans les sphéroplastes d'*E. coli* à partir de cette étude.

En conclusion de ce travail, l'utilisation de différentes techniques biochimiques nous a permis d'identifier les protéines GroEL et EF-Tu comme des partenaires potentiels de la séquence signal de PnIH dans le cytoplasme. Cependant, aucune protéine de périplasma ou de membrane externe n'a pu être identifiée par ces techniques. Des mises au point supplémentaires nous auraient peut être permis d'atteindre cet objectif mais le temps pris par ce travail ainsi que divers arguments évoqués précédemment nous ont conduit à abandonner cette stratégie. Les solutions alternatives mises en place sont décrites dans le chapitre suivant.

Chapitre IV Implication de SurA dans l'adressage de PnlH à la ME et analyse de la séquence signal de PnlH (Article).

PnlH est ancrée dans la ME de manière atypique par une séquence signal Tat non clivée et ne présente aucune des caractéristiques de PT β ou de lipoprotéines qui assurent la prise en charge de ces protéines par leur voie d'adressage respective (Ferrandez et Condemine, 2008 ; Okuda et Tokuda, 2011 ; Ricci et Silhavy, 2012). L'hypothèse selon laquelle PnlH pourrait emprunter une nouvelle voie d'adressage des protéines à la ME a donc été émise. Dans des travaux antérieurs et durant le début de cette thèse, diverses techniques génétiques et biochimiques ont été mises au point pour identifier sans à priori les partenaires de PnlH lors de son adressage à la ME. Cependant, aucune de ces techniques n'a permis d'identifier de telles protéines et un changement de stratégie a été opéré. L'étude de la bibliographie et des caractéristiques de PnlH a été entreprise pour cibler un petit nombre de protéines qui pourraient être impliquées dans l'adressage de PnlH.

Le gène codant PnlH fait partie d'un cluster de gène qui semble avoir été acquis par transfert horizontal (Ferrandez et Condemine, 2008). Aucun gène codant pour une protéine chaperon de PnlH n'a été identifié au sein de ce cluster. De plus, lorsque PnlH est exprimée chez *E. coli*, elle est retrouvée dans la ME. Ainsi, il est clair que la voie d'adressage de PnlH n'est pas spécifique de cette dernière et semble conservée chez *E. coli* et *D. dadantii*. A ce jour, seules les voies Lol et SurA, Skp, DegP / Bam sont connues pour acheminer des protéines de ME à cette dernière. Au cours de ce travail, nous sommes donc revenus sur notre hypothèse initiale et nous avons envisagé la possibilité que PnlH emprunte la voie d'adressage des PT β ou des lipoprotéines.

La séquence signal Tat de PnlH porte l'intégralité de l'information nécessaire pour l'adressage de PnlH à la ME (Ferrandez et Condemine, 2008). Si la nature de l'information permettant l'exportation par le système Tat peut facilement être déduite de la bibliographie (Palmer et Berks, 2012), la nature de l'information permettant l'adressage de PnlH à la ME après exportation par le système Tat reste inconnue. La connaissance de cette information pourrait permettre de comprendre les mécanismes sous jacents à l'adressage de PnlH et ainsi faciliter la recherche de partenaires de PnlH. De plus, l'identification de résidus indispensables à l'adressage de PnlH pourrait permettre d'établir une signature des séquences signal Tat non clivées et ainsi faciliter la recherche dans les banques de données de protéines ancrées dans la ME de la même façon que PnlH.

Les travaux concernant ces deux aspects de notre recherche sont résumés dans l'article : « SurA is involved in the targeting to the outer membrane of a Tat signal sequence anchored protein ».



Editor: Silhavy	Section: Articles	Designation: T
--------------------	----------------------	-------------------

SurA Is Involved in the Targeting to the Outer Membrane of a Tat Signal Sequence-Anchored Protein

Arnaud Rondelet and Guy Condemine

Université de Lyon, F69003, Université Lyon 1, F69622, INSA-Lyon, F69621, and CNRS UMR5240, Microbiologie Adaptation et Pathogénie, Villeurbanne, France

The twin arginine translocation (Tat) pathway exports folded proteins from the cytoplasm to the periplasm of bacteria. The targeting of the exported proteins to the Tat pathway relies on a specific amino-terminal signal sequence, which is cleaved after exportation. In the phytopathogen *Dickeya dadantii*, the pectin lyase homologue PnlH is exported by the Tat pathway without cleavage of its signal sequence, which anchors PnlH into the outer membrane. In proteobacteria, the vast majority of outer membrane proteins consists of β -barrel proteins and lipoproteins. Thus, PnlH represents a new kind of outer membrane protein. In *Escherichia coli*, periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP work together with the β -barrel assembly machinery (Bam) to target and insert β -barrel proteins into the outer membrane. In this work, we showed that SurA is required for an efficient targeting of PnlH to the outer membrane. Moreover, we were able to detect an *in vitro* interaction between SurA and the PnlH signal sequence. Since the PnlH signal sequence contains a highly hydrophobic region, we propose that SurA protects it from the hydrophobic periplasm during targeting of PnlH to the outer membrane. We also studied the nature of the information carried by the PnlH signal sequence responsible for its targeting to the outer membrane after exportation by the Tat system.

Proteobacteria are divided into four compartments: the cytoplasm surrounded by the inner membrane (IM), which along with the outer membrane (OM) delimitates the periplasm. In order to maintain this organization, proteobacteria have evolved different processes allowing the targeting of molecules to the appropriate compartment. OM biogenesis may be the most challenging process. Indeed, OM components, synthesized in the cytoplasm, have to cross the inner membrane and the periplasm before being inserted into the OM (38). The large majority of OM proteins are either lipoproteins, anchored in the OM by an amino-terminal lipid moiety, or outer membrane integral proteins (OMPs) forming a transmembrane β barrel in the OM. Like periplasmic or some secreted proteins, OM proteins are synthesized in the cytoplasm as precursors containing an amino-terminal signal sequence specifically targeting them to either the Sec translocon or the twin arginine translocation (Tat) pathway. The bulk mass of OM proteins is exported to the periplasm in an unfolded state by the Sec translocon. However, a few proteins are folded in the cytoplasm and then targeted to the Tat translocon by a particular signal sequence containing two arginine residues in their N-terminal part (11, 32).

After exportation, OMP precursors are matured by the cleavage of their signal sequence by the signal peptidase LepB (34). Due to their propensity to form a β barrel, OMPs are prone to aggregation and have to be kept in a folding competent state during the transport from the exit of the Sec translocon to the OM. This process relies on three periplasmic proteins: (i) SurA, a chaperone that also has two peptidyl-prolyl isomerase domains and that is the main OMP-targeting factor in the periplasm of *Escherichia coli* (5, 39, 48); (ii) DegP, a multimeric protein that has both a chaperone and a protease activity depending on its oligomerization state (49); and (iii) Skp, a chaperone that has been described to bind to unfolded OMPs to protect them from aggregation (54). In *E. coli*, Skp and DegP form a rescue pathway that deals with OMPs falling off the SurA main pathway (39, 48). However, whichever periplasmic chaperone is involved in OMP transport, the last step of OMP biogenesis, folding and insertion into the OM, is catalyzed

by the β -barrel assembly machinery (Bam) complex (56). This complex of five OM proteins consists of a widely conserved OMP from the Omp85 family, BamA, and four lipoproteins, BamB, BamC, BamD, and BamE (47). Interestingly, the Bam complex has been shown to catalyze *in vitro* OMP folding and insertion into proteoliposomes in the presence of SurA, reinforcing the idea of a SurA main pathway (13). Since OMPs are not fully folded before insertion into the OM, the signal allowing their targeting to the OM should reside in the linear sequence of the protein. Consistent with this idea, the periplasmic chaperone SurA has been widely described to exhibit a preferential affinity for Ar-X-Ar sequences, where Ar is an aromatic amino acid, which are more common in OMPs than in soluble proteins because of the presence of an aromatic girdle in β barrels (15, 45). Furthermore, it has been suggested that the *E. coli* BamA could recognize OMPs via the 12 carboxy-terminal residues and notably via a carboxy-terminal phenylalanine (40). However, this signal is not the only one allowing the interaction between BamA and OMPs, and it is not conserved among all bacteria (4, 40).

Lipoprotein maturation relies on a signal peptidase (LspA) and on two enzymes involved in lipoprotein acylation (Lgt, Lnt) (14). Together, these three enzymes are responsible for signal sequence cleavage and addition of three acyl chains to the lipoprotein amino-terminal cysteine residue, resulting in the insertion of the lipoprotein lipid moiety within the IM. Lipoproteins lacking an IM retention signal (or Lol avoidance signal) are then extracted from the IM by the ABC transporter LolCDE and transferred to the chaperone LolA to form a water-soluble complex (24, 26, 58). The

Received 7 August 2012 Accepted 31 August 2012

Published ahead of print 7 September 2012

Address correspondence to Guy Condemine, guy.condemine@insa-lyon.fr.

Supplemental material for this article may be found at <http://jbs.asm.org/>.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JB.01419-12

exact nature of the Lol avoidance signal varies from one organism to another but often relies on the nature of the residues following the amino-terminal cysteine. In *E. coli*, the presence of an aspartate residue at position +2 seems to constitute the strongest Lol-CDE avoidance signal (50). Moreover, the presence of three acyl chains on the amino-terminal cysteine is indispensable for interaction with LolCDE and therefore for transfer to LolA (9). Eventually, lipoproteins are transferred in an energy-independent manner from LolA to the OM lipoprotein LolB that is thought to ensure insertion of the lipoprotein lipid moiety into the OM (25, 55).

Recent work in the gammaproteobacterial phytopathogen *Dickeya dadantii* has shown the existence of a third kind of OM protein. The pectin lyase homologue, PnlH, is anchored in the OM by an uncleaved Tat signal sequence (8). Fusion of the PnlH Tat signal sequence to various proteins allows targeting of these fusion proteins to the outer membrane. This indicates that, contrary to other OM proteins, all the information required for PnlH targeting to the OM relies in its signal sequence. Moreover, PnlH does not share any similarity (transmembrane β barrel or amino-terminal acylation) with OMPs or lipoproteins. Taken together, these data suggest the existence of a new pathway for the targeting of proteins to the OM of *D. dadantii*. Since the expression of PnlH in *E. coli* results in a correct insertion of PnlH into the OM, this pathway should be conserved in other bacteria. The aim of this work was to identify proteins involved in the targeting of this third kind of OM protein. To this end, we analyzed the impact of mutations in the OMP-targeting pathway on the targeting of PnlH to the OM of *D. dadantii*. Surprisingly, we showed that SurA is involved in the targeting of PnlH to the OM. We also studied the nature of the information carried by the PnlH signal sequence.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and oligonucleotides. The bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table 1. Oligonucleotides are listed in Table S1 in the supplemental material. *D. dadantii* and *E. coli* were grown at 30°C and 37°C, respectively, in LB medium. When required, the following antibiotics were added at the indicated concentrations: ampicillin, 100 μ g/ml; kanamycin, 25 μ g/ml; and chloramphenicol, 25 μ g/ml and 5 μ g/ml for *E. coli* and *D. dadantii*, respectively.

To construct strains A5275, A5276, A5281, A5476, A5477, and A5478, DNA fragments containing the genes *bamE*, *bamC*, *bamB*, *degP*, *skp*, and *surA*, respectively, were amplified with the corresponding primers. The resulting DNA fragments were inserted into the pGEM-T plasmid. The Kan^r cassette was extracted from pHP45 Ω Kan and inserted into the different coding sequences (CDSs), except for *skp*, for which the *uidA::Kan^r* cassette of pL247 was prepared and inserted into its CDS. All the resulting constructs were inserted into the *D. dadantii* A350 chromosome by recombination in low-phosphate medium (41). Recombinations were checked by PCR. Before phenotype analysis, all mutations were transduced into a fresh A350 background (37).

To construct plasmid pPnlH, a DNA fragment containing *pnlH* was amplified with the oligonucleotides PnlHHis⁺ and PnlHHis⁻. The resulting DNA was subcloned into pBluescript (pBS) between the SacI and ApaI sites. The resulting plasmid (pBS*pnlH*) was digested by SacI and KpnI, and the DNA fragment containing *pnlH* was inserted into pACT3. To construct plasmids carrying one or more substitutions in the PnlH-6His signal sequence, site-directed mutagenesis with appropriate primers (see Table S1 in the supplemental material) was performed. To construct pPnlHssPemA, a DNA fragment containing the CDS of the PnlH signal sequence fused to the mature form of PemA (PnlHssPemA) was amplified from the PnlH-PemA plasmid (8) with PnlHssPemA⁺ and Pnl-

HssPemA⁻. The PCR product was digested by SacI and KpnI and then inserted into pACT3. To construct pPnlH Δ 28-41, site-directed mutagenesis with primers Δ 28-41⁺ and Δ 28-41⁻ and pPnlH as the template was performed to add an extra HindIII site at nucleotide 123 of the *pnlH* CDS. The resulting DNA was digested by HindIII and recircularized to remove the DNA fragment between the two HindIII sites. To construct pSurA, the SurAStrep⁻ primer was designed to add a Strep tag at the carboxy terminus of SurA, and a DNA fragment containing *surA* was amplified with SurAStrep⁺ and SurAStrep⁻. The PCR product was inserted into pGEM-T. Insertions allowing expression of SurA with the carboxy-terminal Strep tag under the control of the pGEM-T *lac* promoter were selected. To construct pXss20, the sequence of the PnlH signal sequence was amplified with Xss20⁺ and Xss20⁻. The PCR product was inserted in frame into pGEX-6P3 between the BamHI and Sall sites downstream of the glutathione *S*-transferase (GST)-coding sequence. All constructions were checked by sequencing.

Drug sensitivity assay. The sensitivity to EDTA, SDS, and rifampin of different mutant strains was determined by disk diffusion assay. A 0.1-ml sample from an LB overnight culture was mixed with 3 ml of molten LB top agar and poured over an LB agar plate. Three 6-mm filter paper disks (Dominique Dutscher) were put on the top of molten agar, and 7.5 μ l of EDTA (0.5 M), SDS (10%, wt/wt), or rifampin (20 mg/ml) was added onto a disk. The diameters of the growth inhibition zones were measured after 16 h.

Cell fractionation. To prepare the periplasm, cells were grown overnight at 30°C in LB medium complemented with the appropriate antibiotics. Cells were harvested by centrifugation for 7 min at 5,000 \times g, and the periplasm was prepared by lysozyme treatment and osmotic shock as previously described (2). Whole-cell fractions from steady-state cultures or exponential-phase cultures were obtained by concentrating cells up to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 7.5. To prepare membranes, cells from exponential-phase cultures were harvested by centrifugation for 7 min at 5,000 \times g, concentrated up to an OD₆₀₀ of 7.5 in TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and broken with a French press. Debris was removed by centrifugation for 20 min at 7,000 \times g, and the supernatant was ultracentrifuged for 1 h at 100,000 \times g. The supernatant and the pellet were taken as the soluble fraction and membrane fraction, respectively. When necessary, membranes were separated by centrifugation for 48 h at 200,000 \times g on a 38 to 65% sucrose flotation gradient as previously described (46). Fractions were collected from the bottom of the tube and precipitated with ethanol.

To analyze the composition of the different fractions, proteins were separated by SDS-PAGE and transferred onto a PVDF membrane (Millipore). PnlH, KdgR, PemA, BlaM, and TolA were detected by immunodetection. Anti-PnlH, anti-KdgR, anti-PemA, anti-BlaM, and anti-TolA antibodies were used at dilutions of 1/3,000, 1/5,000, 1/5,000, 1/3,000, and 1/10,000, respectively. The position of the inner membrane in the sucrose gradient was detected by NADH oxidase activity assay (31) or immunoblotting with TolA antibodies; the position of porins was detected by staining the immunoblot membrane with Coomassie blue.

In vitro interactions with SurA-Strep. To prepare PnlH-6His inclusion bodies, NM522/pPnlH cells were grown at 30°C. At an OD₆₀₀ of 0.6, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added at a final concentration of 1 mM and cells were grown for an extra 2 h. Cells were harvested by centrifugation for 7 min at 5,000 \times g, concentrated up to an OD₆₀₀ of 7.5 in TE, 1 mM PMSF, and broken with a French press. The lysate was centrifuged for 20 min at 7,000 \times g, and PnlH inclusion bodies were harvested in the pellet. To get pure GST and derivatives, NM522/pGEX-6P3 or NM522/pXSS20 cells were grown at 30°C. At an OD₆₀₀ of 0.5 mM, IPTG was added at a final concentration of 1 mM and cells were grown for an extra 2 h. Cells were harvested by centrifugation for 7 min at 5,000 \times g, concentrated up to an OD₆₀₀ of 7.5 in TE, 1 mM PMSF, and broken with a French press. Triton X-100 was added at a final concentration of 1% (vol/vol). The lysate was centrifuged for 20 min at 7,000 \times g to

exact nature of the Lol avoidance signal varies from one organism to another but often relies on the nature of the residues following the amino-terminal cysteine. In *E. coli*, the presence of an aspartate residue at position +2 seems to constitute the strongest LolCDE avoidance signal (50). Moreover, the presence of three acyl chains on the amino-terminal cysteine is indispensable for interaction with LolCDE and therefore for transfer to LolA (9). Eventually, lipoproteins are transferred in an energy-independent manner from LolA to the OM lipoprotein LolB that is thought to ensure insertion of the lipoprotein lipid moiety into the OM (25, 55).

Recent work in the gammaproteobacterial phytopathogen *Dickeya dadantii* has shown the existence of a third kind of OM protein. The pectin lyase homologue, PnlH, is anchored in the OM by an uncleaved Tat signal sequence (8). Fusion of the PnlH Tat signal sequence to various proteins allows targeting of these fusion proteins to the outer membrane. This indicates that, contrary to other OM proteins, all the information required for PnlH targeting to the OM relies in its signal sequence. Moreover, PnlH does not share any similarity (transmembrane β barrel or amino-terminal acylation) with OMPs or lipoproteins. Taken together, these data suggest the existence of a new pathway for the targeting of proteins to the OM of *D. dadantii*. Since the expression of PnlH in *E. coli* results in a correct insertion of PnlH into the OM, this pathway should be conserved in other bacteria. The aim of this work was to identify proteins involved in the targeting of this third kind of OM protein. To this end, we analyzed the impact of mutations in the OMP-targeting pathway on the targeting of PnlH to the OM of *D. dadantii*. Surprisingly, we showed that SurA is involved in the targeting of PnlH to the OM. We also studied the nature of the information carried by the PnlH signal sequence.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and oligonucleotides. The bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table 1. Oligonucleotides are listed in Table S1 in the supplemental material. *D. dadantii* and *E. coli* were grown at 30°C and 37°C, respectively, in LB medium. When required, the following antibiotics were added at the indicated concentrations: ampicillin, 100 μ g/ml; kanamycin, 25 μ g/ml; and chloramphenicol, 25 μ g/ml and 5 μ g/ml for *E. coli* and *D. dadantii*, respectively.

To construct strains A5275, A5276, A5281, A5476, A5477, and A5478, DNA fragments containing the genes *bamE*, *bamC*, *bamB*, *degP*, *skp*, and *surA*, respectively, were amplified with the corresponding primers. The resulting DNA fragments were inserted into the pGEM-T plasmid. The Kan^r cassette was extracted from pHP45 Ω Kan and inserted into the different coding sequences (CDSs), except for *skp*, for which the *uidA::Kan^r* cassette of pL247 was prepared and inserted into its CDS. All the resulting constructs were inserted into the *D. dadantii* A350 chromosome by recombination in low-phosphate medium (41). Recombinations were checked by PCR. Before phenotype analysis, all mutations were transduced into a fresh A350 background (37).

To construct plasmid pPnlH, a DNA fragment containing *pnlH* was amplified with the oligonucleotides PnlHHis⁺ and PnlHHis⁻. The resulting DNA was subcloned into pBluescript (pBS) between the SacI and ApaI sites. The resulting plasmid (pBS*pnlH*) was digested by SacI and KpnI, and the DNA fragment containing *pnlH* was inserted into pACT3. To construct plasmids carrying one or more substitutions in the PnlH-6His signal sequence, site-directed mutagenesis with appropriate primers (see Table S1 in the supplemental material) was performed. To construct pPnlHssPmA, a DNA fragment containing the CDS of the PnlH signal sequence fused to the mature form of PmA (PnlHssPmA) was amplified from the PnlH-PmA plasmid (8) with PnlHssPmA⁺ and Pnl-

HssPmA⁻. The PCR product was digested by SacI and KpnI and then inserted into pACT3. To construct pPnlH Δ 28-41, site-directed mutagenesis with primers Δ 28-41⁺ and Δ 28-41⁻ and pPnlH as the template was performed to add an extra HindIII site at nucleotide 123 of the *pnlH* CDS. The resulting DNA was digested by HindIII and recircularized to remove the DNA fragment between the two HindIII sites. To construct pSurA, the SurAStrep⁻ primer was designed to add a Strep tag at the carboxy terminus of SurA, and a DNA fragment containing *surA* was amplified with SurAStrep⁺ and SurAStrep⁻. The PCR product was inserted into pGEM-T. Insertions allowing expression of SurA with the carboxy-terminal Strep tag under the control of the pGEM-T *lac* promoter were selected. To construct pXss20, the sequence of the PnlH signal sequence was amplified with Xss20⁺ and Xss20⁻. The PCR product was inserted in frame into pGEX-6P3 between the BamHI and SalI sites downstream of the glutathione S-transferase (GST)-coding sequence. All constructions were checked by sequencing.

Drug sensitivity assay. The sensitivity to EDTA, SDS, and rifampin of different mutant strains was determined by disk diffusion assay. A 0.1-ml sample from an LB overnight culture was mixed with 3 ml of molten LB top agar and poured over an LB agar plate. Three 6-mm filter paper disks (Dominique Dutscher) were put on the top of molten agar, and 7.5 μ l of EDTA (0.5 M), SDS (10%, wt/wt), or rifampin (20 mg/ml) was added onto a disk. The diameters of the growth inhibition zones were measured after 16 h.

Cell fractionation. To prepare the periplasm, cells were grown overnight at 30°C in LB medium complemented with the appropriate antibiotics. Cells were harvested by centrifugation for 7 min at 5,000 \times g, and the periplasm was prepared by lysozyme treatment and osmotic shock as previously described (2). Whole-cell fractions from steady-state cultures or exponential-phase cultures were obtained by concentrating cells up to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 7.5. To prepare membranes, cells from exponential-phase cultures were harvested by centrifugation for 7 min at 5,000 \times g, concentrated up to an OD₆₀₀ of 7.5 in TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and broken with a French press. Debris was removed by centrifugation for 20 min at 7,000 \times g, and the supernatant was ultracentrifuged for 1 h at 100,000 \times g. The supernatant and the pellet were taken as the soluble fraction and membrane fraction, respectively. When necessary, membranes were separated by centrifugation for 48 h at 200,000 \times g on a 38 to 65% sucrose flotation gradient as previously described (46). Fractions were collected from the bottom of the tube and precipitated with ethanol.

To analyze the composition of the different fractions, proteins were separated by SDS-PAGE and transferred onto a PVDF membrane (Millipore). PnlH, KdgR, PmA, BlaM, and TolA were detected by immunodetection. Anti-PnlH, anti-KdgR, anti-PmA, anti-BlaM, and anti-TolA antibodies were used at dilutions of 1/3,000, 1/5,000, 1/5,000, 1/3,000, and 1/10,000, respectively. The position of the inner membrane in the sucrose gradient was detected by NADH oxidase activity assay (31) or immunoblotting with TolA antibodies; the position of porins was detected by staining the immunoblot membrane with Coomassie blue.

In vitro interactions with SurA-Strep. To prepare PnlH-6His inclusion bodies, NM522/pPnlH cells were grown at 30°C. At an OD₆₀₀ of 0.6, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added at a final concentration of 1 mM and cells were grown for an extra 2 h. Cells were harvested by centrifugation for 7 min at 5,000 \times g, concentrated up to an OD₆₀₀ of 7.5 in TE, 1 mM PMSF, and broken with a French press. The lysate was centrifuged for 20 min at 7,000 \times g, and PnlH inclusion bodies were harvested in the pellet. To get pure GST and derivatives, NM522/pGEX-6P3 or NM522/pXSS20 cells were grown at 30°C. At an OD₆₀₀ of 0.5 mM, IPTG was added at a final concentration of 1 mM and cells were grown for an extra 2 h. Cells were harvested by centrifugation for 7 min at 5,000 \times g, concentrated up to an OD₆₀₀ of 7.5 in TE, 1 mM PMSF, and broken with a French press. Triton X-100 was added at a final concentration of 1% (vol/vol). The lysate was centrifuged for 20 min at 7,000 \times g to

TABLE 1 Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or Reference
Strain		
<i>D. dadantii</i> 3937 derivatives		
A350	<i>rafR ganB</i>	17
A5275	<i>rafR ganB bamE::Kan^r</i>	This study
A5276	<i>rafR ganB bamC::Kan^r</i>	This study
A5281	<i>rafR ganB bamB::Kan^r</i>	This study
A5476	<i>rafR ganB degP::Kan^r</i>	This study
A5477	<i>rafR ganB skp::uidA Kan^r</i>	This study
A5478	<i>rafR ganB surA::Kan^r</i>	This study
<i>Escherichia coli</i>		
NM522	F' <i>proAB lacI^q Δ(lacZ)M15 Δ(lac-proAB) thi hsd-5</i>	Stratagene
SR1458	F- <i>araD139 Δ(argF-lac)U169 φ(PdegP-lacZ)</i>	36
Plasmids		
pGEM-T	Amp ^r ; allows the AT cloning of a PCR product	Promega
pBluescript	pUC <i>ori</i> Amp ^r	Stratagene
pACT3	pACYC <i>ori</i> Cm ^r	23
pL247	Amp ^r <i>uidA::Kan^r</i> cassette	Laboratory collection
pHP45ΩKan	pMB1 <i>ori</i> Amp ^r Kan ^r cassette	7
pGEX-6P3	pBR322 <i>ori</i> Amp ^r , codes for GST	GE Healthcare
pGEM-T <i>surA</i>	Contains the DNA fragment amplified with SurA+ and SurA-	This study
pGEM-T <i>surA::Kan^r</i>	pHP45ΩKan Kan ^r cassette in the HindIII site of pGEM-T <i>surA</i>	This study
pGEM-T <i>skp</i>	Contains the DNA fragment amplified with Skp+ and Skp-	This study
pGEM-T <i>skp::Kan^r</i>	pL247 <i>uidA::Kan^r</i> cassette in the PstI site of pGEM-T <i>skpΔPstI</i>	This study
pGEM-T <i>degP</i>	Contains the DNA fragment amplified with DegP+ and DegP-	This study
pGEM-T <i>degP::Kan^r</i>	pHP45ΩKan Kan ^r cassette in the MunI site of pGEM-T <i>degP</i>	This study
pGEM-T <i>bamB</i>	Contains the DNA fragment amplified with BamB+ and BamB-	This study
pGEM-T <i>bamB::kan^r</i>	pHP45ΩKan Kan ^r cassette in the BclI site of pGEM-T <i>bamB</i>	This study
pGEM-T <i>bamC</i>	Contains the DNA fragment amplified with BamC+ and BamC-	This study
pGEM-T <i>bamC::kan^r</i>	pHP45ΩKan Kan ^r cassette in the BclI site of pGEM-T <i>bamC</i>	This study
pGEM-T <i>bamE</i>	Contains the DNA fragment amplified with BamE+ and BamE-	This study
pGEM-T <i>bamE::kan^r</i>	pHP45ΩKan Kan ^r cassette between BamHI sites of pGEM-T <i>bamE</i>	This study
pGEMt <i>pnlH</i>	Contains the DNA fragment amplified with PnlHHis+ and PnlHHis-	This study
pBS <i>pnlH</i>	Insertion of pGEM-T <i>pnlH</i> Apal SacI DNA fragment containing <i>pnlH</i> CDS in pBS	This study
pPnlH	pACT3 containing the gene of PnlH with a C-terminal His tag between SacI and KpnI sites	This study
PnlH-PemA	pBAD ₁₈ containing a fusion of the PnlH signal sequence with the mature form of PemA	8
pPnlHssPemA	pACT3 containing a fusion of the PnlH signal sequence with the mature form of PemA	This study
pD16A	pPnlH containing a D16A substitution in PnlH	This study
pL30SL31T	pPnlH containing L30SL31T substitutions in PnlH	This study
pP32L	pPnlH containing a P32L substitution in PnlH	This study
pF34A	pPnlH containing a F34A substitution in PnlH	This study
pP35A	pPnlH containing a P35A substitution in PnlH	This study
pP32LP35A	pPnlH containing P32LP35A substitutions in PnlH	This study
pY36A	pPnlH containing a Y36A substitution in PnlH	This study
pQ41A	pPnlH containing a Q41A substitution in PnlH	This study
pPnlHΔ28-41	pPnlH containing a deletion of nucleotides 81 to 123	This study
pSurA	pGEM-T containing SurA with a C-terminal Strep tag under the control of the <i>lac</i> promoter	This study
pXss20	pGEX-6P3 containing of a fusion of GST with the first 41 amino acids of PnlH	This study

removed debris, and the supernatant was loaded onto Protino glutathione agarose 4B (Macherey-Nagel) resin previously equilibrated with TES (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl), 1% (vol/vol) Triton X-100. The resin was then washed 3 times with TES, 1% (vol/vol) Triton X-100. GST and derivatives were eluted with 2× Laemmli buffer. For overlay experiments, samples containing proteins of interest were run on an SDS-polyacrylamide gel and transferred onto a PVDF membrane. The membrane was saturated with 4% gelatin in phosphate-buffered saline (PBS; 81 mM Na₂HPO₄, 19 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7.4). As after all following steps, the membrane was washed 3 times for 5 min each time with PBS containing 1% gelatin (PBS-G). After incubation for 45 min at room temperature with 8.5 ml of PBS-G complemented with 1.5

ml of periplasm containing or not SurA-Strep, the membrane was washed and finally incubated for 45 min with streptavidin conjugated with horseradish peroxidase (HRP; Pierce) at a dilution of 1/30,000 in PBS-G. After the membrane was washed, an Immobilon Western ECL kit (Millipore) was used to reveal the membrane. In order to compare two conditions of overlay, samples were loaded twice on a gel, the resulting membrane was cut in two, and both parts were treated in parallel.

