



HAL
open science

Caractérisation de facteurs de virulence impliquant les systèmes de sécrétion bactériens

Quentin Bertrand

► **To cite this version:**

Quentin Bertrand. Caractérisation de facteurs de virulence impliquant les systèmes de sécrétion bactériens. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT : 2019GREAV058 . tel-02957681

HAL Id: tel-02957681

<https://theses.hal.science/tel-02957681v1>

Submitted on 5 Oct 2020

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

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE
GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Biologie Structurale et Nanobiologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Quentin BERTRAND

Thèse dirigée par **Andréa DESSEN, DR CNRS**

préparée au sein de l'**Institut de Biologie Structurale**
groupe **Pathogénie Bactérienne**
dans l'**École Doctorale de Chimie & Sciences du Vivant**

Caractérisation de facteurs de virulence impliquant les systèmes de sécrétion bactériens

Thèse soutenue publiquement le **12 décembre 2019**
devant un jury composé de :

Dr. Ina ATTREE

Directrice de Recherche, PBRC, Grenoble, Présidente du jury

Dr. Romé VOULHOUX

Directeur de Recherche, Laboratoire de Chimie Bactérienne, Marseille,
Rapporteur

Dr. Vincent VILLERET

Directeur de Recherche, Université de Lille 1, Rapporteur

Dr. Ariel BLOCKER

Chercheuse sénior, Evotec, Lyon, Examinatrice



Remerciements :

Mes premiers remerciements vont à Andréa à qui je dois ma blouse, ma paillasse et ma thèse. Merci d'avoir choisi le jeune moi d'il y a 4 ans et l'avoir guidé jusqu'à la fin.

Je remercie aussi les membre de l'équipe PATBAC ; merci à Carlos, à qui je dois énormément de ce que je sais en cristallographie maintenant, mais aussi pour son humour piquant au quotidien, merci aussi à Alex pour les nombreux conseils en biochimie, les escapes games et discussions sur la musique !

Une pensée à Viviana, Charlotte et Anne-Emmanuelle qui m'ont également appris beaucoup en biochimie et en biologie moléculaire.

Je remercie aussi Lionnel pour toute l'aide avec le Cell-Free et les petites discussions marrantes pendant les préparations. Un merci aussi à Orso et Audrey pour toute l'aide qu'ils m'ont apportés lorsque je commençais à m'intéresser à la manipulation des lipides et détergents.

Un merci aussi à l'ancienne (mais pas si ancienne quand même) génération de thésards et post-doc de l'IBS, Jérôme, Mickaël et Pauline. Merci à vous trois pour les conseils, le soutien et l'ambiance pendant les repas. Travailler avec Pauline a été un réel plaisir. Aussi, un merci spécial à Mickaël pour avoir relu et corrigé une partie de ma thèse (et remotivé le thésard en question).

A special thanks to Peter, whom it was a real pleasure to work with and who brought in the team the project that made me solve a structure.

Un merci aussi à l'équipe PBRC avec Ina, Philippe, Pauline, Alice, Antoine, Eric, Sylvie et Michel avec qui j'ai pu travailler et faire avancer le projet ExIA.

Pour les remerciements plus personnels, j'aimerais remercier « La Meute », unis par des instants mémorables avec parfois une quantité non négligeable d'un certain liquide nettoyant de paillasse dans le sang. Merci à Raleb, où « Habibi », Joyce, le frère de pipi musicien, Daniel, le gars au vélo couché, Charles, le tombeur de ces Dames, et Jannek, à qui je fais un salut de gentleman, merci pour ces moments.

Je tiens aussi à remercier Emilie, Müge, Anna et Julie, des personnes adorables qui ont toujours été à l'écoute autour de nombreuses pause-café. Une pensée aussi pour Jennifer qui m'a aidé et soutenu durant ces moments.

Je pense aussi à Marko, une sorte de demi-frère serbe, avec qui j'ai pu partager beaucoup de moment de ma thèse. Tel un membre de ma famille, il a pu être témoin des meilleurs comme des pires moments de ma thèse. Je me rappellerais, bien sûr, des meilleurs moments, en incluant Laura, Sylvia et Charles, l'un d'eux étant probablement la vue d'aurores boréales en Islande.

Je pense aussi à Sylvain, ancien collègue de Master, Coloc, Mentor de Ski et compteur de temps invétéré. Associé à Alexandra, je suis honoré en tant que « rampant » de vous dire merci pour tous les moments de SKKKKKIIIIII et autres !!

Je pense aussi à la nouvelle génération de thésards, Kévin, Jean-Mathieu, Sarah, Lorenzo ; à qui je souhaite d'abord un bon courage et ensuite une bonne réussite.

Je tiens aussi évidemment à remercier ma famille, de mes parents à mes grands-parents, en passant par mes cousins, merci d'avoir été là pour créer tous ces moments de retrouvailles qui m'ont permis de respirer hors de la thèse.

Celle-là elle est pour toi petit frère !

Pour que tu puisses être aussi fier de moi que je suis fier de toi.

Merci à tous !

Avant- propos :

Je tiens à remercier l'ANR et la Fondation Finovi qui ont financées mes quatre années de thèse et m'ont permis de travailler sur des sujets aussi intéressants qu'ExlAB, TagQ-TagR ou encore LMO2686.

Au cours de ces quatre ans, j'ai pu travailler sur plusieurs facteurs de virulence bactériens mais aussi sur plusieurs pathogènes.

Mon projet principal et mon projet secondaire étaient liés à la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Ils visaient à la caractérisation de deux systèmes de sécrétion de cette bactérie étant le type V et le type VI. Sur le système de sécrétion de type V, les protéines étudiées étaient ExlA et ExlB. Sur ce projet j'ai pu utiliser des techniques tel que l'expression cell-free, l'AFM, la RMN, la LCP, le SAXS, et le SEC-MALLS. J'ai pu aussi me familiariser avec l'utilisation des lipides et des détergents. Après de nombreuses expériences, un article scientifique qui décrit les données obtenues, ou je signerai en tant que premier auteur, est en cours d'écriture.

Ensuite, j'ai pu travailler sur le système de sécrétion de type VI de *P. aeruginosa* avec les protéines TagQ et TagR. Même si nous n'avons pas obtenus les structures de ces deux protéines, j'ai pu améliorer mes techniques de purification de protéines et de cristallogénèse qui ont été essentielles pour un autre projet.

Cet autre projet visait à la caractérisation à haute résolution des structures des sécrétines et d'une pilatine du système de sécrétion de type II de *Aeromonas hydrophila* et de *Vibrio vulnificus*. Sur ce projet, j'ai travaillé sur la pilatine du système de sécrétion de type II de *V. vulnificus*. J'ai pu grâce à l'expérience obtenue sur le projet TagQ-TagR être autonome sur les parties de biochimie, de cristallisation et de collecte de données de diffraction des cristaux aux rayons X. Nous avons ensuite obtenu la structure que j'ai pu affiner. L'ensemble des données obtenues a fait l'objet d'un article publié récemment dans PLoS Pathogens, ou je signe en tant que co-auteur.