β-Galactosidase assays. Cells from overnight cultures were diluted to an OD₆₀₀ of approximately 0.02 and grown at 33°C to an OD₆₀₀ of 0.5 in LB medium supplemented with the appropriate antibiotic and 1 mM IPTG. Growth was stopped by adding toluene, and β-galactosidase activity was assayed on permeabilized cells as previously de-

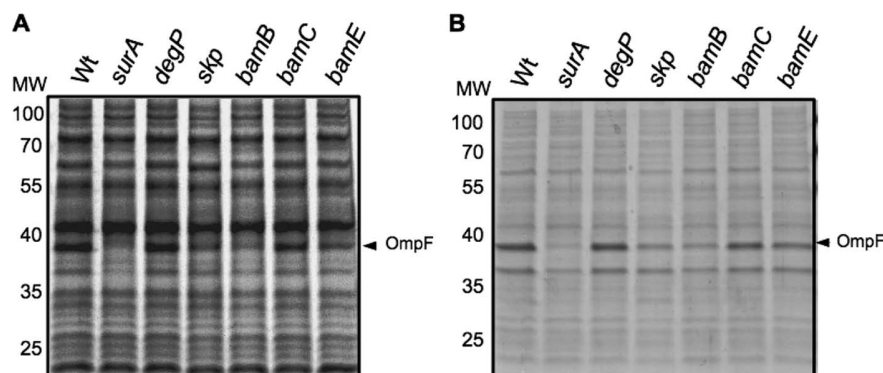


FIG 1 Porin depletion in *D. dadantii* mutants with mutations in the OMP-targeting pathway. Protein profiles of whole cells of *D. dadantii* wild-type (Wt) strain A350 and derivative strains (indicated at the top) carrying the chromosomal mutation (A) and protein profiles of membrane fractions of the same strains (B). Equivalent amounts of cell materials from exponential-phase cultures of the different strains were separated by SDS-PAGE, followed by Coomassie blue staining. The arrowhead indicates the *D. dadantii* major porin OmpF. MW, molecular weight (in thousands).

scribed (28). Three independent replications were averaged to obtain the indicated values.

RESULTS

Analysis of *D. dadantii* mutants in the OMP-targeting pathway.

In *E. coli*, the OMP-targeting pathway mainly relies on the three periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP and on the OM complex BamABCDE. The *D. dadantii* genome contains homologues of *E. coli* *surA*, *skp*, *degP*, *bamA*, *bamB*, *bamC*, *bamD*, and *bamE* encoded by the loci ADN00090, ADM97288, ADM99598, ADM97287, ADM99516, ADM97479, ADM99647, and ADM97110, respectively. Notably, all these loci were found in a genetic context similar to that in *E. coli*. Since *bamA* and *bamD* mutations are lethal in *E. coli*, these genes were excluded from our analysis (22, 51). *D. dadantii* *surA*, *skp*, *degP*, *bamB*, *bamC*, and *bamE* mutant strains were constructed by insertion of a kanamycin resistance cassette. Mutant strains did not exhibit obvious growth defects, indicating that, as in *E. coli*, none of these genes is essential in *D. dadantii*. To check the effect of these mutations on OMP biogenesis, an analysis of the protein profiles of whole-cell and membrane fractions of the corresponding strains was performed (Fig. 1). Compared to the wild-type strain, the *surA* mutant exhibited a strong decrease in the quantity of the major porin OmpF in both whole-cell and membrane fractions. This decrease was also observed to a lower extent for the *skp* and *bamB* mutants. This indicates that the OMP-targeting pathway is at least partially affected in these three mutants. Accordingly, *surA*, *skp*, and *bamB* mutants also presented an increased sensitivity to SDS, EDTA, and rifampin (Table 2), indicating that the integrity of their outer membrane is affected (43). The *bamE* mutant presented a weak but reproducible decrease in the quantity of OmpF and an increased sensitivity to EDTA and, to a lower extent, to rifampin, indicating an alteration of its OM biogenesis. Taken together, these data suggest that in *D. dadantii*, as in *E. coli*, SurA is the major periplasmic factor for OMP targeting. Moreover, the relative importance of each component of the Bam complex in OM biogenesis seems to be conserved between *D. dadantii* and *E. coli*.

Efficient targeting of PnlH to the OM depends on SurA but not on Skp and DegP. To determine if the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP could be involved in PnlH targeting to the OM, we checked PnlH localization in corresponding *D. dadantii*

mutant strains. Since PnlH is not expressed in strain A350 and derivatives under the conditions used in this study (8), we expressed PnlH with a carboxy-terminal 6His tag (PnlH-6His) from a pACT3 plasmid (pPnlH). Additionally, expression of PnlH-6His from this plasmid allowed us to avoid any possible feedback regulatory effect due to the activation of the σ^E stress response, as described for the *E. coli* *surA* mutant (42). Cell and membrane separation experiments showed that PnlH-6His is mostly located in the OM, when expressed in the wild-type *D. dadantii* A350 strain (see Fig. S1 in the supplemental material). To analyze PnlH-6His localization in the different genetic backgrounds, appropriate strains were transformed with the pPnlH plasmid. The amount of PnlH-6His in whole-cell fractions of *skp* and *degP* mutants was equivalent to that for the wild-type strain but was strongly decreased for the *surA* mutant (Fig. 2A). Accordingly, the same diminution was observed in the membrane and soluble fractions of the last mutant (Fig. 2A). This phenomenon was not due to a global protein synthesis/stability decrease, since the level of the IM protein TolA was identical in the membrane fraction of all the tested strains (Fig. 2A). To determine if the small amount of PnlH-6His present in the *surA* mutant membrane fraction was in the IM or the OM, we performed membrane separation on a flotation sucrose gradient. However, we were not able to properly sepa-

TABLE 2 Growth inhibition of *D. dadantii* mutants for the OMP targeting pathway^a

Strain	Mutated gene	Inhibition zone diam (mm)		
		SDS (10%)	EDTA (0.5 M)	Rifampin (20 mg/ml)
A350	Wild type	11 ± 0	19 ± 2	16 ± 1
A5275	<i>bamE</i>	14 ± 1	29 ± 1	21 ± 1
A5276	<i>bamC</i>	13 ± 1	20 ± 1	17 ± 1
A5281	<i>bamB</i>	19 ± 1	32 ± 1	22 ± 0
A5476	<i>degP</i>	12 ± 1	24 ± 2	16 ± 1
A5477	<i>skp</i>	18 ± 1	30 ± 1	25 ± 1
A5478	<i>surA</i>	17 ± 0	31 ± 1	22 ± 1

^a Sensitivity to SDS (10%), EDTA (0.5 M), and rifampin (20 mg/ml) was determined by measuring the growth inhibition zone on LB agar plates topped with filter paper disks containing these compounds, as described in Materials and Methods. The values indicated are the means of 3 experiments.

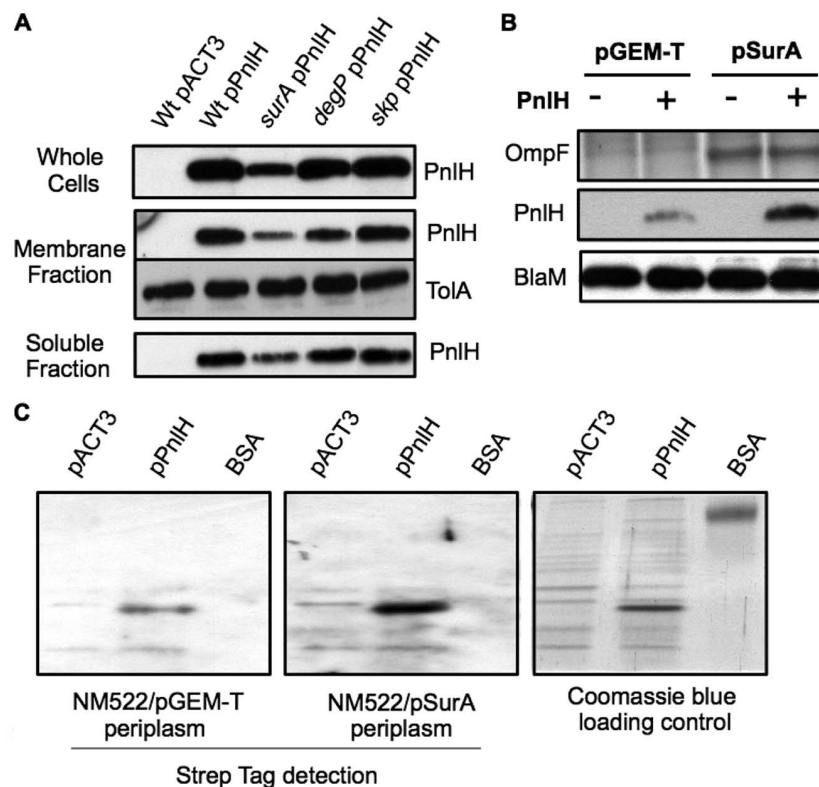


FIG 2 Role of periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in the targeting of PnlH-6His to the OM of *D. dadantii*. (A) Immunodetection of PnlH in whole-cell, membrane, and soluble fractions of *D. dadantii* wild-type strain and derivative strains carrying a chromosomal mutation (indicated at the top) and either empty pACT3 vector or pPnlH. Equivalent amounts of cell material from exponential-phase cultures of the different strains were loaded in each well. Immunodetection of the inner membrane protein TolA was used as a loading control. (B) Complementation of a *surA* mutant carrying either empty pACT3 vector or pPnlH with either empty pGEM-T vector or pSurA. Equivalent amounts of whole cells of steady-state cultures were analyzed. Proteins were separated on an SDS-polyacrylamide gel and transferred onto a PVDF membrane for immunodetection of PnlH and BlaM (loading control). OmpF was detected by SDS-PAGE, followed by Coomassie blue staining. (C) The *in vitro* interaction between PnlH-6His and SurA-Strep was assayed by overlay. BSA and cell lysates of NM522 carrying either empty pACT3 vector or pPnlH were separated by SDS-PAGE and transferred onto a PVDF membrane. The membrane was next incubated with the periplasm of NM522 carrying either empty pGEM-T vector or pSurA. SurA-Strep bound to proteins on the membrane was detected with streptavidin conjugated with HRP. The amounts of protein loaded on the gel were estimated by Coomassie blue staining.

rate the IM from the OM of the *surA* mutant. This observation is consistent with the decreased OM density described for an *E. coli surA* mutant strain (48). Since *surA* is part of an operon, we tested whether the decrease in PnlH-6His level in the *surA* mutant was due to a polar effect. When SurA carrying a carboxy-terminal Strep tag (SurA-Strep) was expressed from plasmid pSurA, wild-type quantities of OmpF and PnlH-6His were restored in the *surA* mutant (Fig. 2B). These results indicate that the effect of the *surA* mutation on OmpF and PnlH stability is not due to a polar effect.

Our data suggest that SurA could be involved directly or indirectly in the stabilization of PnlH in the periplasm. Overlay experiments have previously been used to demonstrate the interaction of SurA with the passenger domain of the *E. coli* autotransporter EspP (44). We performed such an experiment to assess whether PnlH can interact directly with SurA *in vitro*. To this end, PnlH-6His was immobilized on a PVDF membrane and used as a matrix to detect a possible interaction with SurA-Strep. The membrane was incubated with either the periplasm of an *E. coli* strain expressing SurA-Strep or the periplasm of an *E. coli* control strain. The use of streptavidin conjugated with HRP allowed us to detect SurA-Strep bound on the immobilized PnlH-6His (Fig. 2C). No

interaction between SurA-Strep and the control, bovine serum albumin (BSA), could be detected in this way, indicating that SurA-Strep specifically binds to PnlH-6His. Taken together, these data indicate that SurA is able to bind to PnlH *in vitro*. Moreover, since a *surA* mutation leads to a strong decrease in PnlH stability, it is likely that SurA is involved in the targeting of PnlH to the OM by preventing its periplasmic degradation.

SurA is able to interact with the PnlH signal sequence. SurA is thought to ensure a specific targeting of OMPs by binding to Ar-X-Ar motifs, which are particularly enriched in OMPs (15). To ensure a specific targeting of PnlH to the OM, SurA should also recognize and bind a specific signal within this protein. Since a fusion of the PnlH signal sequence to the mature form of the *D. dadantii* pectin methyltransferase PemA (PnlHssPemA) is sufficient to target it to the OM of *D. dadantii* (8), we hypothesized that the PnlH signal sequence could contain the SurA recognition site. To test this hypothesis, we examined whether PnlHssPemA is dependent on SurA for its targeting to the OM. First, we checked the expression and the localization of PnlHssPemA in the wild-type strain A350 carrying the pPnlHssPemA plasmid. Antibody directed against PemA detected two bands in the cells producing this fusion (Fig. 3A). After cell fractionation, the upper band (indi-

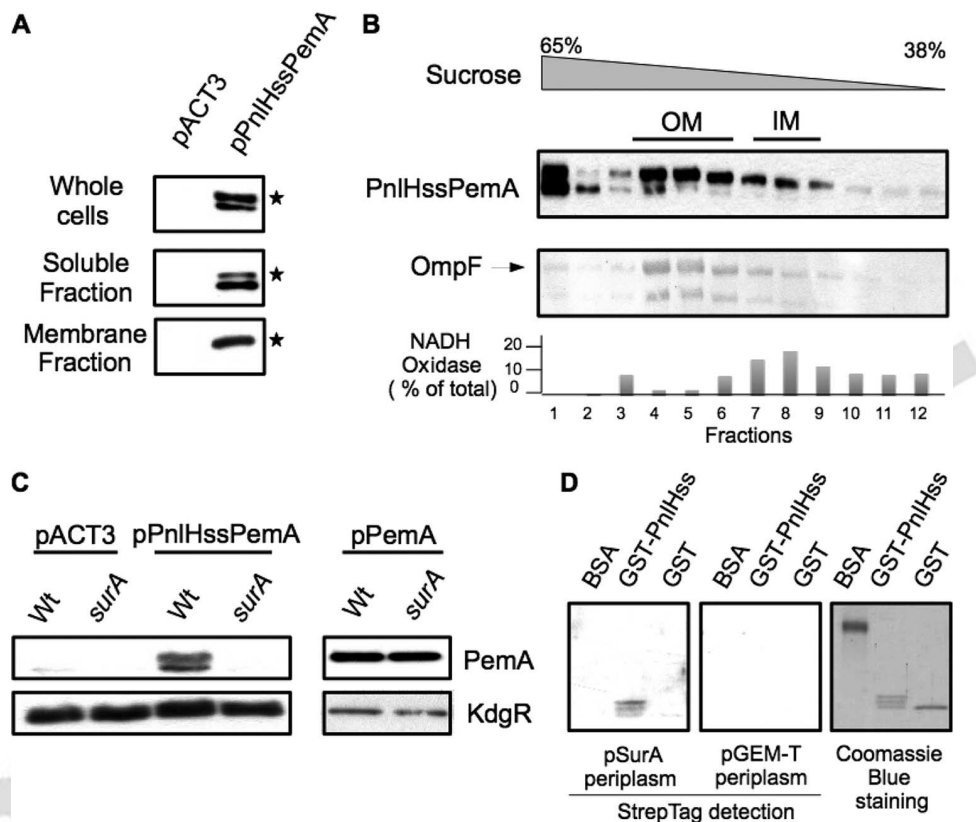


FIG 3 Role of the PnlH signal sequence in the interaction with SurA. (A) Cell fractionation of *D. dadantii* A350 strains carrying either empty pACT3 vector or pPnlHssPemA. PnlHssPemA was detected with antibodies against PemA. Equivalent amounts of cell materials from exponential-phase cultures of the different strains were loaded in each well. (B) The membrane fraction from strain A350 carrying pPnlHssPemA was separated by flotation sucrose gradient centrifugation and analyzed by immunoblotting with PemA antibodies or stained with Coomassie blue to detect the major porin, OmpF, which reflects the position of the outer membrane. NADH oxidase activity indicates the position of the inner membrane. (C) Immunodetection of PemA in whole cells of *D. dadantii* wild-type strain A350 and a *surA* mutant carrying either empty pACT3 vector or pPnlHssPemA. Equivalent amounts of cell material from steady-state cultures were loaded in each well. The cytoplasmic protein KdgR was used as a loading control. (D) The *in vitro* interaction between the PnlH signal sequence and SurA-Strep was assayed by overlay. Purified BSA, GST, and GST fused to the PnlH signal sequence (GST-PnlHss) were run on an SDS-polyacrylamide gel and transferred onto a PVDF membrane. The membrane was next incubated with the periplasm of NM552 carrying either empty pGEM-T vector or pSurA. SurA-Strep bound to proteins on the membrane was detected with streptavidin conjugated with HRP. The amounts of protein loaded on the gel were estimated by Coomassie blue staining.

cated by a star) was mainly found in the membranes. The smallest one was found in the soluble fraction and could be a degradation product. Membrane separation on a sucrose gradient showed that the upper band was associated with the OM, while the lower band remained at the bottom of the gradient (Fig. 3B). Contrary to the wild-type strain, no PnlHssPemA was detected in the *surA* mutant (Fig. 3C), suggesting that its stability was affected in the absence of SurA. Since a *surA* mutation has no effect on the amount of the native PemA expressed from pACT3 (Fig. 3C), we concluded that the PnlH signal sequence is responsible for the degradation of PnlHssPemA in the *surA* mutant and that it could be the part of PnlH that interacts with SurA. Since SurA interacts *in vitro* with full-length PnlH in an overlay experiment, we verified if SurA could bind the PnlH signal sequence. For this purpose, the first 41 amino acids of PnlH were fused to the carboxy-terminal end of the GST (GST-PnlHss). When GST-PnlHss was produced in NM552, it was mostly found in inclusion bodies, indicating a high propensity of the PnlH signal sequence to aggregate. Purification of GST-PnlHss on glutathione agarose generated three forms of the protein (Fig. 3D, right). Apparently, the upper band corresponds to

the full-length GST-PnlHss and the smaller bands correspond to degradation products. Overlay experiments showed interactions between SurA-Strep and the different forms of GST-PnlHss (Fig. 3D). Since a larger amount of SurA-Strep bound to the full-length GST-PnlHss and since SurA-Strep did not bind to GST or BSA, we concluded that the interaction between SurA-Strep and GST-PnlHss was due to the PnlH signal sequence. Altogether, these data suggest that SurA is able to recognize and bind the PnlH signal sequence to protect PnlH from degradation in the periplasm.

The secondary structure of the PnlH signal sequence could be an important factor for the targeting of PnlH to the OM. If it is clear that the PnlH signal sequence is responsible for the targeting of PnlH to the OM, the exact nature of the information carried by this signal sequence remains unknown. The only known homologue of the *D. dadantii* PnlH can be found in *D. zeae*, and alignment of the two signal sequences reveals that besides the Tat consensus, the carboxy-terminal part of the signal sequence is the most conserved (Fig. 4A). To check whether this part of the signal sequence could carry a signal for the targeting of PnlH, we con-

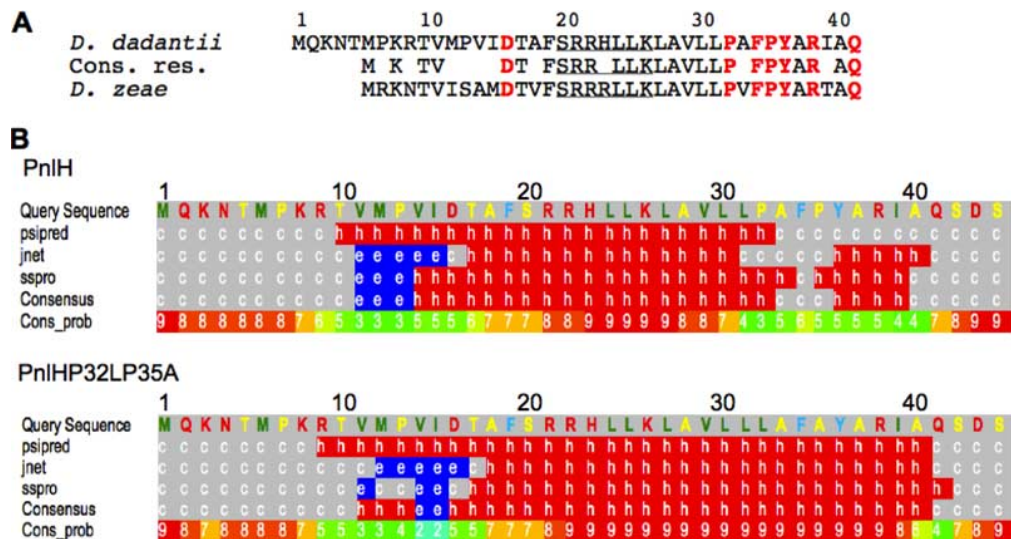


FIG 4 *In silico* analysis of the PnlH signal sequence. (A) Amino acid sequence alignment of PnlH from *D. dadantii* (upper line, GenBank accession number YP_003883450.1) and *D. zeae* (lower line, GenBank accession number YP_003005603.1). Conserved residues (Cons. res.) are indicated in the middle line. The Tat consensus is underlined. Residues that were substituted are in red bold. (B) Secondary structure prediction of the first 41 residues of PnlH and PnlHP32LP35A by the Phyre protein fold recognition software (available at www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/). Letters indicate the type of secondary structure predicted at the corresponding amino acid site (h, alpha helix; c, coil; e, β sheet). Numbers indicate the reliability of the prediction on a scale of from 0 (low) to 9 (high).

structured a deletion of the region between residues 28 and 41 (PnlH Δ 28-41). When PnlH Δ 28-41 was expressed in *D. dadantii* wild-type strain A350, its distribution between the soluble and the membrane fractions was similar to that for wild-type PnlH (Fig. 5A), and sucrose gradient separation failed to properly separate the membranes. The protein seemed to be present in both membranes (Fig. 5B). This observation could indicate that the region of the PnlH signal sequence contained between residues 28 and 41 carries a signal necessary to the proper targeting of PnlH to the OM. To identify such a putative signal, we realized amino acid substitutions in this region of the PnlH signal (Fig. 4A). Additionally, we replaced aspartate 16, which is the only negatively charged amino acid in the PnlH signal sequence. When PnlHD16A, PnlHP32L, PnlHF34A, PnlHP35A, PnlHY36A, and PnlHQ41A were expressed in strain A350, PnlHD16A was the only one whose amount was significantly decreased in comparison with that of the wild-type PnlH (Fig. 5C, left). This decrease was also observed in the membrane fraction prepared from strain A350 expressing PnlHD16A (Fig. 5D). This phenomenon could be linked either to a periplasmic instability of PnlHD16A or to its incapacity to be exported or inserted in the OM, leading to degradation. Accumulation of misfolded or aggregated proteins in the periplasm leads to the activation of periplasmic stress responses that increase the expression of many periplasmic factors, such as DegP, that help to release the stress (18). Since the stress response is highly compartmentalized (29), we tested whether PnlHD16A could induce a periplasmic stress. A positive result would mean that PnlHD16A is still exported to the periplasm. For this purpose, we expressed PnlHD16A in *E. coli* strain SR1458, carrying a chromosomal fusion between the *degP* promoter and *lacZ*. Since PnlHD16A induced the *degP-lacZ* fusion approximately 1.5-fold more than the wild-type PnlH (Fig. 5E), we concluded that PnlHD16A is able to induce a periplasmic stress response and is therefore exported to the periplasm.

None of the single substitutions that we realized in the region between residues 28 and 41 presented a defect in its stability. Therefore, we searched for a signal that could not rely on only one amino acid. To identify this signal, we used the Phyre protein fold recognition software to predict an eventual secondary structure in the PnlH signal sequence. Phyre establishes a consensus between PsiPred, jnet, and sspro secondary structure prediction algorithms and is thus considered reliable structure prediction software (19). According to the Phyre consensus prediction, the most probable secondary structure that could be present in the PnlH signal sequence is a 19-residue-long alpha helix (residues 14 to 32) that contains both the Tat consensus motif (residues 20 to 26) and a region rich in hydrophobic residues (residues 24 to 31) (Fig. 4B). Interestingly, the region between residues 28 and 41 contains two prolines, which are good alpha-helix breakers and which could be involved in the introduction of a coiled region after the predicted alpha helix. To test the importance of these two prolines, we constructed the double substitution P32L P35A (PnlHP32LP35A). The predicted alpha helix in PnlHP32LP35A was significantly longer than the one in the wild-type PnlH (Fig. 4B), suggesting that prolines 32 and 35 could determine the length of the alpha helix in the PnlH signal sequence. When PnlHP32LP35A was expressed in strain A350, only a protein migrating faster than the wild-type PnlH and present in a smaller quantity could be detected in whole cells (Fig. 5C, left). After cell fractionation, this protein was found to be present in the membrane fraction (Fig. 5D), and when membranes were separated on a sucrose gradient, it was mostly found in the OM (see Fig. S2A in the supplemental material). Interestingly, when PnlHP32LP35 was expressed in *E. coli*, it was present in two forms, one migrating as the wild-type PnlH and one migrating faster (see Fig. S2B in the supplemental material), indicating that the protein that is associated with the OM in the *D. dadantii* A350 strain is a degradation product of PnlHP32LP35A. Since we were able to detect the fast-migrating form of PnlHP32LP35A

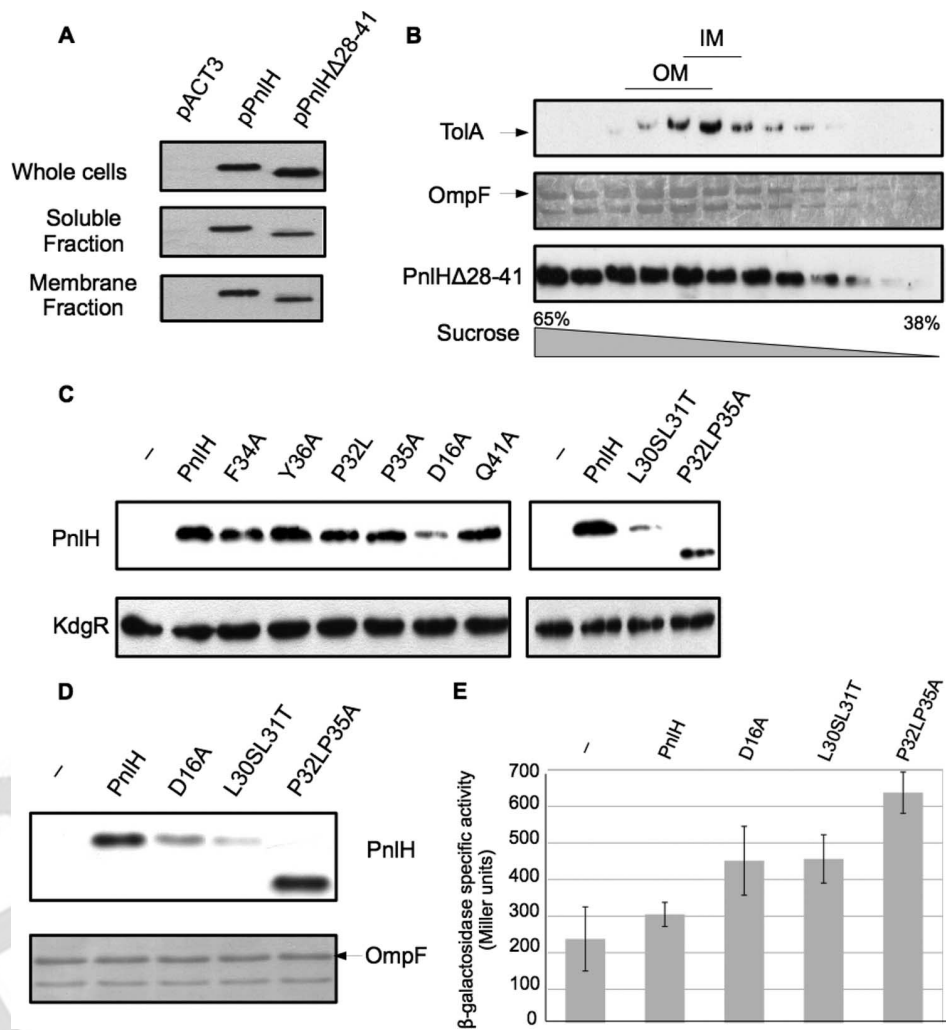


FIG 5 Study of the PnlH signal sequence by directed mutagenesis. (A) Cell fractionation of *D. dadantii* A350 strains carrying either empty pACT3 vector, pPnlH, or pPnlH Δ 28-41. PnlH and PnlH Δ 28-41 were detected with antibodies against PnlH. Equivalent amounts of cell materials from exponential-phase cultures of the different strains were loaded in each well. (B) The membrane fraction from strain A350 carrying pPnlH Δ 28-41 was separated by flotation sucrose gradient centrifugation and analyzed by immunoblotting with PemaA antibodies or stained with Coomassie blue to detect the major porin OmpF, which reflects the position of the outer membrane. Immunoblotting with TolA antibodies indicates the position of the inner membrane. (C) Immunodetection of PnlH in whole-cell lysates of *D. dadantii* A350 strains carrying either empty pACT3 vector (-) or pPnlH (PnlH) or pPnlH derivatives carrying one or two substitutions in the PnlH signal sequence. Equivalent amounts of cell material from steady-state cultures were loaded in each well. Immunoblotting with KdgR antibodies was used as a loading control. (D) Membrane fraction of A350 strains carrying either empty pACT3 vector (-), pPnlH (PnlH), pD16A (D16A), pL30SL31T (L30SL31T), or pP32LP35A (P32LP35A). PnlH and derivatives were detected with antibodies against PnlH. Equivalent amounts of membrane fractions from exponential-phase cultures were loaded in each well. OmpF was visualized by the coloration of the PVDF membrane with Coomassie blue and served as a loading control. (E) Induction of periplasmic stress in *E. coli* SR1458 expressing PnlH and derivatives. *E. coli* SR1458 carrying either empty pACT3 vector (-), pPnlH (PnlH), pD16A (D16A), pL30SL31T (L30SL31T), or pP32LP35A (P32LP35A) was grown at 33°C in LB medium supplemented with chloramphenicol and 1 mM IPTG. The value for β -galactosidase specific activity is the average of three independent determinations.

through its carboxy-terminal His tag (see Fig. S2C in the supplemental material), we concluded that this extremity was intact and that the degradation should have occurred at the amino-terminal part of the protein. Expression of PnlHP32LP35A in *E. coli* strain SR1458 provoked a strong increase in the expression of the *degP-lacZ* fusion (approximately 2-fold) (Fig. 5E), indicating that PnlHP32LP35A is able to induce a periplasmic stress response and is therefore exported to the periplasm. Altogether, these data suggest that the double substitution P32L P35A strongly affects the stability of the PnlH signal sequence without impairing its targeting to the OM.

The predicted alpha helix of the PnlH signal sequence is rich in hydrophobic residues (residues 24 to 31). To decrease the global hydrophobicity of the predicted alpha helix, leucines 30 and 31 were replaced by serine and threonine (PnlHL30SL31T). When PnlHL30SL31T was expressed in the *D. dadantii* A350 strain, it was barely detectable in either the whole-cell (Fig. 5C) or the membrane (Fig. 5D) fraction. Moreover, expression of PnlHL30SL31T in *E. coli* strain SR1458 provoked a significant increase in β -galactosidase activity (approximately 1.5-fold) (Fig. 5E), indicating that PnlHL30SL31T is able to induce a periplasmic stress response. These data suggest that the reduction of the hydrophobicity in the

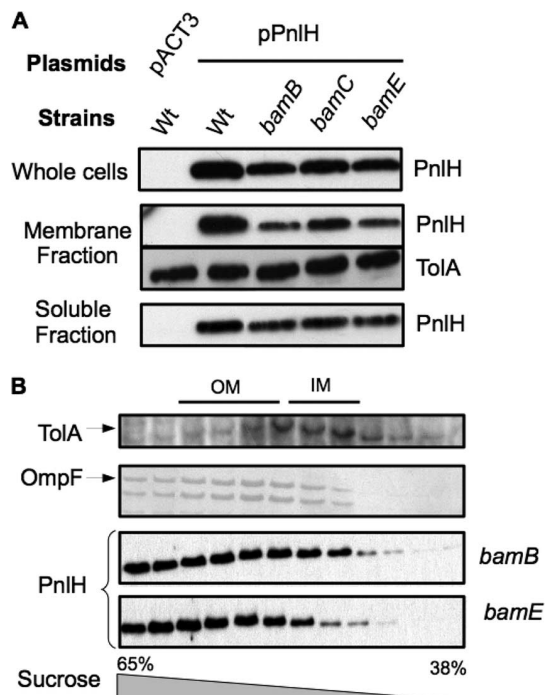


FIG 6 Effect of *bamB*, *bamC*, and *bamE* mutations on the targeting of PnlH-6His to the OM of *D. dadantii*. (A) Immunodetection of PnlH in whole-cell, membrane, and soluble fractions of *D. dadantii* wild-type strain A350 and derivative strains carrying chromosomal mutations (indicated at the top) and either empty pACT3 vector or plasmid pPnlH. Equivalent amounts of cell materials from exponential-phase cultures of the different strains were loaded in each well. Immunodetection of the inner membrane protein TolA was used as a loading control. (B) The membrane fractions from the *bamB* and *bamE* mutant strains carrying pPnlH were separated by flotation sucrose gradient centrifugation and analyzed by immunoblotting with PnlH antibodies or stained with Coomassie blue to detect the major porins, which reflect the position of the outer membrane. Immunoblotting with TolA antibodies indicates the position of the inner membrane. For clarity, porins and TolA profiles are presented only for the *bamB* mutant, but the profiles were equivalent for the *bamE* mutant.

predicted alpha helix of the PnlH signal sequence significantly impairs the stability of the protein and could alter its targeting to the OM.

***bamB* and *bamE* null mutations affect the stability of PnlH in *D. dadantii*.** By interacting with SurA, PnlH seems to follow the main pathway used by OMPs. Therefore, PnlH could also depend on a functional Bam system to be inserted into the membrane. To assess this question, we studied the targeting of PnlH to the membranes of *D. dadantii* lacking different components of the Bam system. In comparison to wild-type strain A350, a somewhat smaller quantity of PnlH was detected in the cells of the *bamB* and *bamE* strains (Fig. 6A, top). This difference became more evident in the membrane fraction prepared from these strains (Fig. 6A, middle). Since similar quantities of the IM protein TolA were detected in all these strains (Fig. 6A, bottom), the observed diminution of PnlH quantity was specific. However, separation of the *bamB* and *bamE* mutant membranes on a sucrose gradient showed that PnlH-6His is still efficiently associated with the OM of these mutants (Fig. 6B). Moreover, the level of PnlH-6His-targeting defect in the three mutants was proportional to the level of OMP-targeting defect observed in the same mutants (Fig. 1).

Taken together, these data show that *bamB* and *bamE* null mutations slightly affect the stability of PnlH without clearly affecting its targeting to the OM.

DISCUSSION

The large majority of proteobacteria outer membrane proteins are either lipoproteins or β -barrel proteins (OMPs), and two distinct specific pathways ensure their targeting to the OM. Lipoproteins are sorted and targeted by the Lol pathway, while OMP targeting relies on the combined action of three periplasmic chaperones, SurA, Skp, and DegP, together with the Bam complex (30, 38). In this work, we have studied the targeting of PnlH, a *D. dadantii* atypical outer membrane protein which is anchored in the OM by an uncleaved Tat signal sequence (8). Since PnlH is not acylated at its amino-terminal extremity, it is unlikely that it directly interacts with the Lol system (8, 9). Thus, we focused our study on the possible role of the OMP-targeting pathway in the targeting of PnlH to the OM.

After exportation by the Tat system, PnlH is released in a folded state in the periplasm. Since the pectin lyase portion of PnlH exhibits 43% sequence identity with a *Pseudomonas marginalis* pectin lyase, PNL, that has been described to be a soluble protein (33), it should be soluble in the periplasm. However, the PnlH signal sequence is highly hydrophobic, and its fusion to a soluble protein (GST) makes it nonsoluble. Thus, the PnlH signal sequence should be buried in the course of the periplasmic transit. Our data show that a *D. dadantii surA* mutant exhibits a strong PnlH stability defect. The same defect was observed for a fusion of the PnlH signal sequence to the mature form of the pectin methyl-esterase Pema but not for the native Pema, indicating that the role of SurA in the stability of PnlH is linked to the signal sequence. Since OMP-targeting defects, such as the one provoked by the absence of SurA, lead to a strong activation of the periplasmic stress response in *E. coli* (42, 53, 10), the PnlH stability defect observed in the *D. dadantii surA* mutant could be an indirect effect due to the activation of the periplasmic stress response by mistargeted OMPs. However, we favor a direct role of SurA on the stability of PnlH because (i) a *skp* mutant also presents a OMP-targeting defect that should activate a periplasmic stress response (38) but does not exhibit any effect on PnlH stability and (ii) SurA binds to the Tat signal sequence of PnlH in an overlay experiment. Therefore, a possible role for SurA could be to hide the hydrophobic PnlH signal sequence and to prevent the periplasmic degradation of PnlH. SurA has been shown to be involved in the transport of the passenger domain of the IcsA autotransporter in the periplasm of *Shigella flexneri* (35). Moreover, direct binding of SurA on the unfolded passenger domain of the *E. coli* autotransporter EspP has been demonstrated (44). Altogether our results and these observations indicate that SurA specificity and chaperone activity are not restricted only to unfolded β -barrel proteins. SurA specificity for OMPs has been linked to a strong preference for aromatic amino acid-rich sequences containing the Ar-X-Ar motif that is particularly frequent in OMPs (1, 15). Such a motif is present in the PnlH signal sequence (phenylalanine 34 and tyrosine 36). Surprisingly, single substitution of each of these aromatic residues did not obviously affect PnlH targeting, indicating that an Ar-X-Ar motif on the PnlH signal sequence could be dispensable for the interaction with SurA. Consistent with this observation, it has been shown that SurA can strongly bind peptides that do not fit the Ar-X-Ar consensus by adapting its tertiary

and quaternary structure (57). Moreover, SurA can fold to form a nonspecific conduit for unfolded polypeptide, as can the domain III of the trigger factor, a general cytoplasmic chaperone (21, 57).

SurA has been described to ensure the delivery of OMPs to the Bam system by interacting with BamA (3, 47, 52). Therefore, it is possible that SurA delivers PnlH to the OM, but how the PnlH signal sequence is inserted in the OM remains unknown. Our data show that *bamB* and *bamE* null mutations slightly affect the stability of PnlH. However, the PnlH insertion in the OM is not disrupted in the corresponding mutants, and the effect of these null mutations on the level of PnlH is proportional to the effect on the level of the β -barrel protein OmpF. This suggests that the role of BamB and BamE on the stability of PnlH could be indirect, provoked by the activation of a periplasmic stress response (38) or the misinsertion of a protein involved in the targeting of PnlH. However, it is worth noting that a model of spontaneous insertion in the OM has been proposed for some bacterial secretins and for mitochondrial signal-anchored proteins (12, 16, 27). Therefore, further work is necessary to determine how the PnlH signal sequence is inserted in the OM and if this process requires proteins other than those of the Bam complex.

Since the fusion of the PnlH signal sequence to Pema is able to target it to the OM, this signal sequence should carry all the information necessary to the targeting of PnlH. The first step of PnlH targeting is exportation through the Tat system, and the PnlH signal sequence thus has the same organization as other Tat signal sequences with a polar amino-terminal part, a Tat consensus, a hydrophobic region, and a polar carboxy-terminal part (32). In this work, we tried to identify the information that ensures the targeting of PnlH to the OM after exportation by the Tat system, and the difficulty was sorting between information allowing the targeting to the Tat system (32) and information allowing the transit in the periplasm and the insertion in the OM. We showed that the substitution PnlHD16A strongly impairs the stability of PnlH in *D. dadantii* without blocking its exportation, as shown by the activation of a periplasmic stress by PnlHD16A in *E. coli*. Since negatively charged residues are not a compulsory characteristic of the amino-terminal part of the Tat signal sequence (32) and since aspartate 16 is conserved in *D. zea*, it is possible that it constitutes a specific signal for the targeting of PnlH to the OM. We could also identify a region of the PnlH signal sequence contained between residues 28 and 41 that could be specifically involved in the targeting of PnlH to the OM after exportation since PnlH with deletion of this region is present in both the IM and the OM of *D. dadantii*. Consistent with this experimental observation, this part of the signal sequence is well conserved in the *D. zea* PnlH. However, single amino acid substitutions in this part of the protein did not lead to an obvious targeting defect, indicating that the signal may not rely on a single amino acid. Interestingly, structure prediction of the PnlH signal sequence suggests the existence of an alpha helix between residues 14 and 32, followed by a coil region formed by prolines 32 and 35. Substitution of these two prolines (PnlHP32LP35A) leads to a degradation of the amino-terminal part of the PnlH signal sequence but does not impair the targeting of PnlH to the OM of *D. dadantii*. Since PnlHP32LP35A induces a strong periplasmic stress in *E. coli*, it is likely that the coil region and thus the length of the predicted alpha helix are important factors for the stability of the PnlH signal sequence in the

periplasm but not for its insertion in the OM. The PnlH signal sequence-predicted alpha helix contains a highly hydrophobic region between residues 24 and 31. Replacement of leucines 30 and 31 by serine and threonine (PnlHL30SL31T), respectively, led to a strong decrease in the PnlH stability in *D. dadantii* and activation of a periplasmic stress in *E. coli*. This could indicate that the decrease of the hydrophobicity of the predicted alpha helix of PnlHL30SL31T is not sufficient to impair the exportation but could impair the targeting to the OM after exportation. Since the PnlH signal sequence anchors PnlH in the OM, it is tempting to think that its predicted hydrophobic alpha helix is responsible for the anchoring of PnlH in the OM. The presence of a hydrophobic alpha helix in an OM protein seems surprising, since the presence of such a structure in membrane proteins constitutes a strong IM retention signal. However, it has been shown that the lipoproteins of the outer membrane auxiliary family PelC of *Pseudomonas aeruginosa* and Wza of *E. coli* are anchored in the OM by a carboxy-terminal amphipathic alpha helix (6, 20), indicating that alpha helices can be inserted in the OM. Another surprising point is the presence of a cluster of hydrophobic residues in the PnlH signal sequence. Indeed, β -barrel proteins do not have such clusters in their primary sequences, but their folding in the OM forms a hydrophobic surface allowing the insertion into the OM (38). Similarly, the oligomerization of Wza forms in the OM a helical barrel that exposes the hydrophobic residues of the carboxy-terminal amphipathic alpha helices to the membrane, while polar residues are localized in the central cavity of the barrel (6). Such an oligomerization has not been reported for PnlH. Thus, the presence and the importance of the hydrophobic cluster in the PnlH signal sequence could be attributed to the requirement for a hydrophobic surface to anchor proteins in the OM.

The *pnlH* is located in a 13-gene cluster, bordered by tRNA genes, that has been acquired by lateral transfer (8). This cluster is not present in most sequenced *Dickeya* strains. No gene that could encode a dedicated targeting system is present in this cluster. OM Tat-anchored proteins, such as PnlH, do not seem to be widespread, and they probably have to rely on existing targeting systems. As shown by this study, SurA could be versatile enough to ensure the targeting of noncanonical OM proteins. This could, at least in part, explain how newly acquired OM proteins can be targeted to the OM to ensure their functions. Such versatility in an OM-targeting pathway could, in short, ensure the acquisition of new functions by lateral gene transfer.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a BQR from the INSA de Lyon. Arnaud Rondelet was supported by Cluster 10: Infectiologie of the French Region Rhône Alpes.

We thank J. M. Betton for providing us the SR1458 strain. We also thank Vladimir Shevchik for his precious help and carefully reading of the manuscript and Geraldine Effantin for technical support.

REFERENCES

- Alcock FH, et al. 2008. Conserved substrate binding by chaperones in the bacterial periplasm and the mitochondrial intermembrane space. *Biochem. J.* 409:377–387.
- Allen JWA, Tomlinson EJ, Hong L, Ferguson SJ. 2002. The *Escherichia coli* cytochrome *c* maturation (Ccm) system does not detectably attach heme to single cysteine variants of an apocytochrome *c*. *J. Biol. Chem.* 277:33559–33563.

3. Bennis D, Charlson ES, Coon E, Misra R. 2010. Dissection of β -barrel outer membrane protein assembly pathways through characterizing BamA POTRA 1 mutants of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 77:1153–1171.
4. de Cock H, Struyvé M, Kleerebezem M, van der Krift T, Tommassen J. 1997. Role of the carboxy-terminal phenylalanine in the biogenesis of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* 269:473–478.
5. Denoncin K, Schwalm J, Vertommen D, Silhavy TJ, Collet J-F. 2012. Dissecting the *Escherichia coli* periplasmic chaperone network using differential proteomics. *Proteomics* 12:1391–1401.
6. Dong C, et al. 2006. Wza the translocator for *E. coli* capsular polysaccharides defines a new class of membrane protein. *Nature* 444:226–229.
7. Fellay R, Frey J, Krisch H. 1987. Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria. *Gene* 52:147–154.
8. Ferrandez Y, Condemine G. 2008. Novel mechanism of outer membrane targeting of proteins in Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 69:1349–1357.
9. Fukuda A, et al. 2002. Aminoacylation of the N-terminal cysteine is essential for Lol-dependent release of lipoproteins from membranes but does not depend on lipoprotein sorting signals. *J. Biol. Chem.* 277:43512–43518.
10. Gerken H, Leiser OP, Bennis D, Misra R. 2010. Involvement and necessity of the Cpx regulon in the event of aberrant β -barrel outer membrane protein assembly. *Mol. Microbiol.* 75:1033–1046.
11. Gralnick JA, Vali H, Lies DP, Newman DK. 2006. Extracellular respiration of dimethyl sulfoxide by *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:4669–4674.
12. Guilvout I, et al. 2008. In vitro multimerization and membrane insertion of bacterial outer membrane secretin PulD. *J. Mol. Biol.* 382:13–23.
13. Hagan CL, Kim S, Kahne D. 2010. Reconstitution of outer membrane protein assembly from purified components. *Science* 328:890–892.
14. Hayashi S, Wu HC. 1990. Lipoproteins in bacteria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 22:451–471.
15. Hennecke G, Nolte J, Volkmer-Engert R, Schneider-Mergener J, Behrens S. 2005. The periplasmic chaperone SurA exploits two features characteristic of integral outer membrane proteins for selective substrate recognition. *J. Biol. Chem.* 280:23540–23548.
16. Hoang HH, et al. 2011. Outer membrane targeting of *Pseudomonas aeruginosa* proteins shows variable dependence on the components of Bam and Lol machineries. *mBio* 2:e00246–11. doi:10.1128/mBio.00246-11.
17. Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Charaoui-Boukerzaza S. 2009. Catabolism of raffinose, sucrose, and melibiose in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* 191:6960–6967.
18. Hunke S, Betton J-M. 2003. Temperature effect on inclusion body formation and stress response in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 50:1579–1589.
19. Kelley LA, Sternberg MJE. 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.* 4:363–371.
20. Kowalska K, et al. 2010. The C-terminal amphipathic α -helix of *Pseudomonas aeruginosa* PelC outer membrane protein is required for its function. *Biochimie* 92:33–40.
21. Ludlam AV, Moore BA, Xu Z. 2004. The crystal structure of ribosomal chaperone trigger factor from *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:13436–13441.
22. Malinverni JC, et al. 2006. YfiO stabilizes the YaeT complex and is essential for outer membrane protein assembly in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 61:151–164.
23. Maneewannakul S, Maneewannakul K, Ippen-Ihler K. 1994. The pKSM710 vector cassette provides tightly regulated lac and T7lac promoters and strategies for manipulating N-terminal protein sequences. *Plasmid* 31:300–307.
24. Masuda K, Matsuyama S, Tokuda H. 2002. Elucidation of the function of lipoprotein-sorting signals that determine membrane localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:7390–7395.
25. Matsuyama S, Yokota N, Tokuda H. 1997. A novel outer membrane lipoprotein, LolB (HemM), involved in the LolA (p20)-dependent localization of lipoproteins to the outer membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 16:6947–6955.
26. Matsuyama S, Tajima T, Tokuda H. 1995. A novel periplasmic carrier protein involved in the sorting and transport of *Escherichia coli* lipoproteins destined for the outer membrane. *EMBO J.* 14:3365–3372.
27. Merklinger E, et al. 2012. Membrane integration of a mitochondrial signal-anchored protein does not require additional proteinaceous factors. *Biochem. J.* 442:381–389.
28. Miller JH. 1992. A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
29. Miot M, Betton J-M. 2004. Protein quality control in the bacterial periplasm. *Microb. Cell Fact.* 3:4.
30. Okuda S, Tokuda H. 2011. Lipoprotein sorting in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 65:239–259.
31. Osborn MJ, Gander JE, Parisi E, Carson J. 1972. Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. *J. Biol. Chem.* 247:3962–3972.
32. Palmer T, Berks BC. 2012. The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat. Rev. Microbiol.* 10:483–496.
33. Papi R, Kyriakidis D. 2003. Overexpression of the pectin lyase gene of *Pseudomonas marginalis* in *Escherichia coli* and purification of the active enzyme. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37:187–194.
34. Pugsley AP. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57:50–108.
35. Purdy GE, Fisher CR, Payne SM. 2007. IcsA surface presentation in *Shigella flexneri* requires the periplasmic chaperones DegP, Skp, and SurA. *J. Bacteriol.* 189:5566–5573.
36. Raina S, Missiakas D, Georgopoulos C. 1995. The rpoE gene encoding the sigma E (sigma 24) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 14:1043–1055.
37. Resibois A, Colet M, Faelen N, Schoonejans E, Toussaint A. 1984. phiEC2, a new generalized transducing phage of *Erwinia chrysanthemi*. *Virology* 137:102–112.
38. Ricci DP, Silhavy TJ. 2012. The Bam machine: a molecular cooper. *Biochim. Biophys. Acta* 1818:1067–1084.
39. Rizzitello AE, Harper JR, Silhavy TJ. 2001. Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183:6794–6800.
40. Robert V, et al. 2006. Assembly factor Omp85 recognizes its outer membrane protein substrates by a species-specific C-terminal motif. *PLoS Biol.* 4:e377. doi:10.1371/journal.pbio.0040377.
41. Roeder DL, Collmer A. 1985. Marker-exchange mutagenesis of a pectate lyase isozyme gene in *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* 164:51–56.
42. Rouviere PE, Gross CA. 1996. SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes Dev.* 10:3170–3182.
43. Ruiz N, Falcone B, Kahne D, Silhavy TJ. 2005. Chemical conditionality: a genetic strategy to probe organelle assembly. *Cell* 121:307–317.
44. Ruiz-Perez F, et al. 2009. Roles of periplasmic chaperone proteins in the biogenesis of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae. *J. Bacteriol.* 191:6571–6583.
45. Schulz GE. 2000. beta-Barrel membrane proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:443–447.
46. Shevchik VE, Condemine G, Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Robert-Baudouy J. 1996. Characterization of pectin methylesterase B, an outer membrane lipoprotein of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol. Microbiol.* 19:455–466.
47. Sklar JG, et al. 2007. Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:6400–6405.
48. Sklar JG, Wu T, Kahne D, Silhavy TJ. 2007. Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 21:2473–2484.
49. Subrini O, Betton J-M. 2009. Assemblies of DegP underlie its dual chaperone and protease function. *FEMS Microbiol. Lett.* 296:143–148.
50. Terada M, Kuroda T, Matsuyama SI, Tokuda H. 2001. Lipoprotein sorting signals evaluated as the LolA-dependent release of lipoproteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276:47690–47694.
51. Voulhoux R, Bos MP, Geurtsen J, Mols M, Tommassen J. 2003. Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* 299:262–265.
52. Vuong P, Bennis D, Mantei J, Frost D, Misra R. 2008. Analysis of YfgL and YaeT interactions through bioinformatics, mutagenesis, and biochemistry. *J. Bacteriol.* 190:1507–1517.
53. Walsh NP, Alba BM, Bose B, Gross CA, Sauer RT. 2003. OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell* 113:61–71.