Ensuite, pour rester chez les bactéries à Gram négatif, j'ai pu travailler sur la Colibactine de *E. coli* PKS+. J'ai été impliqué dans le projet dans ma dernière année de thèse ou j'ai pu travailler à la purification d'une protéine de 360 kDa.

Enfin, j'ai pu travailler en collaboration avec Alessandro Pagliuso et Pascale Cossart sur le pathogène à Gram positif *Listeria monocytogenes* et plus précisément sur la protéine LMO2686. Le but était d'optimiser un protocole de production et de purification pour obtenir un échantillon de protéine compatible avec des tests d'activité. Les données obtenues dans cette étude ont permis la caractérisation de la protéine et ont été incluses dans un article accepté dans Cell Host & Microbe, ou je signe en tant que co-auteur.

Au final, j'ai pu utiliser de nombreuses techniques de biophysiques avancées tels que l'AFM, la RMN ou la cristallographie aux rayons X. Ceci m'a permis de développer un catalogue de compétences diverses.

Liste des abréviations :

ABC : ATP-binding cassette
ADN : Acide Désoxyribonucléique
AFM : Atomic Force Microscopy
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adénosine Triphosphate
AUC : Analytical Ultra-Centrifugation
BLAST : Basic Local Aligement Search Tool
Cdi : Contact Dependant Inhibition
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CMC : Concentration Micellaire Critique
DDM : DoDecyl Maltopyranoside
DLS : Dynamic Light Scattering
DRM : Detergent Resistant Membrane
DSM : Detergent Soluble Membrane
EPEC : Enteropathogenic *E. coli*
ETEC : EnteroToxigenic *E. coli*
ESRF : European Synchrotron Radiation Facility
ExIA : Exolysine A
ExIB : Exolysine B
FFAS : Fold and Function ASSignment
FGE : Formylglycin Generating Enzyme
Fha : Filamentous hemagglutinin adhesin
FL : Full Length
FPLC : Fast Protein Liquid Chromatography
Gsp : General Secretion Pathway
HSI : Hcp-secretion island
ITC : Isothermal Titration Calorimetry
LB : LipoBox
LCP : Lipic Cubic Phase
LOL : Localization Of Lipoproteins
LUV : Large Unilamellar Vesicle
MAD : Multiple-wavelength Anomalous Diffusion
MALLS : Multi-Angle Laser Light Scattering

MbCD : Methyl- β -CycloDextrine
MBP : Maltose Binding Protein
MFP : Membrane Fusion Protein
MMS : Microseeds Matrix Screening
OD : Optical Density
OMF : Outer Membrane Factor
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PC : Phosphatidylcholine
PE : Phosphatidyléthanolamine
PFT : Pore Forming Toxin
PI : Propidium Iodide
PS : Peptide Signal
Psc : *Pseudomonas* secretion components
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RTX : Repeats In Toxins
SAD : Single wavelength Anomalous Diffusion
SAXS : Small Angle X-Ray Scattering
SERp : Surface Entropy Reduction Prevision
Shl : Serratia hemolysin
SSTI-VI : Système de sécrétion de types 1 à 6
SEC : Size Exclusion Chromatography
SUV : Small Unilamellar Vesicle
POTRA : POLypeptide TRansport Associated
TAA : Trimeric Autotransporter Adhesin
Tag : Type-six accesory gene
Tat : Twin Arginine Translocation
TEV : Tobacco Etch Virus
TM : Melting Temperature
TPS : Two partner system
TPSS : Two Partner Secretion System
TSA : Thermal Shift Assay
Tse : Type six secretion exported
Tss : Type six secretion
UV : Ultra-Violet

Table des matières

Remerciements :.....	2
Avant- propos :.....	4
Liste des abréviations :	5
Introduction :	13
I. Introduction :.....	15
I.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et infections :.....	15
I.2. Résistance aux antibiotiques chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> :	16
I.3. Facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i> :.....	16
I.3.1. Le Système de sécrétion de type I :.....	17
I.3.2. Le système de sécrétion de type II :	19
I.3.3. Le système de sécrétion de type III :	20
I.3.4. Le système de sécrétion de type VI :.....	22
I.3.5. Le système de sécrétion de type V :.....	25
I.3.5.1. Les différents systèmes de sécrétion de type V :.....	26
I.3.5.1.1. Le SST5a :.....	26
I.3.5.1.2. Le SST5b :.....	27
I.3.5.1.3. Le SST5c :.....	27
I.3.5.1.4. Le SST5d :.....	28
I.3.5.1.5. Le SST5e :.....	28
I.3.5.1.6. Le SST5f :	29
Exolysine A et Exolysine B	31
I.1. Introduction au contexte de découverte de l'Exolysine	32
I.1.1. Découverte de la souche CLJ1 et de l'Exolysine	32
I.1.2. Comportement d'ExlA <i>in vivo</i> :.....	33
I.2. Analyses des informations apportées par les séquences de ExlB et ExlA.....	35
I.2.1. Concernant ExlB :.....	35
I.2.2. Concernant ExlA :	37
I.2.2.1. Homologie avec ShlA :	37
I.2.2.2. Homologie avec PhaB :.....	38
I.2.2.3. Prédiction de structures secondaires :.....	39
I.2.2.4. Fonctions des hélices β chez d'autres protéines :.....	39
I.2.2.5. Le domaine C-terminal :	42
II. Objectifs de cette partie de la thèse :	42

III.	La construction ExIACter :	43
III.1.1.	Identification et sous-clonage d'une forme dégradée d'ExIACter :	45
III.1.2.	Changement de système d'expression pour le Cell-Free :	48
III.2.	Caractérisations de l'échantillon <i>in vitro</i> :	49
III.2.1.	Expérience de Résonance Magnétique nucléaire 1D :	49
III.2.2.	Caractérisation de l'échantillon ExIACter avec le SEC-MALLS :	51
III.2.3.	Caractérisation de l'échantillon avec les expériences SAXS :	52
III.2.4.	Conclusion sur l'échantillon en solution :	54
III.3.	Caractérisation de l'échantillon en milieu lipidique :	55
III.3.1.	Identification de lipides cibles d'ExIACter :	55
III.3.2.	Expérience de flottaison de liposomes :	57
III.3.3.	Reconstitution de membranes supportées et utilisation de la Microscopie de force atomique :	60
III.4.	Recherche d'informations structurales sur l'échantillon en milieu lipidique :	63
III.4.1.	Caractérisation par cristallographie rayons X :	63
III.5.	Conclusions sur l'échantillon ExIACter :	66
IV.	Les constructions ExIA Δ Cter et ExIAFL :	67
IV.1.1.	Caractérisation de la protéine ExIA Δ Cter :	67
IV.1.1.1.	Création du clone ExIA Δ Cter2 :	69
IV.1.1.2.	Création du clone ExIA Δ Cter6his :	70
IV.1.1.3.	Création du clone ExIA Δ CterCcoil :	71
IV.1.2.	Caractérisation de la protéine ExIA-FL :	72
IV.1.2.1.	Utilisation de la méthode Cell-Free pour exprimer le ExIA-FL en détergents :	72
IV.1.2.2.	Utilisation de la méthode Cell-Free pour exprimer le ExIA-FL avec des liposomes : 74	
IV.2.	Caractérisation de ExIA-FL et de ExIA Δ Cter en solution :	76
IV.3.	Caractérisation de ExIA-FL et de ExIA Δ Cter avec un environnement lipidique :	77
IV.3.1.	Caractérisation de l'interaction avec les liposomes par gradient de sucrose :	77
IV.3.2.	Caractérisation de l'interaction d'ExIA-FL avec des bicouches lipidiques par AFM :	78
IV.4.	Conclusion concernant les constructions ExIA-FL et ExIA Δ Cter :	79
V.	Utilisation d'ExIB :	79
V.1.	Expression des deux protéines ExIA et ExIB en Cell-Free :	79
V.2.	Expression de la protéine ExIB en bactéries :	81
VI.	Informations supplémentaires faisant parties de l'article (en cours d'écriture) :	83
VI.1.	Lors de l'infection, ExIA est localisée avec les lipids-rafts des cellules eucaryotes :	83
VI.2.	Lors de l'infection, ExIA Δ Cter est aussi localisée avec les lipid-rafts :	86