Rondelet and Condemine

54. Walton TA, Sandoval CM, Fowler CA, Pardi A, Sousa MC. 2009. The cavity-chaperone Skp protects its substrate from aggregation but allows independent folding of substrate domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**:1772–1777.
55. Watanabe S, Oguchi Y, Yokota N, Tokuda H. 2007. Large-scale preparation of the homogeneous LolA lipoprotein complex and efficient in vitro transfer of lipoproteins to the outer membrane in a LolB-dependent manner. *Protein Sci.* **16**:2741–2749.
56. Wu T, et al. 2005. Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell* **121**: 235–245.
57. Xu X, Wang S, Hu Y-X, McKay DB. 2007. The periplasmic bacterial molecular chaperone SurA adapts its structure to bind peptides in different conformations to assert a sequence preference for aromatic residues. *J. Mol. Biol.* **373**:367–381.
58. Yakushi T, Masuda K, Narita S, Matsuyama S, Tokuda H. 2000. A new ABC transporter mediating the detachment of lipid-modified proteins from membranes. *Nat. Cell Biol.* **2**:212–218.

PROOF

TABLE S1: Oligonucleotides used in this study

Name	Sequence 5' top 3'
SurA+	GCAGGGCATTCCCAGGTTGG
SurA-	GCGAAGTCGCTATTCAGGCAG
Skp+	CGTGTCTGCTTGCAGCATTG
Skp-	CAGTCTTACGCCAGACCTTG
DegP+	TGGAGCTGCAGGGCGATCGC
DegP-	CGCACCAGCATAACGCCGGG
BamB+	GGCGGCCGCACCATCAGGAAAGCAACGCG
BamB-	CTCTAGAGCATCAGGCCATCGCGGGCG
BamC+	GGCGGCCGCGGGTGCCTGACCGTGACGCC
BamC-	CTCTAGAGCTCAATGCGAGCACCATCC
BamE+	GGCGGCCGCATCATGAAACCCTGAATCG
BamE-	CTCTAGAGCAATGGTGGCAGAACCGGG
PnlHHis+	GTGGGCTAGCATTCCCTCAACCCCGACTGAA
PnlHHis-	GGTGTGCATGCTTAGTGATGGTGGTGGTGTGTGTCCCCCAGGTCTTATT
PnlHssPemA+	GTCTGAGCTCTTTTGGGCTAGCGAATTC
PnlHssPemA-	GACAGGTACCACAGCCAAGCTTGCATGC
SurAStrep+	ATATGGTACCAGCGATTAACATTTAACC
SurAStrep-	ATATTCTAGATTACTTCTCGAACTGCGGGTGCAGCCAGTTCTGCCCGTTCAGG
Xss20+	CCCGGATCCCAAAAAAATACGATGCCAAAG
Xss20-	CCCGTCGACTCAATCAGACTGGGCAATTCTGGC
D16A +	CCGTTATGCCCGTCATAGCTACCGCTTTTTCAAGGCGG
D16A -	CCGCCTTGAAAAAGCGGTAGCTATGACGGGCATAACGG
L30SL31T +	GGCATTACTTAAGCTTGCTGTGTGCGACGCCCGCATTCCCCTACG
L30SL31T -	CGTAGGGGAATGCGGGCGTCGACACAGCAAGCTTAAGTAAATGCC
P32LP35A +	GCTTGCTGTGTTGCTGCTCGCATTGCGCTACGCCAGAATTGCC
P32LP35A -	GGCAATTCTGGCGTAGGCCAATGCGAGCAGCAACACAGCAAGC
P32L +	GCTTGCTGTGTTGCTGCTCGCATTCCCCTACGC
P32L -	GCGTAGGGGAATGCGAGCAGCAACACAGCAAGC
P35A +	GCTGTGTTGCTGCCCGCATTGCGCTACGCCAGAATTGCC
P35A -	GGGCAATTCTGGCGTAGGCCAATGCGGGCAGCAACACAGC
F34A +	G CTT GCT GTG TTG CTG CCT GCA GCC CCC TAC GCC AGA ATT GC
F34A -	GCAATTCTGGCGTAGGGGGCTGCAGGCAGCAACACAGCAAGC
Y36A+	G CTG CCC GCA TTC CCC GCG GCC AGA ATT GCC CAG
Y36A -	CTGGGCAATTCTGGCCGCGGGGAATGCGGGCAGC
Q41+	CCCTACGCCAGAATTGCCGCATCTGATAGTGGTGAACC
Q41 -	GGTTACACCACTATCAGATGCGGCAATTCTGGCGTAGGG
Δ28-41+	CCCAGAAGCTTAGTGGTGAACCGGGTAT
Δ28-41-	CCACTAAGCTTCTGGGCAATTCTGGCGTA

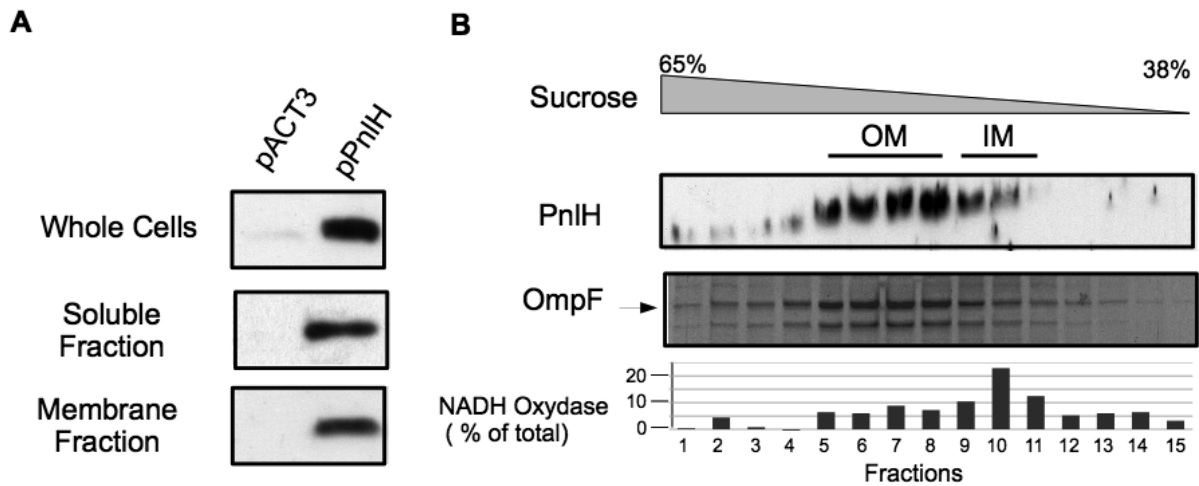


FIG. S1. Subcellular localization of PnlH-6His in *D. dadantii* A350. (A) Cell fractionation of *D. dadantii* wild type strain A350 carrying either an empty pACT3 vector or pPnlH. PnlH was detected by immunoblot. Equivalent amounts of cell material from exponential phase cultures were loaded in each well. (B) The membrane fraction from A350 strain carrying pPnlH was separated by flotation sucrose gradient centrifugation and analysed by immunoblotting with PnlH antibodies or stained with Coomassie blue to detect the major porin OmpF, which reflects the position of the outer membrane. NADH-oxydase activity indicates the position of the inner membrane.

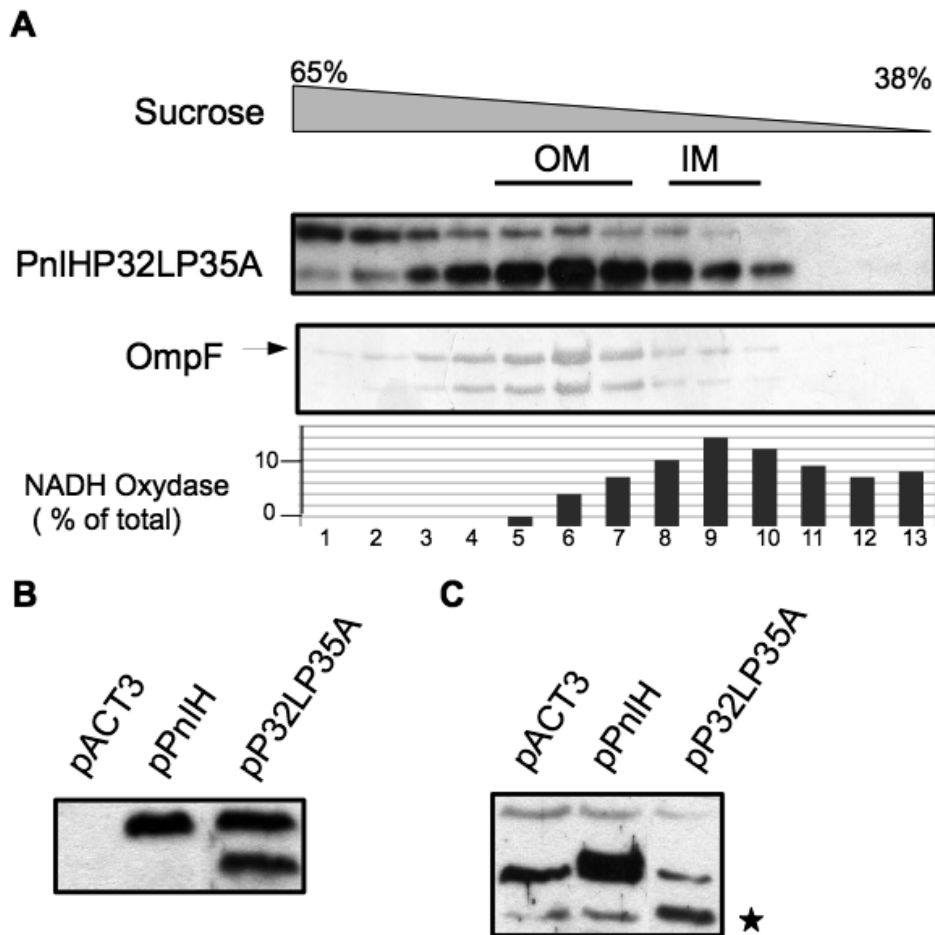


FIG. S2: PnIHP32LP35A is cleaved at its amino-terminal extremity and is associated to the outer membrane. (A) Membranes from the *D. dadantii* wild type strain A350 carrying pPnIHP32LP35A were separated by flotation sucrose gradient centrifugation and analysed by immunoblotting with PnIHP antibodies or stained with Coomassie blue to detect the major porin OmpF, which reflects the position of the outer membrane. NADH oxidase activity indicates the position of the inner membrane. (B) Cells from *E. coli* NM522 strains carrying either empty pACT3 vector, pPnIH or pPnIHP32LP35A analysed by immunoblotting with PnIH antibodies (C) Membrane fractions from A350 strains carrying either empty pACT3 vector, pPnIH or pPnIHP32LP35A analysed by immunoblotting with His Tag antibodies (Pierce).

Chapitre VI Discussion générale et perspectives

PnIH est un homologue de pectine lyase présent à la face externe de la membrane externe de la bactérie phytopathogène *D. dadantii*. Ferrandez et Condemine (2008) ont montré que l'adressage de PnIH à la surface de *D. dadantii* se découpait probablement en deux grandes étapes. Dans ce modèle, PnIH est d'abord adressée et ancrée à la face interne de la membrane externe par une séquence signal Tat non clivée avant d'être sécrétée à la face externe de la membrane externe. Si l'étape de sécrétion de PnIH a pu être attribuée à un système de sécrétion de type II dénommé Stt, la façon dont PnIH est acheminée à la membrane externe n'a pas pu être déterminée lors de cette précédente étude. Le but de cette thèse a donc été de comprendre les mécanismes permettant l'adressage de PnIH à la face interne de la membrane externe.

PnIH est synthétisée dans le cytoplasme et la première étape de son adressage correspond à sa prise en charge par le système Tat. Contrairement à ce qui est observé pour le système Sec, il n'existe pas un facteur général équivalent à SecA permettant l'adressage des protéines au système Tat. En revanche, certains substrats du système Tat nécessitent un chaperon cytoplasmique spécifique qui, en se liant à la séquence signal de la protéine, assure son repliement avant qu'elle ne soit adressée au système Tat. Ces chaperons sont généralement spécifiques d'un substrat donné et les gènes les codant sont souvent en opéron avec leur substrat (Palmer *et al.*, 2011). Le gène codant PnIH appartient à un cluster de gènes probablement acquis par transfert horizontal et qui ne code aucun chaperon cytoplasmique. De plus, lorsque PnIH est exprimée chez *E. coli*, elle est correctement repliée et adressée au système Tat (Ferrandez et Condemine, 2008). Ainsi, il est peu probable que PnIH requiert un chaperon spécifique pour son repliement et son adressage au système Tat. Il a été montré que les chaperons cytoplasmiques DnaK, GroEL et SlyD pouvaient lier des séquences signal Tat et stabiliser les substrats du système Tat avant exportation (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2007 ; Graubner *et al.*, 2006). Ainsi, PnIH pourrait dépendre de chaperons cytoplasmiques généraux pour son repliement et son adressage au système Tat. De manière cohérente avec cette idée, nos expériences de copurification suggèrent que le chaperon cytoplasmique GroEL pourrait se lier à la séquence signal de PnIH. Cependant, nous n'avons pas démontré un rôle direct de cette protéine dans la stabilité ou l'adressage de PnIH. L'étude de mutants *groEL*, *dnaK* et *slyD* devrait permettre de déterminer si PnIH dépend de chaperons cytoplasmiques généraux pour son adressage. Il est également intéressant de noter que nous avons pu copurifier la protéine EF-Tu avec la séquence signal de PnIH. Cette protéine montre une forte affinité pour les peptides hydrophobes comme la séquence signal de PnIH et possède une activité chaperon (Caldas *et al.*, 1998 ; Malki *et al.*, 2002). De plus, il a été proposé que EF-Tu intervienne dans le repliement de la protéine Tat-dépendante DmsA via son interaction avec le chaperon DmsD (Li *et al.*, 2010). Ainsi, EF-Tu, initialement impliquée dans le processus de traduction, semble également assurer différents autres rôles dans le cytoplasme

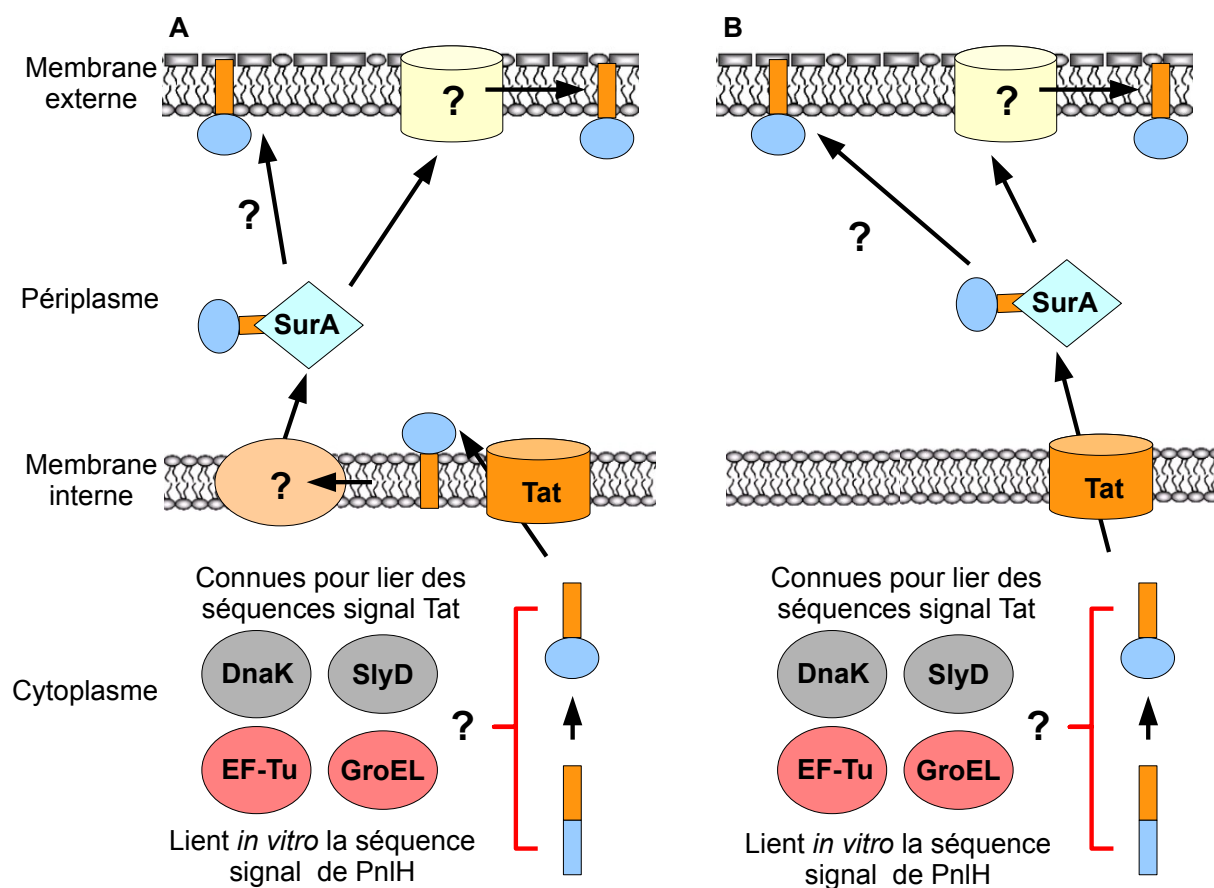


Figure V.1 : Modèles d'adressage de PnlH à la membrane externe de *D. dadantii* en l'absence de Stt.

(A) PnlH est synthétisée dans le cytoplasme où elle est également repliée et adressée au système Tat pour exportation. Les protéines chaperons potentiellement impliquées dans le repliement et l'adressage de PnlH au système Tat sont représentées en saumon pour les protéines liant la séquence signal de PnlH *in vitro* et en gris pour les protéines décrites dans la bibliographie comme liant les séquences signal Tat. Lors de l'exportation PnlH est ancrée dans la MI interne par sa séquence signal Tat. Un système encore inconnu assure l'extraction de PnlH de la MI et son transfert vers le chaperon périplasmique SurA. En se liant à la séquence signal hydrophobe de PnlH, SurA assure la traversée du périplasm de cette dernière. Enfin, PnlH est insérée dans la ME soit de façon spontanée, soit par un système de ME de nature inconnue. (B) Les étapes cytoplasmiques et d'insertion dans la ME sont identiques à ce qui est décrit précédemment. Cependant, dans ce modèle PnlH n'est pas ancrée dans la MI par sa séquence signal Tat lors de l'exportation mais est directement prise en charge par SurA après exportation par le système Tat.

(Defeu Soufo *et al.*, 2010) et il pourrait être intéressant d'étudier l'impact de EF-Tu sur l'adressage de PnlH.

Après exportation par le système Sec ou Tat, la séquence signal de la protéine exportée est généralement clivée par les signal peptidases LepB ou LspA (Pugsley, 1993 ; Luke *et al.*, 2009). Il est admis que les séquences signal Sec restent dans la MI ou elles sont dégradées par différentes protéases de MI comme RseP (Paetzel *et al.*, 2002 ; Saito *et al.*, 2011). Le devenir des séquences signal Tat est quant à lui plus discuté, mais la capacité de la protéase de MI RseP à les dégrader suggère que les séquences signal Tat restent également dans la MI après exportation (Saito *et al.*, 2011 ; Palmer et Berks, 2012). Si l'on applique ces observations à PnlH, il est possible qu'après exportation PnlH soit ancrée dans la MI par sa séquence signal Tat non clivée (Figure V.I A). De façon concordante avec cette hypothèse, les protéines Rieske de *Legionella pneumophila* et *Paracoccus denitrificans* possèdent une séquence signal Tat non clivée qui les ancre dans la MI lors de l'exportation par le système Tat (Bachmann *et al.*, 2006 ; De Buck *et al.*, 2007). Une localisation transitoire de PnlH dans la MI après exportation par le système Tat pourrait notamment expliquer pourquoi nous n'avons pas observé la sécrétion de PnlH dans le surnageant de culture de sphéroplastes. Des arguments expérimentaux et bioinformatiques appuient également cette idée. Une délétion des acides aminés 28 à 41 de la séquence signal de PnlH ancre cette dernière à la fois dans la MI et dans la ME, indiquant que la région 28 à 41 pourrait contenir une information favorisant le passage de PnlH de la MI à la ME. De plus, la séquence signal de PnlH semble posséder des signaux forts de rétentions dans la MI. En effet, nos données suggèrent que la séquence signal de PnlH contient une hélice α avec une région à caractère hydrophobe et l'utilisation de logiciel de prédiction de segment transmembranaire suggère l'existence d'un TM entre les résidus 25 et 34 de la séquence signal de PnlH. Ainsi, il pourrait être intéressant de vérifier expérimentalement l'existence d'une telle étape. La production de PnlH dans des sphéroplastes suivi d'un traitement de ces derniers avec une protéase devrait permettre de déterminer si PnlH est sensible à la protéase et donc si elle est exposée à la face périplasmique de la MI des sphéroplastes. L'existence d'une étape intermédiaire où PnlH est ancrée dans la MI aurait plusieurs conséquences. Tout d'abord, elle appuierait l'idée selon laquelle les séquences signal Tat restent dans la MI après clivage (Palmer et Berks, 2012). Elle impliquerait également que PnlH doit être extraite de la MI avant d'être transférée à un chaperon périplasmique. Par analogie avec le système Lol, il serait possible qu'un transporteur ABC semblable à LolCDE remplisse cette fonction (Okuda et Tokuda, 2011). La prise en charge de PnlH par LolCDE est exclue puisque PnlH n'est pas acylée à son extrémité amino terminale, ce qui est un prérequis pour l'interaction avec LolCDE (Fukuda *et al.*, 2002). Le cluster de gène contenant *pnlH* ne code aucun système semblable à LolCDE et PnlH devrait donc dépendre d'un système conservé chez *E. coli* et *D. dadantii*. Ainsi, nous avons recherché le plus proche homologue du système LolCDE chez *D. dadantii* et *E. coli*. Il s'agit d'un ABC transporteur qui est constitué de deux protéines YbbA et YbbP. L'étude de la localisation de PnlH dans un mutant d'*E. coli* pour *ybbP* n'a montré

aucun défaut d'adressage de PnlH, indiquant que ce transporteur n'est pas impliqué dans l'adressage de PnlH. La recherche du système assurant l'extraction de PnlH de la MI pourrait donc être entreprise par des expériences de cross link dans des sphéroplastes exprimant PnlH. En effet, dans ces conditions, PnlH devrait être localisée dans la MI à proximité du système permettant son extraction. Malgré ces observations, il convient de noter qu'un modèle dans lequel la séquence signal de PnlH est directement relâchée dans le périplasma après exportation ne peut être exclu (Figure V.I B).

Le caractère hydrophobe de la séquence signal de PnlH implique qu'elle soit protégée par un chaperon lors de sa traversée du compartiment hydrophile que représente le périplasma. Nos données montrent que SurA se lie à la séquence signal de PnlH et la protège de la dégradation durant son adressage à la ME. SurA est décrite pour reconnaître ses substrats au niveau de motifs Ar-X-Ar (Bitto et McKay, 2003 ; Bitto et McKay, 2004). Un tel motif est présent dans la séquence signal de PnlH mais la substitution de l'un ou l'autre des résidus aromatiques de ce motif n'a pas d'effet évident sur la stabilité de PnlH chez *D. dadantii*, suggérant que SurA pourrait reconnaître la séquence signal de PnlH par d'autres moyens. Cependant, avant de conclure, il est nécessaire de vérifier l'effet de ces substitutions sur l'interaction *in vitro* entre SurA et la séquence signal de PnlH. Récemment, il a été montré que SurA peut moduler ses structures tertiaire et quaternaire pour lier un peptide riche en aromatique mais qui ne possède pas de consensus Ar-X-Ar (Xu et al., 2007). De façon intéressante, ce peptide adopte une conformation en hélice α , ce qui semble également être le cas de la séquence signal de PnlH. De plus, il a été suggéré que le domaine PPIase 1 de SurA fournit sa spécificité au chaperon alors que les domaines N et C forment un sillon de liaison aux peptides non spécifique (Xu et al., 2007). Il serait donc intéressant d'étudier l'impact de délétions des domaines PPIase de SurA sur son interaction avec PnlH. En effet, une telle étude pourrait permettre de déterminer si la liaison de SurA à la séquence signal de PnlH se fait via une interaction spécifique impliquant les résidus aromatiques de cette dernière ou si SurA se lie à PnlH de manière moins spécifique grâce au sillon formé par les domaines N et C.

Chez *E. coli*, SurA représente le chaperon principal pour l'adressage des PT β à la membrane externe (Ricci et Silhavy, 2012). Cependant, seule la protéine LptD est strictement dépendante de SurA pour son adressage, les autres PT β pouvant être prises en charge par Skp ou DegP en l'absence de SurA. Ainsi, malgré l'absence d'un défaut prononcé de l'adressage de PnlH dans des mutants *skp* et *degP* de *D. dadantii* un rôle secondaire de ces protéines ne peut être exclu. Chez *E. coli*, l'absence de Skp ou DegP n'a qu'un effet limité sur la biogénèse des PT β en raison de la présence de SurA dans les souches correspondantes. Des doubles mutants *skp/degP* et *surA* ne sont pas viables ce qui complique l'étude de l'adressage des protéines à la ME en l'absence de SurA (Rizzitello et al., 2001). Ainsi, l'étude du rôle de Skp et DegP dans l'adressage de PnlH devrait tout d'abord être entreprise par des techniques *in vitro* permettant la détection d'une éventuelle interaction entre ces protéines chaperons et PnlH. Enfin, différents chaperons périplasmiques catalysant les étapes limitantes du repliement des protéines ont

également été impliqués dans la biosynthèse des PT β . C'est notamment le cas de la peptidyl-prolyl isomérase PpiD et des disulfure isomérases DsbA et DsbC (Denoncin *et al.*, 2010 ; Matern *et al.*, 2010 ; Ruiz *et al.*, 2010). L'étude de la localisation de PnlH dans des mutants de *D. dadantii* pour la disulfure isomérase DsbA ou la peptidyl-prolyl isomérase RotA n'a montré aucun défaut d'adressage de PnlH en l'absence de ces protéines (données obtenues au cours de cette thèse mais non présentées). Cependant, de tels résultats ne sont pas surprenants puisque PnlH atteint le périplasma sous forme repliée.