VII.	Discussion sur un possible modèle d'action d'ExIA :	88
VII.1.1.	Récapitulatif des informations sur le domaine C-terminal :	88
VII.1.2.	Récapitulatif des informations sur ExIA entière :	89
VII.1.3.	Récapitulatif des informations sur le domaine N-terminal :	89
VII.1.4.	Etablissement d'un possible mécanisme d'action :	91
VIII.	Annexes:	94
TagR et TagQ	95
I.	Introduction.....	97
I.1.	Le système de sécrétion de type VI :	97
I.2.	But du projet :	97
I.3.	Recherche de protéines homologues :	97
II.	Résultats :	99
II.1.	Purification de l'échantillon TagR :	99
II.2.	Caractérisation <i>in vitro</i> de TagR :	102
II.2.1.	Ultracentrifugation analytique :	102
II.2.2.	SEC-MALLS :	102
II.3.	Cristallogénèse et diffraction rayons-X :	104
II.3.1.	Criblage et amélioration des conditions de cristallisation :	104
II.3.2.	Diffraction des cristaux au synchrotron ESRF et analyse des données :	105
II.4.	Résolution du problème des phases :	105
II.4.1.	Tentative de phasage par remplacement moléculaire :	105
II.4.2.	Tentative de phasage par diffusion anormale :	106
II.4.2.1.	Par incorporation de Sélénométhionine :	106
II.4.2.2.	Par incorporation de possibles cofacteurs :	107
II.4.3.	Tentative de phasage par remplacement isomorphe :	108
II.5.	Optimisation de TagR pour obtenir de nouvelles conditions de cristallisation :	109
II.5.1.	Utilisation du serveur SERP pour obtenir des mutants de surface :	109
II.5.2.	Utilisation de la protéolyse ménagée pour définir des régions flexibles sur TagR :	112
II.6.	Amélioration de la diffraction des cristaux par ensemencement :	114
II.7.	Caractérisation du complexe TagQ-TagR :	116
II.7.1.	Purification et caractérisation de TagQ :	117
II.7.2.	Caractérisation du complexe TagQ-TagR :	121
II.7.3.	Caractérisation du complexe par SEC-MALLS :	121
III.	Conclusion :	123
IV.	Annexes :	124
EpsS	127

I.	Introduction.....	129
I.1.	Le système de sécrétion de type 2 :	129
I.2.	L'assemblage des secrétines :	130
I.3.	Intérêt du projet et implication.....	131
II.	Matériels et méthodes :	132
II.1.	Purification d'EpsS :	132
II.2.	Cristallisation d'EpsS :	133
II.3.	Collectes de données et résolution de la structure :	134
III.	Résultats :	134
IV.	Conclusions :	139
	Structure and assembly of pilotin-dependent and -independent secretins of the Type II Secretion System [205]:.....	141
	<i>Matériels et Méthodes</i> :	143
I.	Du gène à la protéine purifiée :	145
I.1.	Bio-informatique :	145
I.2.	Biologie moléculaire :	146
I.3.	Biochimie concernant l'expression des protéines :	147
I.3.1.	Tests d'expression et expression des protéines étudiées :	147
I.3.2.	Lyse des cellules après expression :	148
I.3.3.	<i>Expression pour marquage sélénométhionine</i> :	149
I.3.4.	Expression de protéines avec la technique Cell-free :	149
I.4.	Biochimie concernant la purification des protéines d'intérêt :	153
I.4.1.	Purification par colonne d'affinité au Nickel :	153
I.4.2.	Dialyse et digestion à la protease TEV :	154
I.4.3.	Purification par colonne d'exclusion stérique :	154
II.	Expériences biophysiques et caractérisation de l'échantillon :	155
II.1.	Création des liposomes :	155
II.2.	Expérience de flottaison des liposomes sur gradient de sucrose :	157
II.3.	Résonance magnétique nucléaire :	157
II.4.	Microscopie de Force Atomique :	158
II.5.	Spectrométrie de masse :	159
II.6.	Thermal Shift Assay, (TSA) :	159
II.7.	Protéolyse ménagée :	160
II.8.	SEC-MALLS :	161
II.9.	Phase lipidique cubique (LCP) :	161
II.10.	Cristallogénèse par goutte suspendue :	163

II.11.	Micro et macro-ensemencement :.....	164
II.12.	Trempe des cristaux :.....	165
II.13.	Diffraction des rayons-X :.....	165
II.14.	Traitement des données de diffractions :	165
II.15.	Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) :.....	166
	Article publié en collaboration avec Alessandro Pagluiso et Pascale Cossart de l'institut Pasteur [238] :	169
	<i>Bibliographie</i> :.....	171

Introduction :

I. Introduction :

Il est désormais établi que les phénomènes bactériens de résistance aux antibiotiques couramment utilisés deviennent préoccupants. Ces phénomènes de résistance entraînent une diminution du nombre de stratégies de lutte lors de l'infection d'un patient [1]. Parmi les pathogènes pour lesquels ce manque de stratégies disponibles est flagrant on observe les pathogènes de la famille ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et les espèces *Enterobacter*) [2], [3]. Ces pathogènes échappent aux effets des antibiotiques commerciaux disponibles et sont donc considérés par l'OMS comme des pathogènes prioritaires pour la recherche et développement de nouveaux antibiotiques [4]. Parmi ces pathogènes on retrouve *P. aeruginosa*, qui est un organisme fréquemment associé aux infections nosocomiales.

I.1. *Pseudomonas aeruginosa* et infections :

P. aeruginosa est très répandu dans l'environnement où il colonise les sols, les surfaces humides, les plantes et même le tube digestif de l'homme [5]; il est donc classifié comme ubiquitaire [6]. C'est une bactérie à Gram négatif qui se présente sous la forme d'un bacille d'environ 1 μm de long. Les colonies sont reconnaissables à leur couleur cyan qui est due en partie à la sécrétion de pigments tels que la pyocyanine ou la pyoverdine [6].

L'impact de cette bactérie dans les organisations de santé est manifeste puisqu'elle est à l'origine de 8.5% des infections nosocomiales ce qui correspond à environ 63 750 infections par an en France (correspondant environ à un Français sur 1000) [7]. Les infections nosocomiales touchent 5% des hospitalisations et sont fréquentes dans les unités de réanimation et de soins intensifs où le taux de personnes touchées atteint environ 24%. Cette propension à l'infection est due à la multitude d'intervention invasive. On retrouve *P. aeruginosa* ici, qui est responsable de 40% des décès chez les patients atteints de pneumonie acquise sous ventilation assistée [8]. Elle est aussi responsable d'infections sévères voir parfois létales chez les patients ayant la mucoviscidose, où elle colonise les voies respiratoires [9]. Les patients sévèrement brûlés et ceux étant immunodéprimés sont aussi extrêmement vulnérables à cette bactérie.

Grâce à son flagelle *P. aeruginosa* est un bacille motile capable de vivre sous forme planctonique [10]. Elle est aussi capable de se développer sous forme de biofilm qui est une structure composée de bactéries et de matrice sécrété par les bactéries elle mêmes. Cet assemblage forme une organisation dense qui accroît le phénomène de résistance aux antibiotiques qui ne peuvent accéder qu'aux couches superficielles du biofilm [11]. Ce mode

de vie est en réalité le mode de vie privilégié des bactéries [12] et c'est sous cette forme que *P. aeruginosa* est en majorité présente sur les tissus infectés [13]. Or, une fois l'hôte infecté, *P. aeruginosa* est particulièrement difficile à combattre car elle comporte de nombreux facteurs de virulence et de mécanismes de résistance aux antibiotiques.

I.2. Résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa* :

Comme il a été défini plus tôt, *P. aeruginosa* est un organisme dont la résistance aux antibiotiques est un réel problème sanitaire. Des souches multi-résistantes (non susceptibles à un agent dans trois catégories d'antimicrobiens différents), extrêmement résistantes (insensibles à au moins un agent dans toutes sauf une ou deux catégories d'antimicrobiens) et pan-résistantes aux antibiotiques (susceptibles à aucun antimicrobien) sont de plus en plus fréquentes [14]. Cette résistance provient de plusieurs phénomènes.

D'abord, son enveloppe est peu perméable aux antibiotiques et ceci pour plusieurs raisons. Premièrement, les porines qui sont des canaux présents à la membrane externe bactérienne laissent normalement passer de petites molécules y compris les antibiotiques. Mais chez *P. aeruginosa*, certaines porines sont imperméables aux antibiotiques voir sont absentes (chez certaines souches). Deuxièmement, chez *P. aeruginosa* on note la présence de pompes à efflux, qui renvoient alors le peu de molécules ayant traversé la paroi dans le milieu extérieur [15]. Il en résulte une faible concentration d'agents antimicrobiens dans la cellule, lui conférant une résistance aux molécules utilisées. Certaines pompes qui reconnaissent plusieurs types de molécules sont associées à des phénotypes de multirésistance [16].

A ces phénomènes s'ajoute la possible présence de la barrière supplémentaire due au biofilm. En effet le biofilm est capable de créer un gradient de concentration en molécules, et donc un gradient d'antibiotique. Cette diminution de concentration au sein du biofilm entraîne une augmentation de la résistance des bactéries présentes [17].

En plus de ces mécanismes, *P. aeruginosa* est capable d'exprimer des enzymes telles que les β -lactamases dégradant ou modifiant les antibiotiques les rendant inefficaces [18]. *P. aeruginosa* est aussi capable d'acquérir des gènes de résistance d'autres organismes à partir de plasmides, transposons ou bactériophages [16].

I.3. Facteurs de virulence de *P. aeruginosa* :

En plus de ces résistances intrinsèques, *P. aeruginosa* dispose de nombreux facteurs de virulence. L'une des souches les plus étudiées est la souche PAO1 dont le génome fut

séquencé en 2000 [19]. Cette souche est capable d'utiliser de nombreux systèmes de sécrétion dont la présence est corrélée à l'ampleur de la virulence bactérienne. Ces systèmes de sécrétion sont des complexes macromoléculaires qui sont présents dans la paroi bactérienne et qui permettent l'export de facteurs de virulence depuis le cytoplasme bactérien vers le milieu extérieur ou directement dans le cytoplasme de cellules cible [20] [21] [22].

Chez les bactéries à Gram négatif 7 systèmes de sécrétion ont été découverts mais leur présence est variable en fonction des organismes [22]. Chez la souche PAO1 de *P. aeruginosa*, on trouve 5 systèmes de sécrétion différents, le SSTIV étant absent [22].

I.3.1. Le Système de sécrétion de type I :