Après avoir traversé le périplasma, PnlH doit encore être insérée dans la ME. Si nos données montrent un défaut de stabilité de PnlH dans les mutants *bamB* et *bamE* de *D. dadantii*, nous ne favorisons pas un modèle dans lequel PnlH serait délivrée au système Bam pour être insérée dans la ME par ce dernier. En effet, le défaut de stabilité de PnlH dans les mutants *bamB* et *bamE* est proportionnel au défaut de stabilité de la porine OmpF, indiquant que l'effet observé n'est pas spécifique de PnlH. Dans ce contexte, le défaut de stabilité de PnlH peut facilement être expliqué soit par une activation des systèmes de stress périplasmique dans les mutants *bamB* et *bamE* (Ricci et Silhavy, 2012), soit par la dépendance de PnlH vis-à-vis d'une protéine elle-même insérée dans la ME par le complexe Bam. De plus, plusieurs études structurales s'accordent pour dire que les composants du système Bam interagissent avec leurs substrats via des mécanismes d'augmentation de brins β impliquant la présence de brins β dans ces protéines (Kim *et al.*, 2007 ; Gatzeva-Topalova *et al.*, 2008 ; Albrecht et Zeth, 2011 ; Heuck *et al.*, 2011 ; Kim et Paetzel, 2011 ; Noinaj *et al.*, 2011). Or, les prédictions de structure de la séquence signal de PnlH ne montrent aucun brin β . Au contraire, nos données suggèrent que PnlH pourrait être ancrée dans la ME par une hélice α dotée d'une région hydrophobe. A notre connaissance seules certaines lipoprotéines de la famille OMA (Wza et PelC, voir Chapitre II, V.C) sont connues pour être ancrées dans la membrane externe des bactéries par des hélices α . Cependant, il s'agit d'hélices α amphipatiques dont la multimérisation sous forme de tonneau d'hélices α assure la formation d'une surface hydrophobe permettant l'insertion dans la ME (Dong *et al.*, 2006). Cette organisation particulière est permise par le fait que tous les résidus polaires de l'hélice α de ces protéines sont localisés sur un côté de l'hélice alors que les résidus hydrophobes sont localisés de l'autre côté (Kowalska *et al.*, 2010). Une telle organisation des résidus n'est pas observée dans l'hélice α de la séquence signal de PnlH, indiquant que le mécanisme permettant son insertion dans la ME pourrait ne pas être le même que pour Wza ou PelC. Si un mécanisme d'insertion spontanée de certaines protéines dans la ME a été proposé (Guilvout *et al.*, 2008 ; Hoang *et al.*, 2011), il reste probable qu'une ou plusieurs protéines de ME assurent l'insertion de PnlH dans cette dernière et l'identification de telles protéines est l'une des perspectives majeures de ce travail. La protéine LolB a été identifiée grâce au fait que la lipoprotéine Lpp complexée avec LolA pouvait être insérée *in vitro* dans des vésicules de ME. Le fractionnement des protéines constituant ces vésicules a ensuite permis d'isoler LolB comme responsable de l'insertion de Lpp (Matsuyama *et al.*, 1997). Une telle approche pourrait donc être mise en place avec un complexe PnlH-SurA. Récemment, le

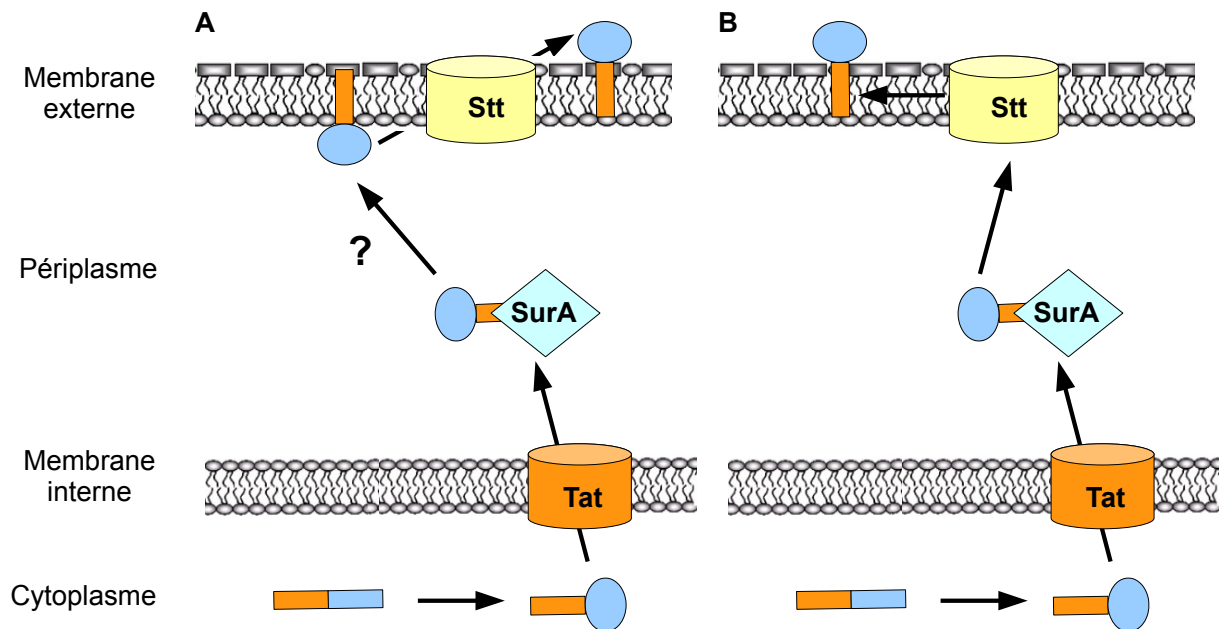


Figure V.2 Modèles d'insertion de PnIH dans la ME en présence du Stt.

(A) Après exportation dans le périplasm, PnIH est prise en charge par SurA qui assure sa traversée du périplasm en interagissant avec sa séquence signal. PnIH est ensuite insérée à la face interne de la ME par un mécanisme inconnu. Le Stt assure la sécrétion de PnIH à la face externe de la ME. Les étapes précoces de l'adressage ne sont pas détaillées pour améliorer la compréhension (voir Figure V.1). (B) SurA transfère directement PnIH au Stt qui assure son insertion à la face externe de la ME.

complexe Bam a été reconstruit dans des protéoliposomes à l'intérieur desquels il catalyse l'insertion de PT β préalablement complexées avec SurA (Hagan *et al.*, 2010 ; Hagan et Kahne, 2011). L'utilisation d'un tel système pourrait permettre de vérifier que le complexe Bam n'est pas directement impliqué dans l'insertion de PnlH dans la ME. Enfin, d'autres pistes de recherche pourraient venir de l'étude de la biogénèse de la ME des mitochondries. En effet, la ME de ces organelles accueille à la fois des PT β et des protéines ancrées par une séquence signal non clivée hydrophobe, une extrémité carboxy terminale hydrophobe ou plusieurs segments transmembranaires (Dimmer et Rapaport, 2012). Chez les mitochondries, les PT β sont insérées dans la ME par une protéine de la famille de BamA (Sam50) et les autres protéines sont insérées soit de façon spontanée (Merklinger *et al.*, 2012) soit par les protéines Mim1 ou Tom70 (Otera *et al.*, 2007 ; Becker *et al.*, 2008). De plus, il est actuellement suggéré que d'autres facteurs protéiques pourraient être impliqués dans l'insertion dans la ME de protéines ne formant pas de tonneau β (Dimmer et Rapaport, 2012). La recherche d'homologues de ces protéines chez les protéobactéries pourrait fournir des pistes non négligeables pour identifier les protéines catalysant l'insertion dans la ME de PnlH mais aussi de protéines atypiques comme Wza ou PelC.

Il convient de noter que l'ensemble de ces observations s'appuie sur l'hypothèse que le Stt n'est pas impliqué dans l'insertion de PnlH dans la ME. Cette hypothèse est étayée par le fait que PnlH est localisée à la face interne de la ME d'*E. coli* et d'un mutant *stt* de *D. dadantii*. Cependant, il ne peut être exclu qu'en présence du Stt, ce dernier assure directement l'insertion de PnlH à la face externe de la membrane externe et qu'un mécanisme différent assure l'insertion de PnlH à la face interne de la ME en l'absence de celui-ci (Figure V.2).

L'un des éléments clefs de l'adressage de PnlH à la ME réside dans les 41 premiers acides aminés de PnlH qui contiennent la séquence signal Tat non clivée de cette protéine. L'analyse de l'information portée par cette dernière nous a permis de n'identifier qu'un seul résidu dont la présence est obligatoire pour l'adressage de PnlH à la ME après exportation : l'aspartate en position 16. Ainsi, nous n'avons pas pu déterminer une signature des séquences signal Tat non clivées assurant l'ancrage de protéines dans la ME. La recherche dans les bases de données d'autres protéines ancrées dans la ME de la même manière que PnlH n'a donc pas pu être entreprise. En revanche, cette étude nous a permis de montrer que la région comprise entre les acides aminés 28 et 41 portait au moins une partie de l'information nécessaire à l'adressage de PnlH à la ME après exportation par le système Tat. De plus, nos données suggèrent qu'une partie de cette information réside dans la structure secondaire de la séquence signal de PnlH. Cependant, plusieurs questions restent à résoudre et notamment comment la séquence signal de PnlH ancre cette dernière dans la ME. L'utilisation de logiciel de prédiction de segment transmembranaire suggère l'existence d'un TM entre les résidus 25 et 34 de la séquence signal de PnlH. Cependant, ces prédictions sont valables pour des TMs de MI et rien n'assure qu'il en soit de même pour la ME. De façon intéressante, la substitution de deux leucines de cette région en résidu polaire affecte fortement l'adressage de PnlH à la ME, suggérant que cette région pourrait

effectivement être impliquée dans l'insertion de PnlH dans la ME. Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur la région carboxy terminale conservée de la séquence signal de PnlH. Cependant, l'importance de l'aspartate 16 pour la stabilité périplasmique de PnlH suggère que la région amino terminale pourrait également jouer un rôle dans l'adressage de PnlH. L'étude de cette région par des substitutions ou des délétions pourrait donc fournir de nouvelles données sur la nature de l'information portée par la séquence signal de PnlH. Enfin, le rôle des 41 premiers acides aminés de PnlH ne semble pas s'arrêter à l'adressage de PnlH à la face interne de la ME. En effet, lorsque les 41 premiers acides aminés de PnlH sont remplacés par la séquence signal Tat de la protéine HybO de *D. dadantii*, PnlH n'est pas prise en charge par le Stt, indiquant qu'une partie de l'information nécessaire à la sécrétion de PnlH à la face externe de la membrane externe est contenue dans ces 41 acides aminés (Ferrandez et Condemine, 2008). Ainsi, il pourrait être intéressant de tester la sécrétion des différents variants de la séquence signal de PnlH obtenus lors de ce travail.

Au début de ce travail, notre hypothèse était qu'il existe une nouvelle voie d'adressage des protéines à la ME, conservée chez plusieurs protéobactéries. Cependant, l'ensemble des données obtenues au cours de ces travaux de thèse suggère que l'adressage de PnlH dépend de chaperons cytoplasmiques et périplasmiques déjà impliqués dans l'adressage des substrats Tat et des PT β . Ceci indique que, malgré de fortes différences structurales avec les autres protéines de ME, PnlH pourrait partager les voies d'adressage à la ME de ces protéines. Il est important de rappeler que le gène codant PnlH appartient à un cluster de 15 gènes codant également un système de sécrétion de type II (Stt) dont le seul substrat connu est PnlH. Ce cluster de gènes est encadré par deux gènes d'ARN de transfert Valine et les gènes le constituant présentent un pourcentage G+C inférieur au reste du génome de *D. dadantii*, suggérant que ce cluster a été acquis par transfert horizontal (Ferrandez et Condemine, 2008). Des tests préliminaires de co-inoculation d'une souche sauvage et d'un mutant *stt* de *D. dadantii* montrent que le mutant présente un défaut de compétitivité pour l'infection de feuilles d'endive (données non présentées, obtenues pendant cette thèse). Ceci indique que le cluster codant PnlH confère un avantage aux bactéries l'exprimant au cours d'une infection, et souligne l'importance pour les bactéries d'adresser correctement PnlH à la membrane externe. Ainsi, il est probable que le fait que des facteurs d'adressage à la ME conservés, comme SurA, puissent prendre en charge PnlH pour son adressage, ait facilité l'acquisition par *D. dadantii* de la nouvelle fonction associée au cluster codant PnlH. D'une manière plus générale, ce travail suggère que certains facteurs impliqués dans l'adressage des protéines à la ME pourraient disposer d'une certaine flexibilité dans leur spécificité afin d'assurer le repliement et l'adressage à la ME de protéines acquises par transfert horizontal. Une telle hypothèse est appuyée par des études structurales qui ont montré que SurA pouvait former un sillon de liaison aux peptides non spécifique et proche de celui du TF (Ludlam *et al.*, 2004 ; Xu *et al.*, 2007). Ainsi, il pourrait être intéressant de rechercher d'autres protéines atypiques de ME dont le gène a été acquis par transfert horizontal et d'étudier leur adressage à la ME. Une

telle étude pourrait permettre de comprendre comment, au cours de l'évolution, les bactéries arrivent à mettre en place des structures de membrane externe nouvellement acquises.

Bibliographie

- Ades, S.E., (2008). Regulation by destruction: design of the sigmaE envelope stress response. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 535–540.
- 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**, 937–946.
- Albrecht, R., Zeth, K., (2011). Structural basis of outer membrane protein biogenesis in bacteria. *J. Biol. Chem.* **286**, 27792–27803.
- Alcock, F.H., Grossmann, J.G., Gentle, I.E., Likić, V.A., Lithgow, T., Tokatlidis, K., (2008). Conserved substrate binding by chaperones in the bacterial periplasm and the mitochondrial intermembrane space. *Biochem. J.* **409**, 377–387.
- Allen, J.W.A., Tomlinson, E.J., Hong, L., Ferguson, S.J., (2002). The *Escherichia coli* cytochrome c maturation (Ccm) system does not detectably attach heme to single cysteine variants of an apocytochrome c. *J. Biol. Chem.* **277**, 33559–33563.
- Bachmann, J., Bauer, B., Zwicker, K., Ludwig, B., Anderka, O., (2006). The Rieske protein from *Paracoccus denitrificans* is inserted into the cytoplasmic membrane by the twin-arginine translocase. *FEBS J.* **273**, 4817–4830.
- Barnett, J.P., Eijlander, R.T., Kuipers, O.P., Robinson, C., (2008). A minimal Tat system from a Gram-positive organism: a bifunctional TatA subunit participates in discrete TatAC and TatA complexes. *J. Biol. Chem.* **283**, 2534–2542.
- Becker, T., Pfannschmidt, S., Guiard, B., Stojanovski, D., Milenkovic, D., Kutik, S., Pfanner, N., Meisinger, C., Wiedemann, N., (2008). Biogenesis of the mitochondrial TOM complex: Mim1 promotes insertion and assembly of signal-anchored receptors. *J. Biol. Chem.* **283**, 120–127.
- Behrens, S., Maier, R., de Cock, H., Schmid, F.X., Gross, C.A., (2001). The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity. *EMBO J.* **20**, 285–294.
- Bennion, D., Charlson, E.S., Coon, E., Misra, R., (2010). Dissection of β -barrel outer membrane protein assembly pathways through characterizing BamA POTRA 1 mutants of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **77**, 1153–1171.
- Berks, B.C., 1996. A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol. Microbiol.* **22**, 393–404.
- Berks, B.C., Palmer, T., Sargent, F., (2003). The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology. *Adv. Microb. Physiol.* **47**, 187–254.
- Berks, B.C., Sargent, F., Palmer, T., (2000). The Tat protein export pathway. *Mol. Microbiol.* **35**, 260–274.
- Beveridge, T.J., (2001). Use of the Gram stain in microbiology. *Biotech Histochem* **76**, 111–118.

- Bitto, E., McKay, D.B., (2002). Crystallographic structure of SurA, a molecular chaperone that facilitates folding of outer membrane porins. *Structure* **10**, 1489–1498.
- Bitto, E., McKay, D.B., (2003). The periplasmic molecular chaperone protein SurA binds a peptide motif that is characteristic of integral outer membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **278**, 49316–49322.
- Bitto, E., McKay, D.B., (2004). Binding of phage-display-selected peptides to the periplasmic chaperone protein SurA mimics binding of unfolded outer membrane proteins. *FEBS Lett.* **568**, 94–98.
- Blaudeck, N., Kreutzenbeck, P., Freudl, R., Sprenger, G.A., (2003). Genetic analysis of pathway specificity during posttranslational protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *J. Bacteriol.* **185**, 2811–2819.
- Blot, N., Berrier, C., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Ghazi, A., Condemine, G., (2002). The oligogalacturonate-specific porin KdgM of *Erwinia chrysanthemi* belongs to a new porin family. *J. Biol. Chem.* **277**, 7936–7944.
- Bogsch, E., Brink, S., Robinson, C., (1997). Pathway specificity for a Δ 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**, 3851–3859.
- Bolhuis, A., Mathers, J.E., Thomas, J.D., Barrett, C.M., Robinson, C., (2001). TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **276**, 20213–20219.
- Bos, M.P., Robert, V., Tommassen, J., (2007a). Biogenesis of the Gram-negative bacterial outer membrane. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**, 191–214.
- Bos, M.P., Robert, V., Tommassen, J., (2007b). Functioning of outer membrane protein assembly factor Omp85 requires a single POTRA domain. *EMBO Rep.* **8**, 1149–1154.
- Bos, M.P., Tefsen, B., Geurtsen, J., Tommassen, J., (2004). Identification of an outer membrane protein required for the transport of lipopolysaccharide to the bacterial cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 9417–9422.
- Brundage, L., Hendrick, J.P., Schiebel, E., Driessen, A.J., Wickner, W., (1990). The purified *E. coli* integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. *Cell* **62**, 649–657.
- Buchanan, G., Sargent, F., Berks, B.C., Palmer, T., (2001). A genetic screen for suppressors of *Escherichia coli* Tat signal peptide mutations establishes a critical role for the second arginine within the twin-arginine motif. *Arch. Microbiol.* **177**, 107–112.
- Bulieris, P.V., Behrens, S., Holst, O., Kleinschmidt, J.H., (2003). Folding and insertion of the outer membrane protein OmpA is assisted by the chaperone Skp and by lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **278**, 9092–9099.
- Bury-Moné, S., Nomane, Y., Reymond, N., Barbet, R., Jacquet, E., Imbeaud, S., Jacq, A., Bouloc, P., (2009). Global analysis of extracytoplasmic stress signaling in *Escherichia coli*. *PLoS Genet.* **5**, e1000651.

- Caldas, T.D., El Yaagoubi, A., Richarme, G., (1998). Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-Tu. *J. Biol. Chem.* **273**, 11478–11482.
- Cao, T.B., Saier, M.H., Jr, (2003). The general protein secretory pathway: phylogenetic analyses leading to evolutionary conclusions. *Biochim. Biophys. Acta* **1609**, 115–125.
- Casadaban, M.J., (1976). Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* **104**, 541–555.
- CastilloKeller, M., Misra, R., (2003). Protease-deficient DegP suppresses lethal effects of a mutant OmpC protein by its capture. *J. Bacteriol.* **185**, 148–154.
- Celebi, N., Yi, L., Facey, S.J., Kuhn, A., Dalbey, R.E., (2006). Membrane biogenesis of subunit II of cytochrome bo oxidase: contrasting requirements for insertion of N-terminal and C-terminal domains. *J. Mol. Biol.* **357**, 1428–1436.
- Chan, C.S., Zlomislic, M.R., Tieleman, D.P., Turner, R.J., (2007). The TatA subunit of *Escherichia coli* twin-arginine translocase has an N-in topology. *Biochemistry* **46**, 7396–7404.
- Charlson, E.S., Werner, J.N., Misra, R., (2006). Differential effects of *yfgL* mutation on *Escherichia coli* outer membrane proteins and lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* **188**, 7186–7194.
- Chen, R., Henning, U., (1996). A periplasmic protein (Skp) of *Escherichia coli* selectively binds a class of outer membrane proteins. *Mol. Microbiol.* **19**, 1287–1294.
- Chimalakonda, G., Ruiz, N., Chng, S.-S., Garner, R.A., Kahne, D., Silhavy, T.J., (2011). Lipoprotein LptE is required for the assembly of LptD by the beta-barrel assembly machine in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 2492–2497.
- Chng, S.-S., Ruiz, N., Chimalakonda, G., Silhavy, T.J., Kahne, D., (2010). Characterization of the two-protein complex in *Escherichia coli* responsible for lipopolysaccharide assembly at the outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 5363–5368.
- Clantin, B., Delattre, A.-S., Rucktooa, P., Saint, N., Méli, A.C., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., Villeret, V., (2007). Structure of the membrane protein FhaC: a member of the Omp85-TpsB transporter superfamily. *Science* **317**, 957–961.
- Clausen, T., Southan, C., Ehrmann, M., (2002). The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol. Cell* **10**, 443–455.
- Cline, K., McCaffery, M., (2007). Evidence for a dynamic and transient pathway through the TAT protein transport machinery. *EMBO J.* **26**, 3039–3049.
- Cline, K., Mori, H., 2001. Thylakoid DeltapH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *J. Cell Biol.* **154**, 719–729.
- Collin, S., Guilvout, I., Chami, M., Pugsley, A.P., (2007). YaeT-independent multimerization and outer membrane association of secretin PulD. *Mol. Microbiol.* **64**, 1350–1357.
- Collin, S., Guilvout, I., Nickerson, N.N., Pugsley, A.P., (2011). Sorting of an integral outer membrane protein via the lipoprotein-specific Lol pathway and a dedicated lipoprotein pilotin. *Mol. Microbiol.* **80**, 655–665.
- Collins, R.F., Derrick, J.P., (2007). Wza: a new structural paradigm for outer membrane secretory proteins? *Trends Microbiol.* **15**, 96–100.

- Condemine, G., Ghazi, A., (2007). Differential regulation of two oligogalacturonate outer membrane channels, KdgN and KdgM, of *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi*). *J. Bacteriol.* **189**, 5955–5962.
- Connolly, T., Rapiejko, P.J., Gilmore, R., (1991). Requirement of GTP hydrolysis for dissociation of the signal recognition particle from its receptor. *Science* **252**, 1171–1173.
- Cowles, C.E., Li, Y., Semmelhack, M.F., Cristea, I.M., Silhavy, T.J., (2011). The free and bound forms of Lpp occupy distinct subcellular locations in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **79**, 1168–1181.
- Cristóbal, S., de Gier, J.W., Nielsen, H., von Heijne, G., (1999). Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **18**, 2982–2990.
- Cross, B.C.S., Sinning, I., Luirink, J., High, S., (2009). Delivering proteins for export from the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell. Bio.* **10**, 255–264.
- Dabney-Smith, C., Mori, H., Cline, K., (2006). Oligomers of Tha4 organize at the thylakoid Tat translocase during protein transport. *J. Biol. Chem.* **281**, 5476–5483.
- Dalbey, R.E., Wang, P., Kuhn, A., (2011). Assembly of bacterial inner membrane proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 161–187.
- Daley, D.O., Rapp, M., Granseth, E., Melén, K., Drew, D., von Heijne, G., (2005). Global topology analysis of the *Escherichia coli* inner membrane proteome. *Science* **308**, 1321–1323.
- Danese, P.N., Silhavy, T.J., (1997). The sigma(E) and the Cpx signal transduction systems control the synthesis of periplasmic protein-folding enzymes in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **11**, 1183–1193.
- De Buck, E., Vranckx, L., Meyen, E., Maes, L., Vandersmissen, L., Anné, J., Lammertyn, E., (2007). The twin-arginine translocation pathway is necessary for correct membrane insertion of the Rieske Fe/S protein in *Legionella pneumophila*. *FEBS Lett.* **581**, 259–264.
- de Cock, H., Struyvé, M., Kleerebezem, M., van der Krift, T., Tommassen, J., (1997). Role of the carboxy-terminal phenylalanine in the biogenesis of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* **269**, 473–478.
- de Keyzer, J., van der Sluis, E.O., Spelbrink, R.E.J., Nijstad, N., de Kruijff, B., Nouwen, N., van der Does, C., Driessen, A.J.M., (2005). Covalently dimerized SecA is functional in protein translocation. *J. Biol. Chem.* **280**, 35255–35260.
- Defeu Soufo, H.J., Reimold, C., Linne, U., Knust, T., Gescher, J., Graumann, P.L., (2010). Bacterial translation elongation factor EF-Tu interacts and colocalizes with actin-like MreB protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 3163–3168.
- Delattre, A.-S., Clantin, B., Saint, N., Locht, C., Villeret, V., Jacob-Dubuisson, F., (2010). Functional importance of a conserved sequence motif in FhaC, a prototypic member of the TpsB/Omp85 superfamily. *FEBS J.* **277**, 4755–4765.
- DeLisa, M.P., Tullman, D., Georgiou, G., (2003). Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 6115–6120.

- Denoncin, K., Schwalm, J., Vertommen, D., Silhavy, T.J., Collet, J.-F., (2012). Dissecting the *Escherichia coli* periplasmic chaperone network using differential proteomics. *Proteomics* **12**, 1391–1401.
- Denoncin, K., Vertommen, D., Paek, E., Collet, J.-F., (2010). The protein-disulfide isomerase DsbC cooperates with SurA and DsbA in the assembly of the essential β -barrel protein LptD. *J. Biol. Chem.* **285**, 29425–29433.
- Desvaux, M., Hébraud, M., Talon, R., Henderson, I.R., (2009). Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol.* **17**, 139–145.
- Dimmer, K.S., Rapaport, D., (2012). Unresolved mysteries in the biogenesis of mitochondrial membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1818**, 1085–1090.
- Ding, H., Hunt, J.F., Mukerji, I., Oliver, D., (2003). *Bacillus subtilis* SecA ATPase exists as an antiparallel dimer in solution. *Biochemistry* **42**, 8729–8738.
- Dong, C., Beis, K., Nesper, J., Brunkan-Lamontagne, A.L., Clarke, B.R., Whitfield, C., Naismith, J.H., (2006). Wza the translocon for *E. coli* capsular polysaccharides defines a new class of membrane protein. *Nature* **444**, 226–229.
- Dong, C., Hou, H.F., Yang, X., Shen, Y.Q., Dong, Y.H., (2012). Structure of *Escherichia coli* BamD and its functional implications in outer membrane protein assembly. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **68**, 95–101.
- Douzi, B., Filloux, A., Voulhoux, R., (2012). On the path to uncover the bacterial type II secretion system. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367**, 1059–1072.
- du Plessis, D.J.F., Berrelkamp, G., Nouwen, N., Driessen, A.J.M., (2009). The lateral gate of SecYEG opens during protein translocation. *J. Biol. Chem.* **284**, 15805–15814.
- du Plessis, D.J.F., Nouwen, N., Driessen, A.J.M., (2006). Subunit a of cytochrome o oxidase requires both YidC and SecYEG for membrane insertion. *J. Biol. Chem.* **281**, 12248–12252.
- Duong, F., Wickner, W., (1997). The SecDFYajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *EMBO J.* **16**, 4871–4879.
- Entzminger, K.C., Chang, C., Myhre, R.O., McCallum, K.C., Maynard, J.A., (2012). The Skp chaperone helps fold soluble proteins in vitro by inhibiting aggregation. *Biochemistry.* **51**, 4822-34
- Erlanson, K.J., Miller, S.B.M., Nam, Y., Osborne, A.R., Zimmer, J., Rapoport, T.A., (2008). A role for the two-helix finger of the SecA ATPase in protein translocation. *Nature* **455**, 984–987.
- Fairman, J.W., Noinaj, N., Buchanan, S.K., (2011). The structural biology of β -barrel membrane proteins: a summary of recent reports. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**, 523–531.
- Ferrandez, Y., Condemine, G., (2008). Novel mechanism of outer membrane targeting of proteins in Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **69**, 1349–1357.