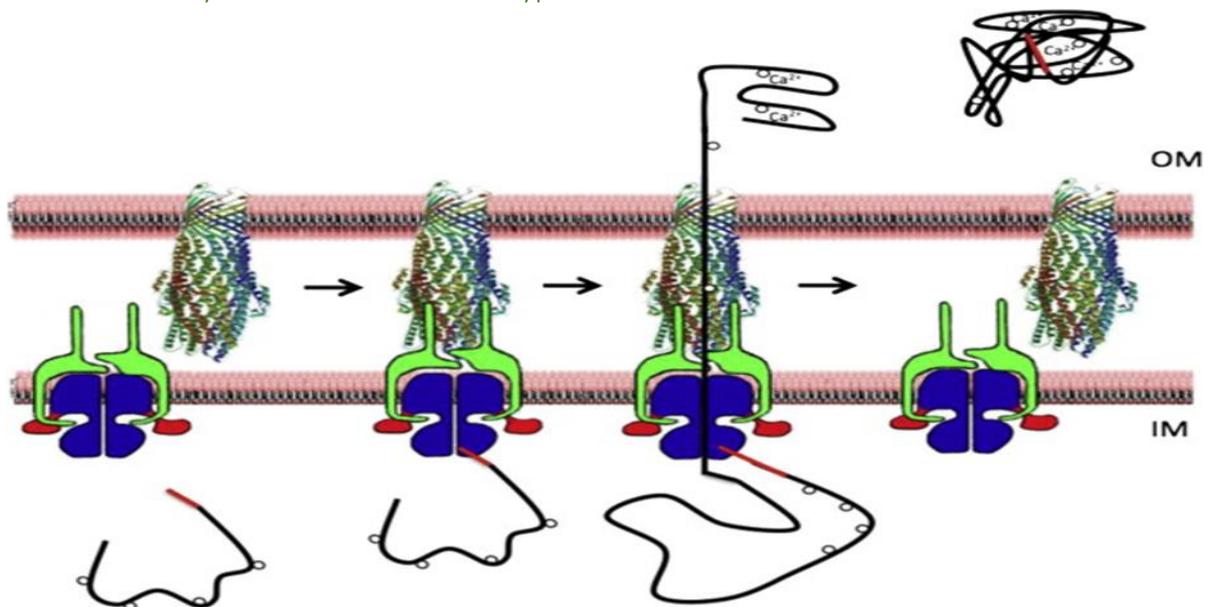


FIGURE 1 : Adapté de [239] [26]. Schéma du SST1. La membrane externe est appelée OM et la membrane interne IM. Les ABC transporteurs sont présentés en bleu et les domaines CLD en rouge. Le composant MFP est en vert et le composant OMF est représenté par la structure de TolC (PDB : 1EK9) [24]. Le substrat du SST1 est présenté comme une protéine dépliée par le ruban noir ou le motif de reconnaissance pour le SST1 est en rouge et les motifs RTX en blanc.

Ce système de sécrétion, constitué de trois composants, est relativement simple. Le premier composant, du côté cytoplasmique, est un transporteur ABC (ATP-binding cassette) (présent en bleu sur la Figure 1). Ce transporteur est relié à une protéine adaptatrice (MFP pour membrane fusion protein) (vert dans la Figure 1). Le composant MFP sert de pont périplasmique entre la partie transporteur ABC et le dernier composant OMF (appelé OMF pour Outer Membrane Factor ou OMP pour Outer Membrane Protein), qui est enchâssé dans la membrane externe (représenté par la structure de TolC dans Figure 1) [21][23][24][25]. La partie transporteur ABC est capable de reconnaître un substrat protéique et fournit l'énergie au système en hydrolysant l'ATP. La partie OMF forme un pore dans la membrane externe

alors que la partie MFP est responsable du lien entre les deux molécules et de la formation du canal par lequel transiteront les molécules. En définitive, l'ensemble est capable de faire passer, en hydrolysant de l'ATP, une protéine dépliée du cytoplasme bactérien directement à l'extérieur de la cellule [23], le tout en une seule étape à travers les deux membranes bactériennes et le périplasma [22]. La fixation du substrat sur le transporteur ABC va permettre le recrutement de la partie OMF par MFP [25].

Plusieurs copies du système de sécrétion de type 1 (SST1) peuvent être présentes en même temps chez la même bactérie et chacune exporte ses propres effecteurs. Cette spécificité est dépendante du transporteur ABC dont différentes classes ont pu être définies en fonction de leurs séquences N-terminales [26]. Une première classe contient le transporteur avec domaine C39-like peptidase (CLD), sans activité protéolytique, ils permettent le passage de substrat sans clivage [27]. Les effecteurs sécrétés par cette classe contiennent des motifs RTX (Repeats in Toxins) reconnus par leur transporteur. Ensuite, la deuxième classe de transporteur ne contient pas de domaine additionnel en C-terminal et est capable de sécréter des toxines avec et sans motif RTX [28].

Les rôles des protéines effectrices sécrétées varient entre protéases, lipases, adhésines, des protéines se liant à l'hème telles que HasA de *Serratia marcescens* [23] ou encore portant des toxines causant la destruction de membranes eucaryotes telles que HlyA de *Escherichia coli* uropathogénique [21][29][30].

I.3.2. Le système de sécrétion de type II :

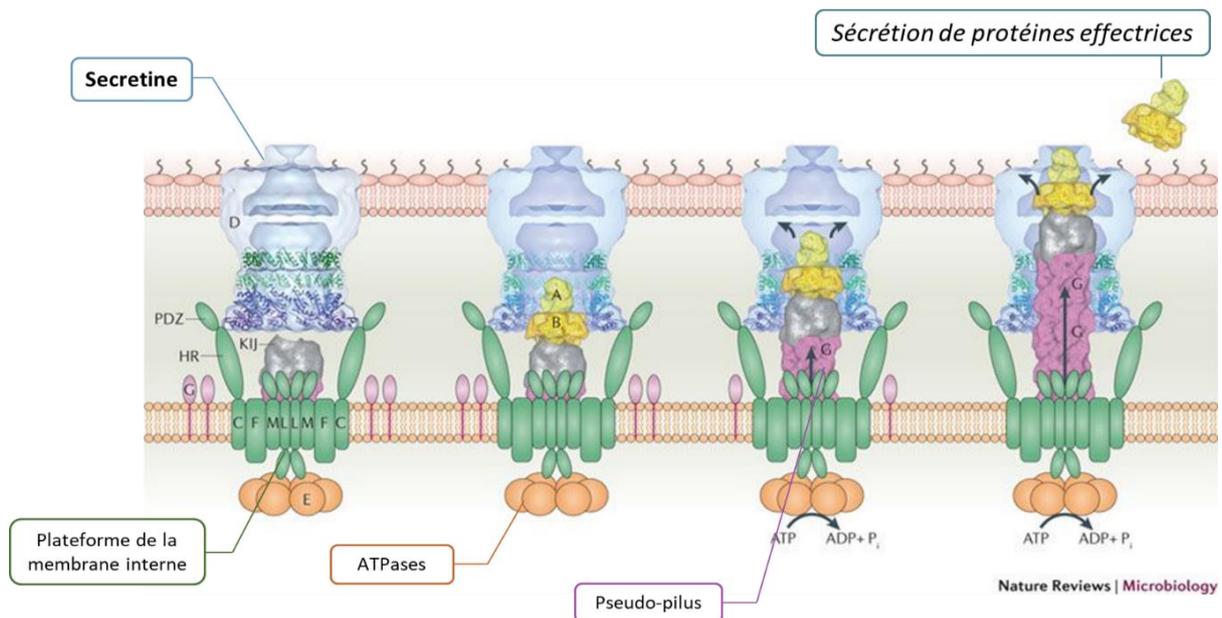


FIGURE 2 : Schéma du fonctionnement du SST2 (adapté de [31]). Dans un premier temps les protéines GspG, GspI, GspJ, GspK et GspF sont recrutées pour former un pseudo pilus. Ensuite le pseudo pilus est assemblé dans le complexe GspC, GspL et GspM qui forme la plateforme basale intermembranaire du système. Ce complexe est relié à travers le périplasma à GspD qui forme un pore dans la membrane externe. L'hydrolyse d'ATP par GspE induit la croissance du pseudo-pilus qui va pousser les protéines sécrétées du périplasma vers le milieu extracellulaire à travers GspD.

Le système de sécrétion de type II (SST2) est très répandu et permet la sécrétion de protéines aux rôles divers, allant de l'adaptation au milieu à la virulence [32]. Ce système est complexe et requiert un assemblage de 15 protéines différentes appelées Gsp pour General secretion pathway [21][22][33].

L'assemblage final peut être divisé en trois parties. On distingue alors premièrement la plateforme basale, localisée dans la membrane interne. Cette plateforme formée par les protéines GspC, E, F, L et M, sert de base au système et permet l'hydrolyse de l'ATP pour fournir de l'énergie nécessaire à la sécrétion [34][35]. Le deuxième composant est un large canal formé par un assemblage multimérique de GspD aussi appelé « sécrétine » [36]. Ce canal est enchâssé dans la membrane externe et traverse le périplasma jusqu'aux excroissances périplasmique de la plateforme de la membrane interne [37]. Le dernier composant est un pseudo-pilus constitué par les protéines GspG, I et K, dérivées des protéines du pili de type IV [38][39].

L'ensemble de la machinerie permet le passage de protéines du cytoplasme au milieu extérieur en 2 étapes [40]. La première étape consiste à faire passer les protéines sécrétées du cytoplasme au périplasma, ceci est assuré par les systèmes de sécrétion Sec et Tat localisés à la membrane interne. Ensuite le SST2 peut sécréter ces protéines du périplasma vers le

milieu extérieur grâce à la croissance du pseudo-pilus qui agirait comme un piston [41][42]. Il est à noter que les protéines sont sécrétées repliées et doivent donc adopter leurs structures tertiaires une fois dans le périplasm. Parmi les toxines utilisant ce système de sécrétion on retrouve par exemple chez PAO1, LasB une élastase [43], LipA et LipC étant des lipases [44] ou encore ToxA, toxine intracellulaire qui inhibe la synthèse protéique dans la cellule hôte [45] [22].

I.3.3. Le système de sécrétion de type III :

Le système de sécrétion de type III (SST3) équipe de nombreux pathogènes et permet l'injection de toxines appelées alors effecteurs directement dans le cytoplasme des cellules eucaryotes cibles [46]. Il est aussi appelé injectisome notamment à cause de son organisation ressemblante à une « seringue et aiguille » [47]. Cette organisation lui permet de faire passer les effecteurs à travers trois membranes, les deux membranes bactériennes et la membrane eucaryote, le tout en une seule étape [22] [21].

Le SST3 est constitué d'environ 20 protéines ce qui rend sa machinerie complexe [47]. Il partage des similarités avec le flagelle bactérien [48].

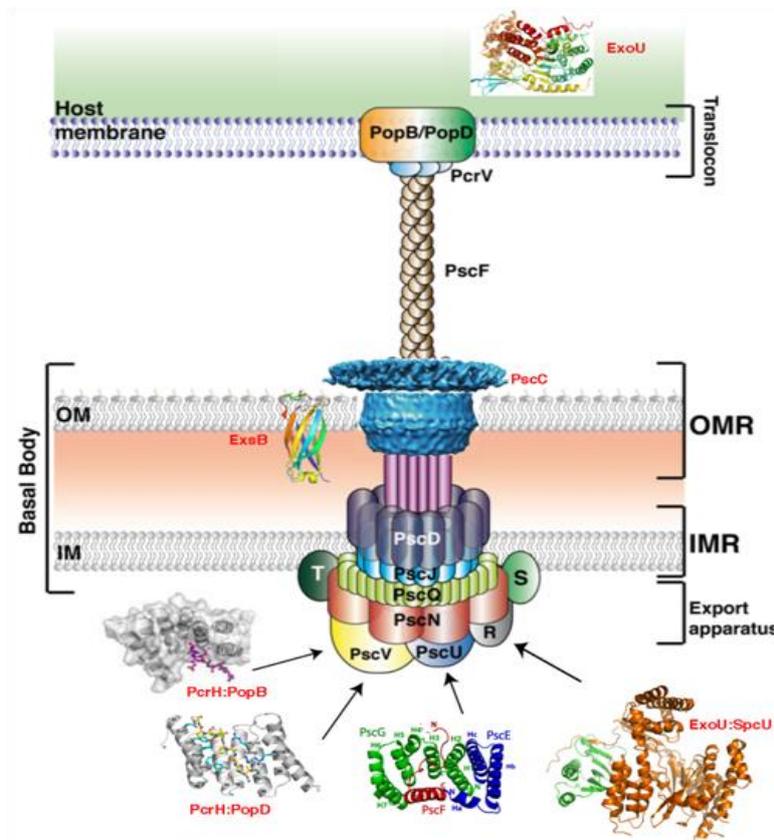


FIGURE 3 : (Figure de [49]) Modélisation du système de sécrétion de type III de *P. aeruginosa*. L'organisation de la plateforme basale en plusieurs anneaux est visible. Les protéines impliquées dans le fonctionnement du SST3 chez *P. aeruginosa* sont indiquées. Les protéines dont les structures ont été résolues dans l'équipe PatBac sont présentés en ruban ou surface.

De la même manière que pour les autres systèmes de sécrétion, le SST3 peut être divisé en trois composants : un complexe basal, une aiguille et un translocon. Le complexe basal est enchâssé dans la membrane interne et externe et occupe tout l'espace périplasmique [50]. Chez PAO1, il est formé des nombreuses protéines appelées Psc pour *Pseudomonas secretion components* [22]. On distingue différents sous-assemblages du complexe basal. Premièrement, les complexes d'export mineur et majeur composés respectivement par les protéines PscR, PscS et PscT ainsi que PscU et PscV disposées dans la membrane interne [51]. Ils interagissent dans le périplasme avec PscJ qui forme un premier anneau. Ce premier anneau interagit avec PscD qui forme un deuxième anneau périplasmique et PscC [52], une sécrétine qui va former de la même manière que pour le SST2 un canal enchâssé dans la membrane externe grâce à ExsB [53], sa pilotine[54].

Du côté cytoplasmique, le premier anneau va interagir avec PscO, PscK, PscQ et PscL pour former une structure responsable du passage des protéines à travers le système notamment grâce à PscN qui fournit l'énergie en hydrolysant l'ATP [55]. Après la formation de cet ensemble d'anneau, la protéine PscI s'insère dans le canal et forme la base sur laquelle l'aiguille va s'étendre[56][57].

Ensuite, le deuxième composant du SST3 est l'aiguille, qui s'assemble depuis le complexe basal, et croît dans le milieu extérieur. Chez PAO1, elle est formée par la polymérisation de la protéine PscF [58]. Les chaperonnes PscE et PscG empêchent PscF de former une fibre spontanément dans le cytoplasme [59]. La taille de l'aiguille est contrôlée par PscP. L'aiguille est creuse ce qui permet le passage de protéines dépliées depuis le cytoplasme bactérien [60].

Les premières protéines à passer dans le conduit ainsi formé sont les protéines du translocon. Dans l'ordre, PcrV passe la première et vient stabiliser la fibre en se déposant à son extrémité extracellulaire. Viennent ensuite les protéines PopB et PopD qui reposeront sur PcrV et formeront un pore dans la membrane eucaryote [61].