- Fukuda, A., Matsuyama, S.-I., Hara, T., Nakayama, J., Nagasawa, H., Tokuda, H., (2002). Aminoacylation of the N-terminal cysteine is essential for Lol-dependent release of lipoproteins from membranes but does not depend on lipoprotein sorting signals. *J. Biol. Chem.* **277**, 43512–43518.
- Gatsos, X., Perry, A.J., Anwari, K., Dolezal, P., Wolyneć, P.P., Likić, V.A., Purcell, A.W., Buchanan, S.K., Lithgow, T., (2008). Protein secretion and outer membrane assembly in Alphaproteobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 995–1009.
- Gatzeva-Topalova, P.Z., Walton, T.A., Sousa, M.C., (2008). Crystal structure of YaeT: conformational flexibility and substrate recognition. *Structure* **16**, 1873–1881.
- Gatzeva-Topalova, P.Z., Warner, L.R., Pardi, A., Sousa, M.C., (2010). Structure and flexibility of the complete periplasmic domain of BamA: the protein insertion machine of the outer membrane. *Structure* **18**, 1492–1501.
- Gelis, I., Bonvin, A.M.J.J., Keramisanou, D., Koukaki, M., Gouridis, G., Karamanou, S., Economou, A., Kalodimos, C.G., (2007). Structural basis for Signal-Sequence Recognition by the translocase motor SecA as determined by NMR. *Cell* **131**, 756–769.
- Gennity, J.M., Inouye, M., (1991). The protein sequence responsible for lipoprotein membrane localization in *Escherichia coli* exhibits remarkable specificity. *J. Biol. Chem.* **266**, 16458–16464.
- 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**, 10482–10486.
- Görlich, D., Rapoport, T.A., (1993). Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* **75**, 615–630.
- Gouffi, K., Gérard, F., Santini, C.-L., Wu, L.-F., (2004). Dual topology of the *Escherichia coli* TatA protein. *J. Biol. Chem.* **279**, 11608–11615.
- Grady, L.M., Michtavy, J., Oliver, D.B., (2012). Characterization of the *Escherichia coli* SecA signal peptide-binding site. *J. Bacteriol.* **194**, 307–316.
- Gralnick, J.A., Vali, H., Lies, D.P., Newman, D.K., (2006). Extracellular respiration of dimethyl sulfoxide by *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 4669–4674.
- Graubner, W., Schierhorn, A., Bruser, 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**, 7116–7124.
- Gu, S., Rehman, S., Wang, X., Shevchik, V.E., Pickersgill, R.W., (2012). Structural and functional insights into the pilotin-secretin complex of the type II secretion system. *PLoS Pathog.* **8**, e1002531.
- 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**, 13–23.

- Gumbart, J., Schulten, K., (2008). The roles of pore ring and plug in the SecY protein-conducting channel. *J. Gen. Physiol.* **132**, 709–719.
- Gupta, R.S., (2011). Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. *Antonie van Leeuwenhoek* **100**, 171–182.
- Gupta, S.D., Gan, K., Schmid, M.B., Wu, H.C., (1993). Characterization of a temperature-sensitive mutant of *Salmonella typhimurium* defective in apolipoprotein N-acyltransferase. *J. Biol. Chem.* **268**, 16551–16556.
- Gur, E., Sauer, R.T., 2008. Recognition of misfolded proteins by Lon, a AAA(+) protease. *Genes Dev.* **22**, 2267–2277.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., Beckwith, J., (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter. *J. Bacteriol.* **177**, 4121–4130.
- Hagan, C.L., Kahne, D., (2011). The reconstituted *Escherichia coli* Bam complex catalyzes multiple rounds of β -barrel assembly. *Biochemistry* **50**, 7444–7446.
- Hagan, C.L., Kim, S., Kahne, D., (2010). Reconstitution of outer membrane protein assembly from purified components. *Science* **328**, 890–892.
- Hagan, C.L., Silhavy, T.J., Kahne, D., (2011). β -Barrel membrane protein assembly by the Bam complex. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 189–210.
- Halic, M., Gartmann, M., Schlenker, O., Mielke, T., Pool, M.R., Sinning, I., Beckmann, R., (2006). Signal recognition particle receptor exposes the ribosomal translocon binding site. *Science* **312**, 745–747.
- Hara, T., Matsuyama, S., Tokuda, H., (2003). Mechanism underlying the inner membrane retention of *Escherichia coli* lipoproteins caused by Lol avoidance signals. *J. Biol. Chem.* **278**, 40408–40414.
- 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**, 967–976.
- Harms, N., Koningstein, G., Dontje, W., Muller, M., Oudega, B., Luirink, J., de Cock, H., (2001). The early interaction of the outer membrane protein Phoe with the periplasmic chaperone Skp occurs at the cytoplasmic membrane. *J. Biol. Chem.* **276**, 18804–18811.
- Hartl, F.U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J.P., Wickner, W., (1990). The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E. coli* plasma membrane. *Cell* **63**, 269–279.
- Hatzixanthis, K., Palmer, T., Sargent, F., (2003). A subset of bacterial inner membrane proteins integrated by the twin-arginine translocase. *Mol. Microbiol.* **49**, 1377–1390.
- Hayashi, S., Wu, H.C., (1990). Lipoproteins in bacteria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**, 451–471.

- Hennecke, G., Nolte, J., Volkmer-Engert, R., Schneider-Mergener, J., Behrens, S., (2005). The periplasmic chaperone SurA exploits two features characteristic of integral outer membrane proteins for selective substrate recognition. *J. Biol. Chem.* **280**, 23540–23548.
- Heuck, A., Schleiffer, A., Clausen, T., (2011). Augmenting β -augmentation: structural basis of how BamB binds BamA and may support folding of outer membrane proteins. *J. Mol. Biol.* **406**, 659–666.
- Hinsley, A.P., Stanley, N.R., Palmer, T., Berks, B.C., (2001). A naturally occurring bacterial Tat signal peptide lacking one of the “invariant” arginine residues of the consensus targeting motif. *FEBS Lett.* **497**, 45–49.
- Hoang, H.H., Nickerson, N.N., Lee, V.T., Kazimirova, A., Chami, M., Pugsley, A.P., Lory, S., (2011). Outer membrane targeting of *Pseudomonas aeruginosa* proteins shows variable dependence on the components of Bam and Lol machineries. *mBio* **2**, e00246–11–e00246–11.
- Houben, E.N.G., ten Hagen-Jongman, C.M., Brunner, J., Oudega, B., Luirink, J., (2004). The two membrane segments of leader peptidase partition one by one into the lipid bilayer via a Sec/YidC interface. *EMBO Rep.* **5**, 970–975.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Charaoui-Boukerzaza, S., (2009). Catabolism of raffinose, sucrose, and melibiose in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* **191**, 6960–6967.
- Ieva, R., Tian, P., Peterson, J.H., Bernstein, H.D., (2011). Sequential and spatially restricted interactions of assembly factors with an autotransporter domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, E383–E391.
- Iwanczyk, J., Leong, V., Ortega, J., (2011). Factors defining the functional oligomeric state of *Escherichia coli* DegP protease. *PLoS ONE* **6**, e18944.
- Ize, B., Gérard, F., Wu, L.-F., (2002). In vivo assessment of the Tat signal peptide specificity in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **178**, 548–553.
- 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**, 3962–3972.
- Jack, R.L., Sargent, F., Berks, B.C., Sawers, G., Palmer, T., (2001). Constitutive expression of *Escherichia coli* *tat* genes indicates an important role for the twin-arginine translocase during aerobic and anaerobic growth. *J. Bacteriol.* **183**, 1801–1804.
- Jacob-Dubuisson, F., Villeret, V., Clantin, B., Delattre, A.-S., Saint, N., (2009). First structural insights into the TpsB/Omp85 superfamily. *Biol. Chem.* **390**, 675–684.
- Jarchow, S., Lück, C., Görg, A., Skerra, A., (2008). Identification of potential substrate proteins for the periplasmic *Escherichia coli* chaperone Skp. *Proteomics* **8**, 4987–4994.
- Jiang, J., Zhang, X., Chen, Y., Wu, Y., Zhou, Z.H., Chang, Z., Sui, S.-F., (2008). Activation of DegP chaperone-protease via formation of large cage-like oligomers upon binding to substrate proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 11939–11944.
- Jongbloed, J.D.H., Grieger, U., Antelmann, H., Hecker, M., Nijland, R., Bron, S., van Dijl, J.M., (2004). Two minimal Tat translocases in *Bacillus*. *Mol. Microbiol.* **54**, 1319–1325.

- Kanamaru, K., Taniguchi, N., Miyamoto, S., Narita, S., Tokuda, H., (2007). Complete reconstitution of an ATP-binding cassette transporter LolCDE complex from separately isolated subunits. *FEBS J.* **274**, 3034–3043.
- Kavaliuskas, D., Nissen, P., Knudsen, C.R., (2012). The busiest of all ribosomal assistants: elongation factor Tu. *Biochemistry* **51**, 2642–2651.
- Kerner, M.J., Naylor, D.J., Ishihama, Y., Maier, T., Chang, H.-C., Stines, A.P., Georgopoulos, C., Frishman, D., Hayer-Hartl, M., Mann, M., Hartl, F.U., (2005). Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in *Escherichia coli*. *Cell* **122**, 209–220.
- Kim, K.H., Aulakh, S., Paetzel, M., (2011a). Crystal structure of β -barrel assembly machinery BamCD protein complex. *J. Biol. Chem.* **286**, 39116–39121.
- Kim, K.H., Kang, H.-S., Okon, M., Escobar-Cabrera, E., McIntosh, L.P., Paetzel, M., (2011b). Structural characterization of *Escherichia coli* BamE, a lipoprotein component of the β -barrel assembly machinery complex. *Biochemistry* **50**, 1081–1090.
- Kim, K.H., Paetzel, M., (2011). Crystal structure of *Escherichia coli* BamB, a lipoprotein component of the β -barrel assembly machinery complex. *J. Mol. Biol.* **406**, 667–678.
- Kim, S., Grant, R.A., Sauer, R.T., (2011c). Covalent linkage of distinct substrate degrons controls assembly and disassembly of DegP proteolytic cages. *Cell* **145**, 67–78.
- Kim, S., Malinverni, J.C., Sliz, P., Silhavy, T.J., Harrison, S.C., Kahne, D., (2007). Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine. *Science* **317**, 961–964.
- Kim, S., Sauer, R.T., (2012). Cage assembly of DegP protease is not required for substrate-dependent regulation of proteolytic activity or high-temperature cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 7263–7268.
- Kleinschmidt, J.H., (2003). Membrane protein folding on the example of outer membrane protein A of *Escherichia coli*. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 1547–1558.
- Klose, M., Schwarz, H., MacIntyre, S., Freudl, R., Eschbach, M.L., Henning, U., (1988). Internal deletions in the gene for an *Escherichia coli* outer membrane protein define an area possibly important for recognition of the outer membrane by this polypeptide. *J. Biol. Chem.* **263**, 13291–13296.
- Knowles, T.J., Browning, D.F., Jeeves, M., Maderbocus, R., Rajesh, S., Sridhar, P., Manoli, E., Emery, D., Sommer, U., Spencer, A., Leyton, D.L., Squire, D., Chaudhuri, R.R., Viant, M.R., Cunningham, A.F., Henderson, I.R., Overduin, M., (2011). Structure and function of BamE within the outer membrane and the β -barrel assembly machine. *EMBO Rep.* **12**, 123–128.
- Knowles, T.J., Jeeves, M., Bobat, S., Dancea, F., McClelland, D., Palmer, T., Overduin, M., Henderson, I.R., (2008). Fold and function of polypeptide transport-associated domains responsible for delivering unfolded proteins to membranes. *Mol. Microbiol.* **68**, 1216–1227.

- Kol, S., Turrell, B.R., de Keyzer, J., van der Laan, M., Nouwen, N., Driessen, A.J.M., (2006). YidC-mediated membrane insertion of assembly mutants of subunit c of the F1F0 ATPase. *J. Biol. Chem.* **281**, 29762–29768.
- Korndörfer, I.P., Dommel, M.K., Skerra, A., (2004). Structure of the periplasmic chaperone Skp suggests functional similarity with cytosolic chaperones despite differing architecture. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 1015–1020.
- Korotkov, K.V., Sandkvist, M., Hol, W.G.J., (2012). The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 336–351.
- Kowalska, K., Soscia, C., Combe, H., Vasseur, P., Voulhoux, R., Filloux, A., (2010). The C-terminal amphipathic α -helix of *Pseudomonas aeruginosa* PelC outer membrane protein is required for its function. *Biochimie* **92**, 33–40.
- Krojer, T., Garrido-Franco, M., Huber, R., Ehrmann, M., Clausen, T., (2002). Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. *Nature* **416**, 455–459.
- Krojer, T., Sawa, J., Schäfer, E., Saibil, H.R., Ehrmann, M., Clausen, T., (2008). Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. *Nature* **453**, 885–890.
- Kusters, I., van den Bogaart, G., Kedrov, A., Krasnikov, V., Fulyani, F., Poolman, B., Driessen, A.J.M., (2011). Quaternary structure of SecA in solution and bound to SecYEG probed at the single molecule level. *Structure* **19**, 430–439.
- Laemmli, U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lake, J.A., (2009). Evidence for an early prokaryotic endosymbiosis. *Nature* **460**, 967–971.
- Lazar, S.W., Kolter, R., (1996). SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins. *J. Bacteriol.* **178**, 1770–1773.
- Leake, M.C., Greene, N.P., Godun, R.M., Granjon, T., Buchanan, G., Chen, S., Berry, R.M., Palmer, T., Berks, B.C., (2008). Variable stoichiometry of the TatA component of the twin-arginine protein transport system observed by in vivo single-molecule imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 15376–15381.
- Lecker, S., Lill, R., Ziegelhoffer, T., Georgopoulos, C., Bassford, P.J., Jr, Kumamoto, C.A., Wickner, W., (1989). Three pure chaperone proteins of *Escherichia coli*: SecB, trigger factor and GroEL form soluble complexes with precursor proteins in vitro. *EMBO J.* **8**, 2703–2709.
- Lee, H.C., Bernstein, H.D., (2001). The targeting pathway of *Escherichia coli* presecretory and integral membrane proteins is specified by the hydrophobicity of the targeting signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 3471–3476.
- Leonard-Rivera, M., Misra, R., (2012). Conserved residues of the putative L6 Loop of *Escherichia coli* BamA play a critical role in the assembly of β -Barrel outer membrane proteins, including that of BamA itself. *J. Bacteriol.* **194**, 4662–4668.

- Lewenza, S., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A.P., (2006). Direct visualization of red fluorescent lipoproteins indicates conservation of the membrane sorting rules in the family Enterobacteriaceae. *J. Bacteriol.* **188**, 3516–3524.
- Leyton, D.L., Rossiter, A.E., Henderson, I.R., (2012). From self sufficiency to dependence: mechanisms and factors important for autotransporter biogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 213–225.
- Li, H., Chang, L., Howell, J.M., Turner, R.J., (2010). DmsD, a Tat system specific chaperone, interacts with other general chaperones and proteins involved in the molybdenum cofactor biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1804**, 1301–1309.
- Li, H., Faury, D., Morosoli, R., (2006). Impact of amino acid changes in the signal peptide on the secretion of the Tat-dependent xylanase C from *Streptomyces lividans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **255**, 268–274.
- Lindenstrauss, U., Matos, C.F.R.O., Graubner, W., Robinson, C., Brüser, T., (2010). Malfolded recombinant Tat substrates are Tat-independently degraded in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **584**, 3644–3648.
- Lipinska, B., Fayet, O., Baird, L., Georgopoulos, C., (1989). Identification, characterization, and mapping of the *Escherichia coli htrA* gene, whose product is essential for bacterial growth only at elevated temperatures. *J. Bacteriol.* **171**, 1574–1584.
- Ludlam, A.V., Moore, B.A., Xu, Z., (2004). The crystal structure of ribosomal chaperone trigger factor from *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 13436–13441.
- Lüke, I., Handford, J.I., Palmer, T., Sargent, F., (2009). Proteolytic processing of *Escherichia coli* twin-arginine signal peptides by LepB. *Arch. Microbiol.* **191**, 919–925.
- Lycklama a Nijeholt, J.A., Driessen, A.J.M., (2012). The bacterial Sec-translocase: structure and mechanism. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367**, 1016–1028.
- Malinverni, J.C., Werner, J., Kim, S., Sklar, J.G., Kahne, D., Misra, R., Silhavy, T.J., (2006). YfiO stabilizes the YaeT complex and is essential for outer membrane protein assembly in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **61**, 151–164.
- Malki, A., Caldas, T., Parmeggiani, A., Kohiyama, M., Richarme, G., (2002). Specificity of elongation factor EF-Tu for hydrophobic peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**, 749–754.
- Maneewannakul, S., Maneewannakul, K., Ippen-Ihler, K., (1994). The pKSM710 vector cassette provides tightly regulated *lac* and *T7lac* promoters and strategies for manipulating N-terminal protein sequences. *Plasmid* **31**, 300–307.
- Masuda, K., Matsuyama, S., Tokuda, H., (2002). Elucidation of the function of lipoprotein-sorting signals that determine membrane localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 7390–7395.
- Masui, H., Satoh, M., Satoh, T., (1994). Secretion of both partially unfolded and folded apoproteins of dimethyl sulfoxide reductase by spheroplasts from a molybdenum cofactor-deficient mutant of *Rhodobacter sphaeroides f. sp. denitrificans*. *J. Bacteriol.* **176**, 1624–1629.

- Matern, Y., Barion, B., Behrens-Kneip, S., (2010). PpiD is a player in the network of periplasmic chaperones in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol.* **10**, 251.
- Matos, C.F.R.O., Di Cola, A., 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**, 474–479.
- Matsuyama, S., Yokota, N., Tokuda, H., (1997). A novel outer membrane lipoprotein, LolB (HemM), involved in the LolA (p20)-dependent localization of lipoproteins to the outer membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **16**, 6947–6955.
- Matsuyama, S., Fujita, Y., Mizushima, S., (1993). SecD is involved in the release of translocated secretory proteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **12**, 265–270.
- Matsuyama, S., Fujita, Y., Sagara, K., Mizushima, S., (1992). Overproduction, purification and characterization of SecD and SecF, integral membrane components of the protein translocation machinery of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1122**, 77–84.
- Matsuyama, S., Tajima, T., Tokuda, H., (1995). A novel periplasmic carrier protein involved in the sorting and transport of *Escherichia coli* lipoproteins destined for the outer membrane. *EMBO J.* **14**, 3365–3372.
- Mendel, S., McCarthy, A., Barnett, J.P., Eijlander, R.T., Nenninger, A., Kuipers, O.P., Robinson, C., (2008). The *Escherichia coli* TatABC system and a *Bacillus subtilis* TatAC-type system recognise three distinct targeting determinants in twin-arginine signal peptides. *J. Mol. Biol.* **375**, 661–672.
- Merklinger, E., Gofman, Y., Kedrov, A., Driessen, A.J.M., Ben-Tal, N., Shai, Y., Rapaport, D., (2012). Membrane integration of a mitochondrial signal-anchored protein does not require additional proteinaceous factors. *Biochem. J.* **442**, 381–389.
- Miot, M., Betton, J.-M., (2004). Protein quality control in the bacterial periplasm. *Microb. Cell Fact.* **3**, 4.
- Misra, R., CastilloKeller, M., Deng, M., (2000). Overexpression of protease-deficient DegP(S210A) rescues the lethal phenotype of *Escherichia coli* OmpF assembly mutants in a degP background. *J. Bacteriol.* **182**, 4882–4888.
- Misra, R., Peterson, A., Ferenci, T., Silhavy, T.J., (1991). A genetic approach for analyzing the pathway of LamB assembly into the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**, 13592–13597.
- Missiakas, D., Betton, J.M., Raina, S., (1996). New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* SurA, FkpA and Skp/OmpH. *Mol. Microbiol.* **21**, 871–884.
- Miyamoto, A., Matsuyama Si, Tokuda, H., (2001). Mutant of LolA, a lipoprotein-specific molecular chaperone of *Escherichia coli*, defective in the transfer of lipoproteins to LolB. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 1125–1128.

- Miyamoto, S., Tokuda, H., (2007). Diverse effects of phospholipids on lipoprotein sorting and ATP hydrolysis by the ABC transporter LolCDE complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 1848–1854.
- Molik, S., Karnauchov, I., Weidlich, C., Herrmann, R.G., Klösgen, R.B., (2001). The Rieske Fe/S protein of the cytochrome b6/f complex in chloroplasts: missing link in the evolution of protein transport pathways in chloroplasts? *J. Biol. Chem.* **276**, 42761–42766.
- Mori, H., Cline, K., (2002). A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid [Delta]pH/Tat translocase. *J. Cell Biol.* **157**, 205–210.
- Mullineaux, C.W., Nenninger, A., Ray, N., Robinson, C., (2006). Diffusion of green fluorescent protein in three cell environments in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**, 3442–3448.
- Nagamori, S., Smirnova, I.N., Kaback, H.R., (2004). Role of YidC in folding of polytopic membrane proteins. *J. Cell Biol.* **165**, 53–62.
- Nakada, S., Sakakura, M., Takahashi, H., Okuda, S., Tokuda, H., Shimada, I., (2009). Structural investigation of the interaction between LolA and LolB using NMR. *J. Biol. Chem.* **284**, 24634–24643.
- Narita, S., (2011). ABC transporters involved in the biogenesis of the outer membrane in Gram-negative bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 1044–1054.
- Narita, S., Kanamaru, K., Matsuyama, S., Tokuda, H., (2003). A mutation in the membrane subunit of an ABC transporter LolCDE complex causing outer membrane localization of lipoproteins against their inner membrane-specific signals. *Mol. Microbiol.* **49**, 167–177.
- Narita, S., Tokuda, H., (2011). Overexpression of LolCDE allows deletion of the *Escherichia coli* gene encoding apolipoprotein N-acyltransferase. *J. Bacteriol.* **193**, 4832–4840.
- Narita, S.-I., Tokuda, H., (2007). Amino acids at positions 3 and 4 determine the membrane specificity of *Pseudomonas aeruginosa* lipoproteins. *J. Biol. Chem.* **282**, 13372–13378.
- Natale, P., Swaving, J., van der Does, C., de Keyser, 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**, 13769–13777.
- Negoda, A., Negoda, E., Reusch, R.N., (2010a). Oligo-(R)-3-hydroxybutyrate modification of sorting signal enables pore formation by *Escherichia coli* OmpA. *Biochim. Biophys. Acta* **1798**, 1480–1484.
- Negoda, A., Negoda, E., Reusch, R.N., (2010b). Resolving the native conformation of *Escherichia coli* OmpA. *FEBS J.* **277**, 4427–4437.
- Niederweis, M., Danilchanka, O., Huff, J., Hoffmann, C., Engelhardt, H., (2010). Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. *Trends Microbiol.* **18**, 109–116.
- Nikaido, H., 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 593–656.
- Nishiyama, K., Hanada, M., Tokuda, H., (1994). Disruption of the gene encoding p12 (SecG) reveals the direct involvement and important function of SecG in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *EMBO J.* **13**, 3272–3277.

- Noinaj, N., Fairman, J.W., Buchanan, S.K., (2011). The crystal structure of BamB suggests interactions with BamA and its role within the BAM complex. *J. Mol. Biol.* **407**, 248–260.
- Nouwen, N., Driessen, A.J.M., (2002). SecDFYajC forms a heterotetrameric complex with YidC. *Mol. Microbiol.* **44**, 1397–1405.
- Oguchi, Y., Takeda, K., Watanabe, S., Yokota, N., Miki, K., Tokuda, H., (2008). Opening and closing of the hydrophobic cavity of LolA coupled to lipoprotein binding and release. *J. Biol. Chem.* **283**, 25414–25420.
- Okuda, S., Tokuda, H., (2009). Model of mouth-to-mouth transfer of bacterial lipoproteins through inner membrane LolC, periplasmic LolA, and outer membrane LolB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 5877–5882.
- Okuda, S., Tokuda, H., (2011). Lipoprotein sorting in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **65**, 239–259.
- Okuda, S., Watanabe, S., Tokuda, H., (2008). A short helix in the C-terminal region of LolA is important for the specific membrane localization of lipoproteins. *FEBS Lett.* **582**, 2247–2251.
- Onufryk, C., Crouch, M.-L., Fang, F.C., Gross, C.A., (2005). Characterization of six lipoproteins in the sigmaE regulon. *J. Bacteriol.* **187**, 4552–4561.
- Otera, H., Taira, Y., Horie, C., Suzuki, Y., Suzuki, H., Setoguchi, K., Kato, H., Oka, T., Mihara, K., (2007). A novel insertion pathway of mitochondrial outer membrane proteins with multiple transmembrane segments. *J. Cell Biol.* **179**, 1355–1363.
- Paetzel, M., Karla, A., Strynadka, N.C.J., Dalbey, R.E., (2002). Signal peptidases. *Chemical Reviews* **102**, 4549–4580.
- Pailler, J., Aucher, W., Pires, M., Buddelmeijer, N., (2012). Phosphatidylglycerol:prolipoprotein diacylglycerol transferase (Lgt) of *Escherichia coli* has seven transmembrane segments, and its essential residues are embedded in the membrane. *J. Bacteriol.* **194**, 2142–2151.
- Palmer, T., Berks, B.C., (2012). The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 483–496.
- Palmer, T., Sargent, F., Berks, B.C., (2011). “The Tat protein export pathway.” In *EcoSal—Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Eds Böck, A., Curtiss III, R., Kaper, J.B., Karp, P.D., Neidhardt, F.C., Nyström, T., Slauch, J.M., Squires, C.L. and Ussery. ASM Press.
- Papanikolaou, Y., Papadovasilaki, M., Ravelli, R.B.G., McCarthy, A.A., Cusack, S., Economou, A., Petratos, K., (2007). Structure of dimeric SecA, the *Escherichia coli* preprotein translocase motor. *J. Mol. Biol.* **366**, 1545–1557.
- Paradis-Bleau, C., Markovski, M., Uehara, T., Lupoli, T.J., Walker, S., Kahne, D.E., Bernhardt, T.G., (2010). Lipoprotein cofactors located in the outer membrane activate bacterial cell wall polymerases. *Cell* **143**, 1110–1120.
- Patel, G.J., Behrens-Kneip, S., Holst, O., Kleinschmidt, J.H., (2009). The periplasmic chaperone Skp facilitates targeting, insertion, and folding of OmpA into lipid membranes with a negative membrane surface potential. *Biochemistry* **48**, 10235–10245.