Une fois l'ensemble formé, les effecteurs peuvent traverser depuis le cytoplasme bactérien vers le cytoplasme eucaryote [62]. Ces effecteurs sont inactivés dans le cytoplasme bactérien car ils restent liés à leurs chaperonnes [63]. Le complexe effecteur/chaperonnes se dissociera avant l'export à travers l'aiguille. Les effecteurs traversent alors l'aiguille et arrivent dans le cytoplasme de la cellule eucaryote où ils seront fonctionnels [64][65].

La toxicité est assurée en deux étapes. La première est due à la capacité des effecteurs, un fois transloqués dans le cytoplasme cellulaire, à détruire des fonctions clés pour la survie cellulaire. On retrouve parmi ces effecteurs des protéines comme ExoU, une phospholipase responsable d'une toxicité accrue chez les souches l'exprimant [63]. Dans un deuxième temps,

après rétraction de l'aiguille, le pore formé par le SST3 dans la membrane eucaryote reste présent induisant alors une aggravation des dégâts subit par la cellule eucaryote [66].

I.3.4. Le système de sécrétion de type VI :

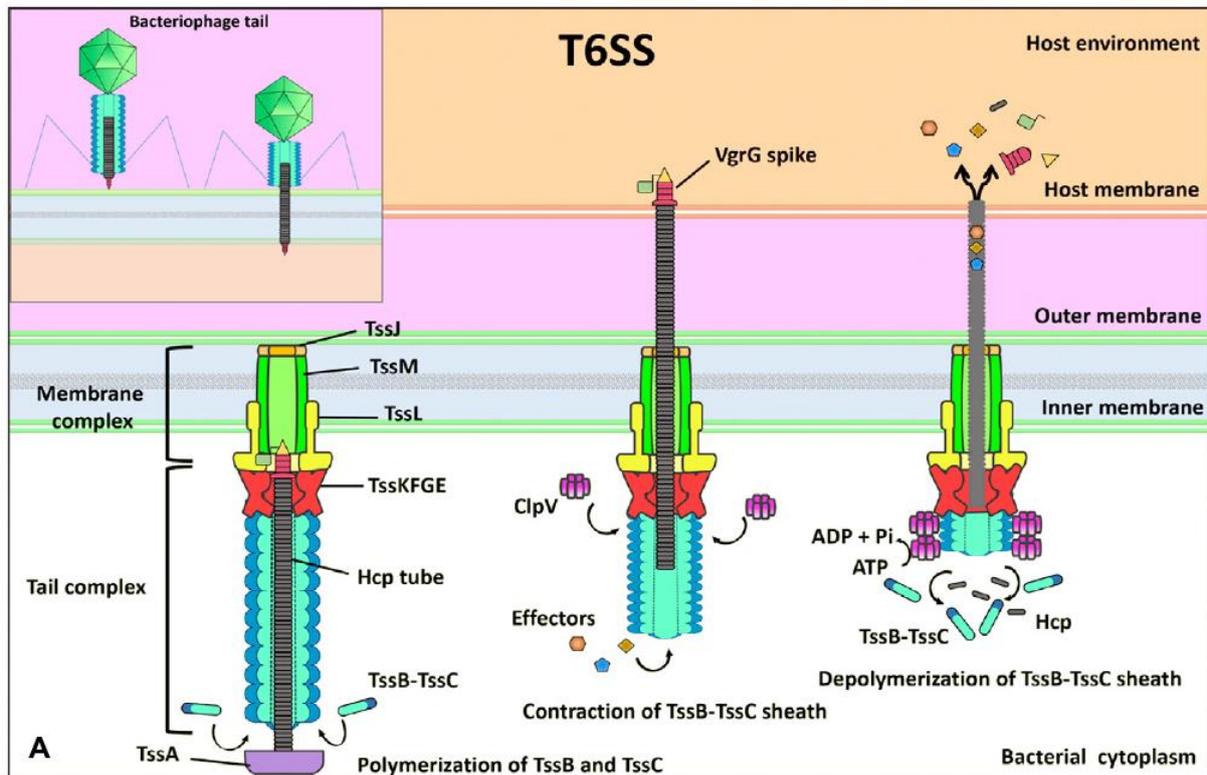


FIGURE 4 : Adapté de [67]. Le SST6 est composé d'une base membranaire, d'une base cytoplasmique et d'une aiguille. L'activation du système induit la contraction d'une gaine qui éjecte alors l'aiguille creuse hors de la bactérie, dans le cytoplasme de la cellule cible. Ce cytoplasme est alors accessible aux effecteurs du SST6. La dépolymérisation de la gaine et de l'aiguille restante permet de réassembler le SST6 pour l'utiliser à nouveau.

Le mécanisme « cœur » du système de sécrétion de type VI (SST6) est formé par 13 protéines conservées [68]. Ces protéines sont capables à elles seules de former un SST6 complet et fonctionnel. Parmi ces protéines, on retrouve les protéines TssJ, TssL et TssM (pour Type six secretion) dans les membranes bactériennes où elles seront responsables de la formation de la structure basale du SST6 [69]. Sur cette base localisée à la membrane, viendront s'associer les protéines TssK, TssF, TssG et TssE qui formeront la base cytoplasmique du SST6 [67][70]. Sur ces bases viendront s'assembler l'aiguille et la gaine contractile caractéristique du SST6. La protéine VgrG formera la pointe de l'aiguille et son interaction avec les structures formant la base entrainera la polymérisation de la protéine Hcp à sa suite ce qui formera l'aiguille creuse [71][72][73]. Cette aiguille est entourée d'une gaine contractile formée par les protéines TssB et TssC [74]. La contraction de cette gaine entraine l'éjection de l'aiguille hors du cytoplasme bactérien. Une fois contractée, la gaine formée par les protéines

TssB et TssC est désassemblée par ClpV, une chaperonne hexamérique, qui va consommer de l'ATP pour déplier son substrat [74]. Le dernier composant des protéines du cœur est TssA, qui interagit avec l'aiguille et la gaine sur leurs extrémités cytoplasmiques et serait impliqué dans la croissance de ces deux composants [75]. Les protéines constituant la partie cytoplasmique du cœur de SST6 sont très proches en termes de structure et de séquence de celles de la queue du bactériophage T4, ce qui laisse suspecter une origine commune [72].

L'aiguille est creuse et chargée en toxines qui seront délivrées directement dans le cytoplasme et le périplasme de la cellule-cible [76]. Ces toxines, ou effecteurs, seront en partie à l'origine de la toxicité de ce système de sécrétion [77].

Plusieurs copies de ces gènes cœurs du mécanisme sont identifiables chez *P. aeruginosa*. On en compte 3 appelées HSI-I, HSI-II et HSI-III (pour Hcp-secretion island) organisés dans différents locus du génome [78]. Chaque copie de ce SST6 comporte les gènes codant pour les protéines cœur du système mais aussi des gènes codant pour des protéines accessoires différentes en fonction de la copie [79].