- Pérez-Rodríguez, R., Fisher, A.C., Perlmutter, J.D., Hicks, M.G., Chanal, A., Santini, C.-L., Wu, L.-F., Palmer, T., DeLisa, M.P., (2007). An essential role for the DnaK molecular chaperone in stabilizing over-expressed substrate proteins of the bacterial twin-arginine translocation pathway. *J. Mol. Biol.* **367**, 715–730.
- Plath, K., Mothes, W., Wilkinson, B.M., Stirling, C.J., Rapoport, T.A., (1998). Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell* **94**, 795–807.
- Pogliano, J.A., Beckwith, J., (1994). SecD and SecE facilitate protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **13**, 554–561.
- Pohlschröder, M., Murphy, C., Beckwith, J., (1996). In vivo analyses of interactions between SecE and SecY, core components of the *Escherichia coli* protein translocation machinery. *J. Biol. Chem.* **271**, 19908–19914.
- Pommier, J., Méjean, V., Giordano, G., Iobbi-Nivol, C., (1998). TorD, a cytoplasmic chaperone that interacts with the unfolded trimethylamine N-oxide reductase enzyme (TorA) in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **273**, 16615–16620.
- Pool, M.R., (2005). Signal recognition particles in chloroplasts, bacteria, yeast and mammals. *Mol. Membr. Biol.* **22**, 3–15.
- Pugsley, A.P., (1993). The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**, 50–108.
- Punginelli, C., Maldonado, B., Grahl, S., Jack, R., Alami, M., Schröder, J., Berks, B.C., Palmer, T., (2007). Cysteine scanning mutagenesis and topological mapping of the *Escherichia coli* twin-arginine translocase TatC Component. *J. Bacteriol.* **189**, 5482–5494.
- Qu, J., Mayer, C., Behrens, S., Holst, O., Kleinschmidt, J.H., (2007). The trimeric periplasmic chaperone Skp of *Escherichia coli* forms 1:1 complexes with outer membrane proteins via hydrophobic and electrostatic interactions. *J. Mol. Biol.* **374**, 91–105.
- Randall, L.L., Topping, T.B., Hardy, S.J., Pavlov, M.Y., Freistroffer, D.V., Ehrenberg, M., (1997). Binding of SecB to ribosome-bound polypeptides has the same characteristics as binding to full-length, denatured proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 802–807.
- 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.* **17**, 1226–1232.
- Résibois, A., Colet, M., Faelen, M., Schoonejans, E., Toussaint, A., (1984). phiEC2, a new generalized transducing phage of *Erwinia chrysanthemi*. *Virology* **137**, 102–112.
- Reusch, R.N., (2012). Insights into the structure and assembly of *Escherichia coli* outer membrane protein A. *FEBS J.* **279**, 894–909.
- Ricci, D.P., Hagan, C.L., Kahne, D., Silhavy, T.J., (2012). Activation of the *Escherichia coli* β -barrel assembly machine (Bam) is required for essential components to interact properly with substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 3487–3491.
- Ricci, D.P., Silhavy, T.J., (2012). The Bam machine: A molecular cooper. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1818**, 1067–1084.

- Richter, S., Lindenstrauß, U., Lücke, C., Bayliss, R., Brüser, T., (2007). Functional Tat transport of unstructured, small, hydrophilic proteins. *J. Biol. Chem.* **282**, 33257–33264.
- Rigel, N.W., Schwalm, J., Ricci, D.P., Silhavy, T.J., (2012). BamE modulates the *Escherichia coli* beta-barrel assembly machine component BamA. *J. Bacteriol.* **194**, 1002–1008.
- Rizzitello, A.E., Harper, J.R., Silhavy, T.J., (2001). Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**, 6794–6800.
- Robert, V., Volokhina, E.B., Senf, F., Bos, M.P., Van Gelder, P., Tommassen, J., (2006). Assembly factor Omp85 recognizes its outer membrane protein substrates by a species-specific C-terminal motif. *PLoS Biol.* **4**, e377.
- Robichon, C., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A.P., (2005). Depletion of apolipoprotein N-acyltransferase causes mislocalization of outer membrane lipoproteins in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **280**, 974–983.
- Rodrigue, A., Chanal, A., Beck, K., Müller, M., Wu, L.F., (1999). Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial tat pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 13223–13228.
- Rouviere, P.E., Gross, C.A., (1996). SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes Dev.* **10**, 3170–3182.
- Ruiz, N., Chng, S.-S., Hiniker, A., Kahne, D., Silhavy, T.J., (2010). Nonconsecutive disulfide bond formation in an essential integral outer membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 12245–12250.
- Ruiz, N., Falcone, B., Kahne, D., Silhavy, T.J., (2005). Chemical conditionality: a genetic strategy to probe organelle assembly. *Cell* **121**, 307–317.
- Ruiz, N., Silhavy, T.J., (2005). Sensing external stress: watchdogs of the *Escherichia coli* cell envelope. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 122–126.
- Ruiz-Perez, F., Henderson, I.R., Leyton, D.L., Rossiter, A.E., Zhang, Y., Nataro, J.P., (2009). Roles of periplasmic chaperone proteins in the biogenesis of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae. *J. Bacteriol.* **191**, 6571–6583.
- Saito, A., Hizukuri, Y., Matsuo, E. -i., Chiba, S., Mori, H., Nishimura, O., Ito, K., Akiyama, Y., (2011). Post-liberation cleavage of signal peptides is catalyzed by the site-2 protease (S2P) in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 13740–13745.
- Sakamoto, C., Satou, R., Tokuda, H., Narita, S.-I., (2010). Novel mutations of the LolCDE complex causing outer membrane localization of lipoproteins despite their inner membrane-retention signals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **401**, 586–591.
- Samuelson, J.C., Chen, M., Jiang, F., Möller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G.J., Dalbey, R.E., (2000). YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature* **406**, 637–641.
- Sandoval, C.M., Baker, S.L., Jansen, K., Metzner, S.I., Sousa, M.C., (2011). Crystal structure of BamD: an essential component of the β -Barrel assembly machinery of Gram-negative bacteria. *J. Mol. Biol.* **409**, 348–357.

- Sankaran, K., Wu, H.C., (1994). Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglyceryl moiety from phosphatidylglycerol. *J. Biol. Chem.* **269**, 19701–19706.
- Santini, C.L., Ize, B., Chanal, A., Müller, M., Giordano, G., Wu, L.F., (1998). A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **17**, 101–112.
- Sargent, F., (2007). Constructing the wonders of the bacterial world: biosynthesis of complex enzymes. *Microbiology* **153**, 633–651.
- 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**, 3640–3650.
- Schäfer, U., Beck, K., Müller, M., (1999). Skp, a molecular chaperone of gram-negative bacteria, is required for the formation of soluble periplasmic intermediates of outer membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **274**, 24567–24574.
- Schleiff, E., Soll, J., (2005). Membrane protein insertion: mixing eukaryotic and prokaryotic concepts. *EMBO rep.* **6**, 1023–1027.
- Schulz, G.E., (2002). The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1565**, 308–317.
- Selvan, A.T., Sankaran, K., (2008). Localization and characterization of prolipoprotein diacylglyceryl transferase (Lgt) critical in bacterial lipoprotein biosynthesis. *Biochimie* **90**, 1647–1655.
- Sen, K., Nikaido, H., (1991). Trimerization of an in vitro synthesized OmpF porin of *Escherichia coli* outer membrane. *J. Biol. Chem.* **266**, 11295–11300.
- Seo, J., Brencic, A., Darwin, A.J., (2009). Analysis of secretin-induced stress in *Pseudomonas aeruginosa* suggests prevention rather than response and identifies a novel protein involved in secretin function. *J. Bacteriol.* **191**, 898–908.
- Settles, A.M., Yonetani, A., Baron, A., Bush, D.R., Cline, K., Martienssen, R., (1997). Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein. *Science* **278**, 1467–1470.
- Seydel, A., Gounon, P., Pugsley, A.P., (1999). Testing the “+2 rule” for lipoprotein sorting in the *Escherichia coli* cell envelope with a new genetic selection. *Mol. Microbiol.* **34**, 810–821.
- Shanmugham, A., Bakayan, A., Völler, P., Grosveld, J., Lill, H., Bollen, Y.J.M., (2012). The hydrophobic core of Twin-arginine signal sequences orchestrates specific binding to Tat-pathway related chaperones. *PLoS ONE* **7**, e34159.
- Sharma, V., Arockiasamy, A., Ronning, D.R., Savva, C.G., Holzenburg, A., Braunstein, M., Jacobs, W.R., Jr, Sacchettini, J.C., (2003). Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* SecA, a preprotein translocating ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 2243–2248.
- Shevchik, V.E., Condemine, G., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Robert-Baudouy, J., (1996). Characterization of pectin methylesterase B, an outer membrane lipoprotein of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol. Microbiol.* **19**, 455–466.

- 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**, 3007–3016.
- Silhavy, T.J., Kahne, D., Walker, S., (2010). The Bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**, a000414–a000414.
- Sklar, J.G., Wu, T., Gronenberg, L.S., Malinverni, J.C., Kahne, D., Silhavy, T.J., (2007a). Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 6400–6405.
- Sklar, J.G., Wu, T., Kahne, D., Silhavy, T.J., (2007b). Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **21**, 2473–2484.
- Spiess, C., Beil, A., Ehrmann, M., (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* **97**, 339–347.
- Stanley, N.R., Palmer, T., Berks, B.C., (2000). The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**, 11591–11596.
- Strauch, E.-M., Georgiou, G., (2007). *Escherichia coli* *tatC* mutations that suppress defective twin-arginine transporter signal peptides. *J. Mol. Biol.* **374**, 283–291.
- Strozen, T.G., Li, G., Howard, S.P., (2012). YghG (GspS β) is a novel pilot protein required for localization of the GspS β Type II Secretion System secretin of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **80**, 2608–2622.
- Subrini, O., Betton, J.-M., (2009). Assemblies of DegP underlie its dual chaperone and protease function. *FEMS Microbiol. Lett.* **296**, 143–148.
- Sutcliffe, I.C., (2010). A phylum level perspective on bacterial cell envelope architecture. *Trends Microbiol.* **18**, 464–470.
- Sutcliffe, I.C., Harrington, D.J., Hutchings, M.I., (2012). A phylum level analysis reveals lipoprotein biosynthesis to be a fundamental property of bacteria. *Protein & Cell* **3**, 163–170.
- Tajima, T., Yokota, N., Matsuyama, S., Tokuda, H., (1998). Genetic analyses of the in vivo function of LolA, a periplasmic chaperone involved in the outer membrane localization of *Escherichia coli* lipoproteins. *FEBS Lett.* **439**, 51–54.
- Takeda, K., Miyatake, H., Yokota, N., Matsuyama, S., Tokuda, H., Miki, K., (2003). Crystal structures of bacterial lipoprotein localization factors, LolA and LolB. *EMBO J.* **22**, 3199–3209.
- Tanaka, K., Matsuyama, S.I., Tokuda, H., (2001). Deletion of *lolB*, encoding an outer membrane lipoprotein, is lethal for *Escherichia coli* and causes accumulation of lipoprotein localization intermediates in the periplasm. *J. Bacteriol.* **183**, 6538–6542.
- Tanaka, S.-Y., Narita, S.-I., Tokuda, H., (2007). Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* Lol system as a lipoprotein sorting mechanism. *J. Biol. Chem.* **282**, 13379–13384.

- Taniguchi, N., Matsuyama, S.-I., Tokuda, H., (2005). Mechanisms underlying energy-independent transfer of lipoproteins from LolA to LolB, which have similar unclosed β -barrel structures. *J. Biol. Chem.* **280**, 34481–34488.
- Taniguchi, N., Tokuda, H., (2008). Molecular events involved in a single cycle of ligand transfer from an ATP binding cassette transporter, LolCDE, to a molecular chaperone, LolA. *J. Biol. Chem.* **283**, 8538–8544.
- Tao, H., Liu, W., Simmons, B.N., Harris, H.K., Cox, T.C., Massiah, M.A., (2010a). Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS. *BioTechniques* **48**, 61–64.
- Tao, K., Watanabe, S., Narita, S.-I., Tokuda, H., (2010b). A periplasmic LolA derivative with a lethal disulfide bond activates the Cpx stress response system. *J. Bacteriol.* **192**, 5657–5662.
- 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**, 13284–13289.
- Tellez, R., Misra, R., (2011). Substitutions in the BamA β -Barrel domain overcome the conditional lethal phenotype of a *bamB bamE* strain of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **194**, 317–324.
- Terada, M., Kuroda, T., Matsuyama, S.I., Tokuda, H., (2001). Lipoprotein sorting signals evaluated as the LolA-dependent release of lipoproteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **276**, 47690–47694.
- Tocheva, E.I., Matson, E.G., Morris, D.M., Moussavi, F., Leadbetter, J.R., Jensen, G.J., (2011). Peptidoglycan remodeling and conversion of an inner membrane into an outer membrane during sporulation. *Cell* **146**, 799–812.
- Tormo, A., Almirón, M., Kolter, R., (1990). *surA*, an *Escherichia coli* gene essential for survival in stationary phase. *J. Bacteriol.* **172**, 4339–4347.
- Tsukahara, J., Mukaiyama, K., Okuda, S., Narita, S., Tokuda, H., (2009). Dissection of LolB function lipoprotein binding, membrane targeting and incorporation of lipoproteins into lipid bilayers. *FEBS J.* **276**, 4496–4504.
- Tsukazaki, T., Mori, H., Echizen, Y., Ishitani, R., Fukai, S., Tanaka, T., Perederina, A., Vassylyev, D.G., Kohno, T., Maturana, A.D., Ito, K., Nureki, O., (2011). Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. *Nature* **474**, 235–238.
- Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C.A., Vollmer, W., (2011). From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat. Rev. Microbiol.* **10** :123-36.
- Ureta, A.R., Endres, R.G., Wingreen, N.S., Silhavy, T.J., (2007). Kinetic analysis of the assembly of the outer membrane protein LamB in *Escherichia coli* mutants each lacking a secretion or targeting factor in a different cellular compartment. *J. Bacteriol.* **189**, 446–454.
- van Bloois, E., Haan, G.-J., de Gier, J.-W., Oudega, B., Luirink, J., (2006). Distinct requirements for translocation of the N-tail and C-tail of the *Escherichia coli* inner membrane protein CyoA. *J. Biol. Chem.* **281**, 10002–10009.

- van Bloois, E., Jan Haan, G., de Gier, J.-W., Oudega, B., Luirink, J., (2004). F(1)F(0) ATP synthase subunit c is targeted by the SRP to YidC in the *E. coli* inner membrane. *FEBS Lett.* **576**, 97–100.
- Van den Berg, B., Clemons, W.M., Jr, Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S.C., Rapoport, T.A., (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* **427**, 36–44.
- Vasseur, P., Soscia, C., Voulhoux, R., Filloux, A., (2007). PelC is a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane lipoprotein of the OMA family of proteins involved in exopolysaccharide transport. *Biochimie* **89**, 903–915.
- Vassilyev, D.G., Mori, H., Vassilyeva, M.N., Tsukazaki, T., Kimura, Y., Tahirov, T.H., Ito, K., (2006). Crystal structure of the translocation ATPase SecA from *Thermus thermophilus* reveals a parallel, head-to-head dimer. *J. Mol. Biol.* **364**, 248–258.
- Vertommen, D., Ruiz, N., Leverrier, P., Silhavy, T.J., Collet, J.-F., (2009). Characterization of the role of the *Escherichia coli* periplasmic chaperone SurA using differential proteomics. *Proteomics* **9**, 2432–2443.
- Viarre, V., Cascales, E., Ball, G., Michel, G.P.F., Filloux, A., Voulhoux, R., (2009). HxcQ liposecretin is self-piloted to the outer membrane by its N-terminal lipid anchor. *J. Biol. Chem.* **284**, 33815–33823.
- Volokhina, E.B., Beckers, F., Tommassen, J., Bos, M.P., (2009). The beta-barrel outer membrane protein assembly complex of *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* **191**, 7074–7085.
- Volokhina, E.B., Grijpstra, J., Stork, M., Schilders, I., Tommassen, J., Bos, M.P., (2011). Role of the periplasmic chaperones Skp, SurA, and DegQ in outer membrane protein biogenesis in *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* **193**, 1612–1621.
- 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**, 262–265.
- Vrontou, E., Economou, A., (2004). Structure and function of SecA, the preprotein translocase nanomotor. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**, 67–80.
- Vuong, P., Bennion, D., Mantei, J., Frost, D., Misra, R., (2008). Analysis of YfgL and YaeT interactions through bioinformatics, mutagenesis, and biochemistry. *J. Bacteriol.* **190**, 1507–1517.
- Wagner, S., Pop, O.I., Pop, O., Haan, G.-J., Baars, L., Koningstein, G., Klepsch, M.M., Genevaux, P., Luirink, J., de Gier, J.-W., (2008). Biogenesis of MalF and the MalFGK(2) maltose transport complex in *Escherichia coli* requires YidC. *J. Biol. Chem.* **283**, 17881–17890.
- Walter, S., (2002). Structure and function of the GroE chaperone. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1589–1597.
- Walton, T.A., Sandoval, C.M., Fowler, C.A., Pardi, A., Sousa, M.C., (2009). The cavity-chaperone Skp protects its substrate from aggregation but allows independent folding of substrate domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 1772–1777.
- Walton, T.A., Sousa, M.C., (2004). Crystal structure of Skp, a prefoldin-like chaperone that protects soluble and membrane proteins from aggregation. *Mol. Cell* **15**, 367–374.

- Warner, L.R., Varga, K., Lange, O.F., Baker, S.L., Baker, D., Sousa, M.C., Pardi, A., (2011). Structure of the BamC two-domain protein obtained by Rosetta with a limited NMR data set. *J. Mol. Biol.* **411**, 83–95.
- Watanabe, S., Oguchi, Y., Takeda, K., Miki, K., Tokuda, H., (2008). Introduction of a lethal redox switch that controls the opening and closing of the hydrophobic cavity in LolA. *J. Biol. Chem.* **283**, 25421–25427.
- Watanabe, S., Oguchi, Y., Yokota, N., Tokuda, H., (2007). Large-scale preparation of the homogeneous LolA lipoprotein complex and efficient in vitro transfer of lipoproteins to the outer membrane in a LolB-dependent manner. *Protein Sci.* **16**, 2741–2749.
- Weaver, A.J., McDowall, A.W., Oliver, D.B., Deisenhofer, J., (1992). Electron microscopy of thin-sectioned three-dimensional crystals of SecA protein from *Escherichia coli*: structure in projection at 40 Å resolution. *J. Struct. Biol.* **109**, 87–96.
- Webb, C.T., Selkig, J., Perry, A.J., Noinaj, N., Buchanan, S.K., Lithgow, T., (2012). Dynamic association of BAM complex modules includes surface exposure of the lipoprotein BamC. *J. Mol. Biol.* **422** :545-55.
- Weiner, J.H., Bilous, P.T., Shaw, G.M., Lubitz, S.P., Frost, L., Thomas, G.H., Cole, J.A., Turner, R.J., (1998). A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. *Cell* **93**, 93–101.
- Wu, L.F., Ize, B., Chanal, A., Quentin, Y., Fichant, G., (2000). Bacterial twin-arginine signal peptide-dependent protein translocation pathway: evolution and mechanism. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**, 179–189.
- Wu, T., Malinverni, J., Ruiz, N., Kim, S., Silhavy, T.J., Kahne, D., (2005). Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell* **121**, 235–245.
- Xian, M., Fuerst, M.M., Shabalin, Y., Reusch, R.N., (2007). Sorting signal of *Escherichia coli* OmpA is modified by oligo-(R)-3-hydroxybutyrate. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 2660–2666.
- Xu, X., Wang, S., Hu, Y.-X., McKay, D.B., (2007). The periplasmic bacterial molecular chaperone SurA adapts its structure to bind peptides in different conformations to assert a sequence preference for aromatic residues. *J. Mol. Biol.* **373**, 367–381.
- Yahr, T.L., Wickner, W.T., (2001). Functional reconstitution of bacterial Tat translocation in vitro. *EMBO J.* **20**, 2472–2479.
- Yakushi, T., Masuda, K., Narita, S., Matsuyama, S., Tokuda, H., (2000). A new ABC transporter mediating the detachment of lipid-modified proteins from membranes. *Nat. Cell Biol.* **2**, 212–218.
- Yakushi, T., Yokota, N., Matsuyama, S., Tokuda, H., 1998. LolA-dependent release of a lipid-modified protein from the inner membrane of *Escherichia coli* requires nucleoside triphosphate. *J. Biol. Chem.* **273**, 32576–32581.
- Yamaguchi, K., Yu, F., Inouye, M., (1988). A single amino acid determinant of the membrane localization of lipoproteins in *E. coli*. *Cell* **53**, 423–432.

- Yasuda, M., Iguchi-Yokoyama, A., Matsuyama, S., Tokuda, H., Narita, S., (2009). Membrane topology and functional importance of the periplasmic region of ABC transporter LolCDE. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 2310–2316.
- Yen, M.-R., Tseng, Y.-H., Nguyen, E.H., Wu, L.-F., Saier, M.H., Jr, (2002). Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system. *Arch. Microbiol.* **177**, 441–450.
- Zhang, H., Gao, Z.-Q., Hou, H.-F., Xu, J.-H., Li, L.-F., Su, X.-D., Dong, Y.-H., (2011). High-resolution structure of a new crystal form of BamA POTRA4-5 from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **67**, 734–738.
- Zimmer, J., Li, W., Rapoport, T.A., (2006). A novel dimer interface and conformational changes revealed by an X-ray structure of *B. subtilis* SecA. *J. Mol. Biol.* **364**, 259–265.
- Zimmer, J., Nam, Y., Rapoport, T.A., (2008). Structure of a complex of the ATPase SecA and the protein-translocation channel. *Nature* **455**, 936–943.

ANNEXES

1

2 **Type II secretion : not just to go away**

3

4

5 **Arnaud Rondelet and Guy Condemine***

6

7

8 Université de Lyon, F69003; Université Lyon 1, F69622; INSA-Lyon, F69621; CNRS

9 UMR5240, Microbiologie Adaptation et Pathogénie, 69622 Villeurbanne, France

10

11 * corresponding author

12 UMR5240 Microbiologie Adaptation et Pathogénie,

13 10 rue Dubois, Bât. Lwoff 4^{ème} étage,

14 69622 Villeurbanne, FRANCE.

15 Phone: +33472445827

16 Email: guy.condemine@insa-lyon.fr

17

18 **Summary**

19 Type II secretion systems generally release their substrates in the culture medium. A few
20 T2SS substrates remain anchored or bound at the surface of the bacteria after secretion.
21 Secretion by a T2SS is the best way for bacteria to target to their surface proteins containing a
22 cofactor, proteins that have to be folded in the cytoplasm or in the periplasm or multimeric
23 proteins. However, how a T2SS deals with membrane-anchored proteins is not yet
24 understood. If this type of proteins has until now been overlooked, new proteomic approaches
25 will facilitate their identification.

26

27 **1. Introduction**

28 Type II secretion systems (T2SS) are one of the 6 secretion systems identified in Gram
29 negative bacteria. Composed of 12 to 15 proteins, they allow secretion of folded proteins
30 from the periplasm to the outer medium. Since their discovery more than 25 years ago, T2SS
31 have been mostly studied in animal or plant pathogenic bacteria. Thus, identified secreted
32 proteins are usually virulence factors, toxins or lytic enzymes required to attack the infected
33 host. These proteins are released outside the bacteria and diffuse in the medium to reach their
34 target. Among the secretion systems identified in Gram negative bacteria, T2SS may be the
35 most adapted to release a large number of proteins in the outer medium. Indeed, in contrast to
36 T1SS or T5SS which secrete one or a limited number of substrates, their broad specificity
37 allows one T2SS to secrete many different proteins. For example, the *L. pneumophila* Lsp
38 system secretes more than 25 different proteins (DebRoy et al., 2006), the *V. cholerae* Eps
39 system more than 21 (Sikora et al., 2011) and the *D. dadantii* Out system more than 12
40 (Kazemi-Pour et al., 2004). Comprehensive identification of proteins secreted by T2SS is now

41 facilitated by the use of global proteomic approaches (Sikora et al., 2011, Kazemi-Pour et al.,
42 2004, Coulthurst et al., 2008). However, these approaches often fail to identify one type of
43 T2SS substrates: outer surface anchored proteins. These proteins were identified on a case by
44 case basis: these outer membrane (OM) proteins appeared to be dependent on a T2SS for their
45 proper localization to the surface of the bacteria. They can be Sec or Tat dependent
46 lipoproteins anchored by a lipid moiety, anchored by an uncleaved Tat signal sequence or
47 associated with the LPS. This review will focus on the few characterized proteins of this type
48 and on the questions that they raise on the functioning of T2S machineries.

49

50 **2. Surface exposed lipoproteins**

51 PulA: PulA is a 117 kDa starch debranching enzyme produced by *Klebsiella oxytoca*
52 (Table 1). This lipoprotein is located at the outer face of the OM from where it is then slowly
53 released into the medium where it forms large complexes that could be micelles (although the
54 possibility that it could be present in outer membrane vesicles (OMV) has not been tested).
55 The gene coding for PulA is adjacent to the *pulC-O* operon that encodes the T2SS required to
56 secrete the protein to the outer face of the OM (d'Enfert et al., 1987). In absence of the *pul*
57 genes, PulA remains anchored in the inner membrane as do lipoproteins with an aspartate at
58 position +2 after the N-terminal cysteine in *E. coli* (Okuda and Tokuda, 2011). When this
59 aspartate is replaced by a residue that targets PulA to the periplasmic face of the OM, PulA is
60 only partially secreted. Replacement of the lipoprotein signal sequence by a classical signal
61 sequence targets PulA to the periplasm from where it is relatively efficiently secreted in the
62 outer medium (>95 %) (Poquet et al., 1993). Noteworthy, the most recent studies on the Pul
63 secretion system were performed with this non acylated variant of PulA. When synthesis of
64 PulA and of the PulC-O secretion system are uncoupled, presynthesized PulA or non acylated

65 PulA are secreted when the Pul secretion genes are induced while the OM bound PulA is not
66 (Pugsley et al., 1991). The mechanisms of interaction of PulA with its secretion machinery
67 are not known. Tethering of PulA to the periplasmic face of the OM could prevent the
68 recognition of the protein by its secretion machinery.

69 SsIE: in *E. coli*, three distinct T2SS have been identified. The most widespread, Gsp,
70 which has been identified in enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enteroaggregative *E. coli*
71 (EAEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) and extraintestinal *E. coli* (ExPEC), has been studied
72 in the enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) strain H10407 where it has been shown to secrete the
73 heat-labile toxin. Remnants of this system are present in *E. coli* K-12. Mutation of this T2SS
74 in the EPEC strain E2348/69 prevents the secretion in the medium of a 170 kDa protein
75 named SsIE (Baldi et al., 2012) (Table 1). The gene encoding SsIE is the first gene of the
76 operon that codes for the Gsp secretion system (Yang et al., 2007). SsIE is a lipoprotein and,
77 like PulA, it was also found anchored at the surface of the bacteria from where it is slowly
78 released. In the ExPEC strain IHE3034, SsIE was found both in the supernatant and the OM
79 fractions and could be detected by using flow cytometry on the cell surface (Moriel et al.,
80 2010). In strains in which the Gsp T2SS is incomplete or absent, the protein was present in
81 the cell lysate but absent from the supernatant or the OM fraction. Since the residue at
82 position +2 is an aspartate, SsIE is probably anchored in the inner membrane in a *gsp* mutant.
83 The exact function of SsIE is currently unknown. As a surface exposed protein, it is the best
84 protective antigen of ExPEC strains (Moriel et al., 2010). In EPEC strains, a *ssIE* mutant has
85 biofilm formation defects. Mature stage-biofilms show sparse cell attachment to the
86 substratum and formation of small microcolonies. Moreover, the mutant was less pathogenic
87 to rabbits (Baldi et al., 2012).

88

89 MtrC and OmcA: *Shewanella oneidensis* is a bacterium present in many aquatic
90 environments. In the absence of oxygen, it is able to use more than 20 different terminal
91 electron acceptors for respiration. Among these are iron, Fe(III) and manganese, Mn(IV).
92 However, these metals are insoluble at near neutral pH conditions. Thus, the bacteria must
93 deliver electrons to an extracellular oxidant. A multiprotein complex able to perform this
94 function, containing the proteins CymA, MtrA, MtrB, MtrC and OmcA, has been identified
95 (Richardson et al.). CymA is an inner membrane protein that oxidizes the quinol in the inner
96 membrane and transfers the electrons to the deca-haem cytochrome MtrA. MtrA is thought to
97 be embedded in the trans OM and porin-like protein MtrB. The MtrAB complex transfers the
98 electrons across the outer membrane to the cell surface deca-haem cytochromes MtrC and
99 OmcA. These two proteins, which are lipoproteins, are the terminal reductases that transfer
100 electron to Fe(III) oxides (Table 1). MtrC and OmcA have been detected on the surface of the
101 bacteria by antibody recognition force microscopy (Lower et al., 2009). Mutants unable to
102 reduce Fe(III) oxides have been obtained and they have been characterized in the *S.*
103 *oneidensis* T2SS genes (DiChristina et al., 2002). MtrC and OmcA are not surface exposed in
104 these mutants but no accumulation of the proteins in the cellular fractions was detected (Shi et
105 al., 2008). As for Pula, a slow release of the proteins in the medium was observed in wild
106 type strains.

107 DmsA and DmsB: T2SS mediated secretion of proteins involved in respiration of
108 insoluble substrates by porin-cytochrome modules like MtrABC seems to be quite common.
109 *S. oneidensis* can respire not only insoluble metals but also extracellular dimethyl sulfoxide
110 (DMSO). *dmsA* and *dmsB* are two genes coding for homologues of the two subunits of the *E.*
111 *coli* DMSO reductase (the molybdenum cofactor-containing DmsA and the iron-sulfur cluster
112 containing subunit DmsB). They are localized downstream of *dmsE* and *dmsF*, which encode
113 two homologues of MtrA and MtrB, the periplasmic and outer membrane components of the

114 Fe(III) oxide respiration module (Gralnick et al., 2006) (Table 1). DmsA is a lipoprotein with
115 a Tat signal sequence, suggesting that it could be a membrane protein, while DmsB has no
116 signal sequence. Analysis of DmsB localization showed that it is present at the surface of the
117 bacteria and that this exposition depends on the presence of DmsA. Respiration of DMSO is
118 dependent on the presence of the DMSO reductase but also on a complete T2SS (Gralnick et
119 al., 2006). All *S. oneidensis* strains defective in T2S are unable to respire DMSO. Thus,
120 DmsA and DmsB are matured in the cytoplasm by insertion of their cofactor, DmsA crosses
121 the inner membrane through the Tat translocon with DmsB as a hitchhiker protein and the
122 DmsAB complex is secreted by a T2SS to surface of the bacteria where it can reduce DMSO.

123

124 **3. Tat signal sequence anchored proteins**

125 PnlH: plant cell wall degrading enzymes are the main virulence factors of the plant
126 pathogenic enterobacterium *Dickeya dadantii*. These enzymes, mostly pectinases, are secreted
127 by a T2SS named Out (Condemine et al., 1992, Shevchik and Condemine, 1998, Condemine
128 and Shevchik, 2000) . The *D. dadantii* genome contains the genes of a second complete
129 T2SS, named Stt. It has probably been acquired by lateral gene transfer since it is flanked by
130 two tRNA_{val} genes and since it is absent in the close relatives *D. zea* and *D. paradisiaca*. The
131 only known substrate of the Stt T2SS is PnlH, a protein encoded by the gene located
132 downstream of the *stt* genes (Table 1). The large C-terminal part of PnlH is homologue to
133 pectin lyases. In addition the protein possesses a 40 residue N-terminal extension that looks
134 like a Tat signal sequence although it does not possess a LepB or LspA cleavage site. In
135 localization experiments, PnlH was not found in the culture supernatant but in the OM
136 fraction. N-terminal sequencing of the PnlH purified from the OM showed that the N-terminal
137 extension is not cleaved (Ferrandez and Condemine, 2008). PnlH can be detected at the

138 surface of the bacteria. However, in a *stt* mutant, while PnlH is still anchored in the OM, it
139 can no longer be detected at the surface of the bacteria demonstrating that Stt is required for
140 the surface exposition of PnlH. When PnlH is expressed in *E. coli* (i.e. in the absence of Stt),
141 the protein is found in the OM but is not surface exposed. When the 40 amino acid N-
142 terminus of PnlH was fused to reporter proteins, the hybrid proteins were found in the OM
143 both in *D. dadantii* and *E. coli* but were not present at the surface of the bacteria (Ferrandez
144 and Condemine, 2008). Thus, the two parts of PnlH contain different targeting information:
145 the N-terminus of the protein allows translocation by the Tat machinery and targeting to the
146 OM and the pectin lyase part allows secretion by Stt. However, information required for
147 secretion might also be present in the N-terminal part since its replacement by the signal
148 sequence of HybO, a Tat-dependent periplasmic protein, addresses PnlH to the periplasm and
149 not to the outer medium. No enzymatic activity was detected for PnlH. This protein could
150 rather bind plant cell wall pectin and thus be involved in the attachment of the bacteria to its
151 plant host.

152

153 **4. Surface bound but not anchored proteins**

154 Heat-labile toxin: enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) produces a heat-labile toxin (LT)
155 that is one of the virulence factors of the bacteria, causing diarrhea. LT is an AB₅ toxin,
156 consisting of a single A subunit (LTA) and a ring of five B subunits (LTB). In ETEC strain
157 E9034A, LT is found associated with the OM fraction and in OMV (Horstman and Kuehn,
158 2000). LT is secreted by the ETEC strain H10407 (Tauschek et al., 2002) but when expressed
159 in *E. coli* K-12 it stays in the periplasm. In contrast, when expressed in *Vibrio cholerae*,
160 which secretes the very similar cholera toxin (CT), LT is found in the outer medium. This
161 secretion is dependent on the presence of a functional Eps T2SS (Michel et al., 1995). This let

162 suppose that an efficient secretion system could be missing in *E. coli* K-12. Overexpression of
163 Gsp, the *E. coli* K-12 T2SS, in a *hns* background allowed secretion of LT across the outer
164 membrane and its association to the cell surface (Horstman and Kuehn, 2002). This
165 association occurs through the interaction of LTB with the LPS. The nature of this interaction
166 has been analyzed. LT binds to the surface of deep-rough mutants but not to lipid A,
167 indicating that the 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo) core is required for LT binding
168 (Horstman et al., 2004). LT and CT bind to *E. coli* LPS while neither is capable of binding to
169 the surface of *V. cholerae*. The difference in the core structure of the *E. coli* and *V. cholerae*
170 LPS resides in the presence of a phosphorylation on *Vibrio* Kdo. This phosphorylation was
171 shown to prevent LP and CT binding. Thus, although a LPS binding pocket is present in the
172 structure of both proteins, CT cannot bind LPS and it is secreted in the extracellular medium
173 by *V. cholerae* (Horstman et al., 2004).

174

175 **5. Why and how to stay membrane bound?**

176 Although bacteria have evolved several ways to insert proteins in their OM or to
177 secrete them in the outer medium, they have few ways to display proteins with catalytic
178 activity, multimeric proteins or cofactor containing proteins at their surface. Some β -barrel
179 outer membrane proteins have long loops extending outside the surface of the bacteria.
180 However, except the protease OmpT which has its active site on the extracellular loops, the
181 active site of all the β -barrel proteins that have a catalytic activity (PagL, PagP, LpxR) is
182 located on the outer face of the barrel (i.e. in the bilayer) (Bishop, 2008). T1SS release
183 proteins in the outer medium. T3SS, T4SS, T6SS are contact dependent secretion systems that
184 deliver proteins into other cells (Hayes et al., 2010). Only T2SS and T5SS can address
185 proteins to the bacterial surface. However, proteins secreted by T5SS cross the outer

186 membrane in an unfolded state since they have to go through the pore of a β -barrel porin. It is
187 assumed that they fold spontaneously once at the surface of the bacteria. Most of the time
188 they have a β -helix fold, although EstA has a globular fold consisting primarily of α -helices
189 (Junker et al., 2006) (van den Berg, 2010). Most of the T5SS substrates are adhesines and
190 only a few of them have enzymatic activity, like the esterase EstA. In any case, no
191 preassembled multimeric proteins or proteins with a cofactor can be secreted by a T5SS.
192 Therefore, the examples of surface exposed enzymes presented above can be secreted only by
193 a T2SS: MtrA and OmcA contain 10 haem groups that are inserted in the proteins while
194 crossing the periplasm, PnlH is a Tat substrate and it is folded in the cytoplasm, DmsA is a
195 Tat substrate that contains a cofactor and it carries DmsB, the heat labile toxin LT is a
196 multimeric protein and Pula is a large protein that does not fold in β -helix. Thus, T2SS
197 appear as the most versatile of the secretion systems, allowing secretion of proteins that could
198 not be secreted otherwise.

199

200 **6. How can T2SS handle membrane anchored proteins?**

201 T2SS substrates are mostly soluble proteins. According to the current model
202 (Korotkov et al., 2012), the protein once folded in the periplasm interacts with the T2SS inner
203 membrane component GspC, the secretin GspD and is pushed through the pore formed by the
204 secretins to be released into the outer medium. This model cannot explain how proteins
205 tethered to the outer or the inner membrane can be secreted and remain anchored at the
206 surface of the bacteria. The localization of some of the proteins described above in the
207 absence of their cognate T2SS has been determined: PnlH is in the outer membrane and Pula
208 in the inner membrane (Ferrandez and Condemine, 2008) (Pugsley and Kornacker, 1991).

209 However, it is not known if this location is by default or if a secretion intermediate really
210 exists in these membranes.

211 Two pathways are known to be involved in the targeting of proteins to the OM: the
212 Lol pathway for lipoproteins (Okuda and Tokuda, 2011) and the SurA/DegP/Skp-Bam
213 pathway for β -barrel proteins (Ricci and Silhavy, 2012). Whether these pathways are required
214 for the secretion of OM-anchored T2SS substrates seems to depend on the substrate.
215 Lipoprotein maturation occurs at the periplasmic side of the inner membrane and anchors the
216 mature protein in this membrane. Lipoproteins lacking an inner membrane retention signal are
217 extracted from the inner membrane by the ABC transporter, LolCDE, and are transferred to
218 LolA, a periplasmic chaperone that protects the lipid moiety of lipoproteins from the
219 hydrophilic environment of the periplasm. LolA then delivers lipoproteins to the outer
220 membrane lipoprotein LolB that is required for their insertion into the periplasmic face of the
221 outer membrane (Okuda and Tokuda, 2011). The role of LolA in the targeting of the secretin
222 PulD to the outer membrane has been studied but its implication in PulA secretion is
223 unknown (Collin et al., 2011). PulA and SslE have an inner membrane retention signal, and
224 OmcA was detected in the inner membrane when expressed in an *E. coli* strain lacking a
225 T2SS (Donald et al., 2008). Thus, these proteins probably do not interact with the Lol
226 machinery. If this hypothesis is true, how is the lipid anchor extracted from the inner
227 membrane, an energetically costly process, and how is the lipid moiety shielded during the
228 course of the periplasmic transit? It is possible that some T2SS components are involved in
229 these processes but whether other factors are involved is an open question.

230 In the absence of its cognate T2SS, PnlH is found at the inner face of the OM,
231 indicating that contrary to what is observed for PulA, PnlH is targeted to the OM before its
232 secretion (Ferrandez and Condemine, 2008). It has been recently shown that after export by
233 Tat, PnlH is targeted to the OM by the periplasmic chaperone SurA. Moreover a direct or

234 indirect role of the Bam complex for its insertion in the OM has been suggested (Rondelet
235 and Condemine, 2012). This indicates that for this type of proteins, at least some components
236 of the β -barrel protein targeting pathway works together with the T2SS to ensure the secretion
237 of proteins to the outer face of the OM.

238 How are then these proteins inserted at the surface of the bacteria? For the
239 lipoproteins, an intermediate with insertion in the periplasmic face of the OM is unlikely since
240 an OM-anchored PulA mutant has been shown to be poorly secreted (Pugsley and Kornacker,
241 1991). A direct insertion of the secreted lipoprotein into the outer leaflet of the outer
242 membrane by the T2SS is a possibility. Alternatively, after secretion, the lipoprotein could be
243 bound to the bacterial surface in a way similar to that of LT. The fact that PulA, MtrC, OmcA
244 and SsIE are released slowly from the bacterial surface could indicate that their anchoring is
245 not very strong. In the case of PnlH, it is not known if the anchoring peptide is extracted from
246 the periplasmic face of the OM and reinserted into the extracellular face after secretion or if
247 the protein goes through the secretin SttD pore while the anchor stays in the periplasmic face
248 of the OM (Ferrandez and Condemine, 2008). Further studies are required to answer these
249 questions.

250

251 **7. How to identify new surface exposed membrane proteins?**

252 The main reason why examples of surface exposed membrane proteins secreted by a
253 T2SS are so scarce is that they have not been looked for. Global methods to identify T2SS
254 substrates analysed culture supernatant, in which this type of proteins is not present (Sikora et
255 al., 2011, Kazemi-Pour et al., 2004, Coulthurst et al., 2008). However, a careful analysis of
256 the literature shows that other surface exposed T2SS substrates could exist: a protein involved

257 in Mn²⁺ oxidation by *Pseudomonas putida* is localized at the surface of the bacteria by a
258 T2SS. However the corresponding protein has not been identified (De Vrind et al., 2003).
259 Several *Geobacter sulfurreducens* proteins involved in metal reduction could also be
260 delivered to the outer membrane by a T2SS (Qian et al., 2007, Mehta et al., 2006). New
261 global methods for analysis of membrane proteins have been developed and they now can be
262 used to identify this type of T2SS substrates. A spectrometric analysis of surface membrane
263 proteins labelled with a membrane-impermeable probe followed by stable ¹⁸O labelling was
264 used to compare wild type *S. oneidensis* and a T2SS mutant. In addition to the known surface
265 exposed Gsp substrates MtrC, OmcA, DmsA and DmsB, three additional OM lipoproteins
266 were identified as T2SS substrates (Zhang et al., 2011). This type of approach seems very
267 promising to identify new T2SS-dependent surface exposed proteins.

268

269 **8. Conclusion**

270 T2SS substrates identified up to now are mostly extracellular soluble proteins, which
271 are virulence factors produced by pathogenic bacteria. We show here that some T2SS
272 substrates can be surface-bound and involved in various biological processes such as
273 respiration, biofilm formation, substrate binding or bacterial attachment. T2SS are present in
274 many non pathogenic bacteria found in various ecosystems (Cianciotto, 2005, Evans et al.,
275 2008). For several of them, their substrate is not known. Surface bound proteins should not be
276 forgotten when looking for these substrates.

277

278 **Acknowledgments**

279 We thank Vladimir Shevchik, Nicole Cotte-Pattat and Olivera Francetic for reading the
280 manuscript.

281

282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306

References

- Baldi, D.L., Higginson, E.E., Hocking, D.M., Praszquier, J., Cavaliere, R., James, C.E., Bennett-Wood, V., Azzopardi, K.I., et al., 2012. The type II secretion system and its ubiquitous lipoprotein substrate, SsIE, are required for biofilm formation and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 80, 2042-2052.
- Bishop, R., 2008. Structural biology of membrane-intrinsic β -barrel enzymes: Sentinels of the bacterial outer membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 1778, 1881-1896.
- Cianciotto, N.P., 2005. Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol.* 13, 581-588.
- Collin, S., Guilvout, I., Nickerson, N.N., Pugsley, A.P., 2011. Sorting of an integral outer membrane protein via the lipoprotein-specific Lol pathway and a dedicated lipoprotein pilotin. *Mol. Microbiol.* 80, 655-665.
- Condemine, G., Dorel, C., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., 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, 3199-3211.
- Condemine, G., Shevchik, V.E., 2000. Overproduction of the secretin OutD suppresses the secretion defect of an *Erwinia chrysanthemi outB* mutant. *Microbiology* 146, 639-647.
- Coulthurst, S.J., Lilley, K.S., Hedley, P.E., Liu, H., Toth, I.K., Salmond, G.P., 2008. DsbA plays a critical and multifaceted role in the production of secreted virulence factors by the phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *J. Biol. Chem.* 283, 23739-23753.
- d'Enfert, C., Ryter, A., Pugsley, A.P., 1987. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Klebsiella pneumoniae* genes for production, surface localization and secretion of the lipoprotein pullulanase. *Embo J.* 6, 3531-3538.

307 De Vrind, J., De Groot, A., Brouwers, G.J., Tommassen, J., De Vrind-De Jong, E., 2003.
308 Identification of a novel Gsp-related pathway required for secretion of the manganese-
309 oxidizing factor of *Pseudomonas putida* strain GB-1. *Mol. Microbiol.* 47, 993-1006.

310 DebRoy, S., Dao, J., Soderberg, M., Rossier, O., Cianciotto, N.P., 2006. *Legionella*
311 *pneumophila* type II secretome reveals unique exoproteins and a chitinase that promotes
312 bacterial persistence in the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 19146-19151.

313 DiChristina, T.J., Moore, C.M., Haller, C.A., 2002. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV)
314 reduction by *Shewanella putrefaciens* requires *ferE*, a homolog of the *pulE* (*gspE*) type II
315 protein secretion gene. *J. Bacteriol.* 184, 142-151.

316 Donald, J.W., Hicks, M.G., Richardson, D.J., Palmer, T., 2008. The *c*-type cytochrome
317 OmcA localizes to the outer membrane upon heterologous expression in *Escherichia coli*.
318 *J. Bacteriol.* 190, 5127-5131.

319 Evans, F.F., Egan, S., Kjelleberg, S., 2008. Ecology of type II secretion in marine
320 gammaproteobacteria. *Environ. Microbiol.* 10, 1101-1107.

321 Ferrandez, Y., Condemine, G., 2008. Novel mechanism of outer membrane targeting of
322 proteins in Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 69, 1349-1357.

323 Galnick, J.A., Vali, H., Lies, D.P., Newman, D.K., 2006. Extracellular respiration of
324 dimethyl sulfoxide by *Shewanella oneidensis* strain MR-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103,
325 4669-4674.

326 Hayes, C.S., Aoki, S.K., Low, D.A., 2010. Bacterial contact-dependent delivery systems.
327 *Annu. Rev. Genet.* 44, 71-90.

328 Horstman, A.L., Bauman, S.J., Kuehn, M.J., 2004. Lipopolysaccharide 3-deoxy-D-manno-
329 octulosonic acid (Kdo) core determines bacterial association of secreted toxins. *J. Biol.*
330 *Chem.* 279, 8070-8075.

331 Horstman, A.L., Kuehn, M.J., 2000. Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-
332 labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 275, 12489-12496.

333 Horstman, A.L., Kuehn, M.J., 2002. Bacterial surface association of heat-labile enterotoxin
334 through lipopolysaccharide after secretion via the general secretory pathway. *J. Biol.*
335 *Chem.* 277, 32538-32545.

336 Junker, M., Schuster, C.C., McDonnell, A.V., Sorg, K.A., Finn, M.C., Berger, B., Clark, P.L.,
337 2006. Pertactin β -helix folding mechanism suggests common themes for the secretion and
338 folding of autotransporter proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 4918-4923.

339 Kazemi-Pour, N., Condemine, G., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., 2004. The secretome of the
340 plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Proteomics* 4, 3177-3186.

341 Korotkov, K.V., Sandkvist, M., Hol, W.G., 2012. The type II secretion system: biogenesis,
342 molecular architecture and mechanism. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 336-351.

343 Lower, B.H., Yongsunthon, R., Shi, L., Wildling, L., Gruber, H.J., Wigginton, N.S., Reardon,
344 C.L., Pinchuk, G.E., et al., 2009. Antibody recognition force microscopy shows that outer
345 membrane cytochromes OmcA and MtrC are expressed on the exterior surface of
346 *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2931-2935.

347 Mehta, T., Childers, S.E., Glaven, R., Lovley, D.R., Mester, T., 2006. A putative multicopper
348 protein secreted by an atypical type II secretion system involved in the reduction of
349 insoluble electron acceptors in *Geobacter sulfurreducens*. *Microbiology* 152, 2257-2264.

350 Michel, L.O., Sandkvist, M., Bagdasarian, M., 1995. Specificity of the protein secretory
351 apparatus: secretion of the heat-labile enterotoxin B subunit pentamers by different species
352 of gram- bacteria. *Gene* 152, 41-45.

353 Moriel, D.G., Bertoldi, I., Spagnuolo, A., Marchi, S., Rosini, R., Nesta, B., Pastorello, I.,
354 Corea, V.A., et al., 2010. Identification of protective and broadly conserved vaccine

355 antigens from the genome of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad.
356 Sci. 107, 9072-9077.

357 Okuda, S., Tokuda, H., 2011. Lipoprotein sorting in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 65, 239-
358 259.

359 Poquet, I., Faucher, D., Pugsley, A.P., 1993. Stable periplasmic secretion intermediate in the
360 general secretory pathway of *Escherichia coli*. Embo J. 12, 271-278.

361 Pugsley, A.P., Kornacker, M.G., 1991. Secretion of the cell surface lipoprotein pullulanase in
362 *Escherichia coli*. Cooperation or competition between the specific secretion pathway and
363 the lipoprotein sorting pathway. J. Biol. Chem. 266, 13640-13645.

364 Pugsley, A.P., Poquet, I., Kornacker, M.G., 1991. Two distinct steps in pullulanase secretion
365 by *Escherichia coli* K12. Mol. Microbiol. 5, 865-873.

366 Qian, X., Reguera, G., Mester, T., Lovley, D.R., 2007. Evidence that OmcB and OmpB of
367 *Geobacter sulfurreducens* are outer membrane surface proteins. FEMS Microbiol. Lett.
368 277, 21-27.

369 Ricci, D.P., Silhavy, T.J., 2012. The Bam machine: A molecular cooper. Biochim. Biophys.
370 Acta. 1818, 1067-1084.

371 Richardson, D.J., Butt, J.N., Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Shi, L., Edwards, M.J., White,
372 G., Baiden, N., et al., 2012. The 'porin-cytochrome' model for microbe-to-mineral electron
373 transfer. Mol. Microbiol. 85, 201-212.

374 Rondelet, A., Condemine, G., 2012. SurA is involved in the targeting to the outer membrane
375 of a Tat signal sequence anchored protein. J. Bacteriol. 194, 6161-6142.

376 Shevchik, V.E., Condemine, G., 1998. Functional characterization of the *Erwinia*
377 *chrysanthemi* OutS protein, an element of a type II secretion system. Microbiology 144,
378 3219-3228.

379 Shi, L., Deng, S., Marshall, M. J., Wang, Z., Kennedy, D.W., Dohnalkova, A.C., Mottaz,
380 H.M., Hill, E.A., et al., 2008. Direct involvement of type II secretion system in
381 extracellular translocation of *Shewanella oneidensis* outer membrane cytochromes MtrC
382 and OmcA. J. Bacteriol. 190, 5512-5516.

383 Sikora, A.E., Zielke, R.A., Lawrence, D.A., Andrews, P.C., Sandkvist, M., 2011. Proteomic
384 analysis of the *Vibrio cholerae* type II secretome reveals new proteins, including three
385 related serine proteases. J. Biol. Chem. 286, 16555-16566.

386 Tauschek, M., Gorrell, R.J., Strugnell, R.A., Robins-Browne, R.M., 2002. Identification of a
387 protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic
388 strain of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. 99, 7066-7071.

389 van den Berg, B., 2010. Crystal structure of a full-length autotransporter. J. Mol. Biol. 396,
390 627-633.

391 Yang, J., Baldi, D.L., Tauschek, M., Strugnell, R.A., Robins-Browne, R.M., 2007.
392 Transcriptional regulation of the *yghJ-pppA-yghG-gspCDEFGHIJKLM* cluster, encoding
393 the type II secretion pathway in enterotoxigenic *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 189, 142-
394 150.

395 Zhang, H., Brown, R.N., Qian, W.J., Monroe, M.E., Purvine, S.O., Moore, R.J., Gritsenko,
396 M.A., Shi, L., et al., 2011. Quantitative analysis of cell surface membrane proteins using
397 membrane-impermeable chemical probe coupled with ¹⁸O labeling. J. Proteome Res. 9,
398 2160-2169.

Table 1 : Main characteristics of proteins described in the text.

Protein	Organism	Presumed nature of the association with the OM	Relevant characteristics	Localization in the absence of the cognate T2SS	Function
PulA	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Lipoprotein, anchored by a N-terminal acylation	Lipoprotein inner membrane retention signal	Inner membrane	Starch debranching enzyme
SsIE	<i>Escherichia coli</i> (EPEC)	Lipoprotein, anchored by a N-terminal acylation	Lipoprotein inner membrane retention signal	Undetermined	Involved in biofilm formation and pathogenicity
MtrC	<i>Shewanella oneidensis</i>	Lipoprotein, anchored by a N-terminal acylation	Acquires 10 haems in the periplasm	Undetermined	Extracellular respiration
OmcA	<i>Shewanella oneidensis</i>	Lipoprotein, anchored by a N-terminal acylation	Acquires 10 haems in the periplasm, secreted in <i>E. coli</i>	Inner membrane in <i>E. coli</i>	Extracellular respiration
DmsA	<i>Shewanella oneidensis</i>	Lipoprotein, anchored by a N-terminal acylation	Tat substrate, bound to DmsB	Undetermined	Extracellular respiration
DmsB	<i>Shewanella oneidensis</i>	Bound to DmsA	Exported and secreted bound to DmsA	Undetermined	Extracellular respiration
PnIH	<i>Dickeya dadantii</i>	Uncleaved Tat signal peptide	Tat substrate, targeted to the periplasmic face of the OM in <i>E. coli</i>	Periplasmic face of the OM	Unknown
LT	<i>Escherichia coli</i> (ETEC)	Interaction with LPS	Constituted of a subunit of LTA and 5 subunits of LTB	Undetermined	Heat Labile Toxin