Ces protéines nommées Tag (pour Type six associated genes) sont des composants accessoires du SST6. Parmi ces composants on retrouve trois différentes classes de molécules [69] : (i) une première classe qui contient les toxines délivrées par le SST6 comme Tse2 (Type six secretion exported) ainsi que les inhibiteurs de ces toxines [77] ; (ii) On retrouve aussi des protéines servant à l'assemblage correct du SST6 tel que SciZ [80] ; et , (iii) certaines protéines accessoires qui servent aussi à réguler l'activation du SST6, telle que TagR [81][82].

L'expression de chacune des copies du SST6 est régulée différemment en fonction de l'environnement de *P. aeruginosa* [83]. Les copies HSI-II et HSI-III serait impliquées dans l'infection des cellules eucaryotes par *P. aeruginosa* en induisant l'internalisation de la bactérie dans les cellules épithéliales [84]. A l'inverse, le système HSI-I serait impliqué dans la compétition bactérienne. Il comporte majoritairement des effecteurs bactériolytiques et est capable de cibler des bactéries adverses [85]. La perte de son activité entraîne une diminution de la survie des bactéries touchées, au profit de la survie des bactéries toujours capable de l'utiliser [82].

Chez *P. aeruginosa*, le SST6 HSI-I est dit défensif car il est impliqué dans l'établissement d'une riposte face à une bactérie attaquante [86]. Cette riposte est régulée par 4 protéines Tag appelées TagQ, TagR, TagS et TagT [81][82].

TagS est une protéine de 42 kDa localisée dans la membrane interne bactérienne et est constituée de 4 hélices transmembranaires et d'un long segment périplasmique. De son côté cytoplasmique elle est associée à TagT, une protéine de 26 kDa ayant une activité ATPase. Cet hétérodimère forme un ABC transporteur [82].

On retrouve ensuite les protéines TagQ et TagR. TagQ est une petite protéine contenant une lipo-box [87] qui l'ancre à la membrane externe (coté périplasmique). TagR est une protéine périplasmique qui est capable d'interagir avec TagQ. En effet, d'après [82] la localisation cellulaire de TagR est dépendante de la localisation de TagQ. TagR serait localisée à la membrane externe lorsque TagQ contient sa lipo-box. Cependant, si la lipo-box de TagQ est supprimée, (et que l'on supprime donc son ancrage à la membrane externe), TagR se retrouve périplasmique [82].

D'après le modèle établi, ces deux protéines seraient capables de détecter un signal indiquant l'agression au SST6 d'une autre bactérie [82]. La nature de ce signal est inconnue mais lorsqu'il est perçu, ces protéines accessoires seraient capables d'activer PpkA [81]. Ceci induit une cascade de phosphorylation cytoplasmique qui entraîne la phosphorylation de TssL. Activant alors le recrutement de TssK à la base de la plateforme membranaire du SST6 et qui induit la polymérisation de l'aiguille et de la gaine contractile [88]. Il devient alors possible pour la bactérie agressée de répliquer contre son agresseur.

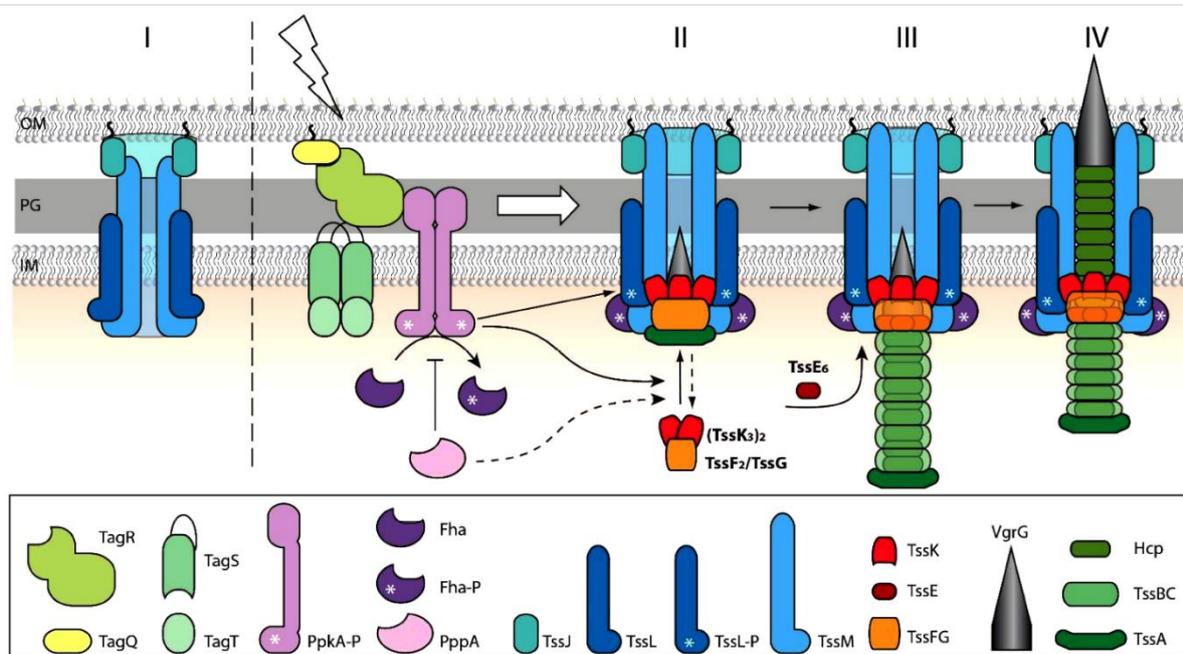


FIGURE 5 : Schéma de fonctionnement et d'assemblage du H1-SST6 [88]. Les protéines TagR tagQ, TagS et TagT sont capables de détecter un signal provenant d'une bactérie attaquante (représenté par l'éclair dans la figure) et vont activer une cascade de phosphorylation intracellulaire représentée par les molécules PpkA, PppA et Fha. Cette activation va entraîner à son tour l'assemblage et l'activation du SST6 qui va répliquer face à l'agresseur.

I.3.5. Le système de sécrétion de type V :

Le système de sécrétion de type V (SST5) est impliqué dans la sécrétion de facteurs de virulences et d'adhésines [21]. Les protéines de ce système nécessitent le système SEC pour être exportées dans le périplasma [22]. Elles nécessitent aussi des chaperonnes pour traverser le périplasma mais elles seront alors capables de s'exporter seules à travers la membrane externe [89]. On distingue 6 types de SST5 qui sont annotés de a à f dont les fonctionnements différents seront détaillés ci-dessous. De manière générale, on dissocie les protéines de ce système en deux parties, une partie translocon et une partie « passager ». Le domaine translocon est un tonneau β qui permet le passage de la partie « passager » à l'extérieur de la bactérie [90]. L'interaction entre ces deux domaines peut être conservée ou perdue ce qui entraîne, respectivement, la conservation du domaine « passager » à la membrane externe ou sa sécrétion [90]. Ces deux régions sont encodées dans le même polypeptide dans la majorité des SST5, à l'exception du SST5b ou les deux sont séparées en deux polypeptides distincts (comme c'est le cas pour ExlA et ExlB).

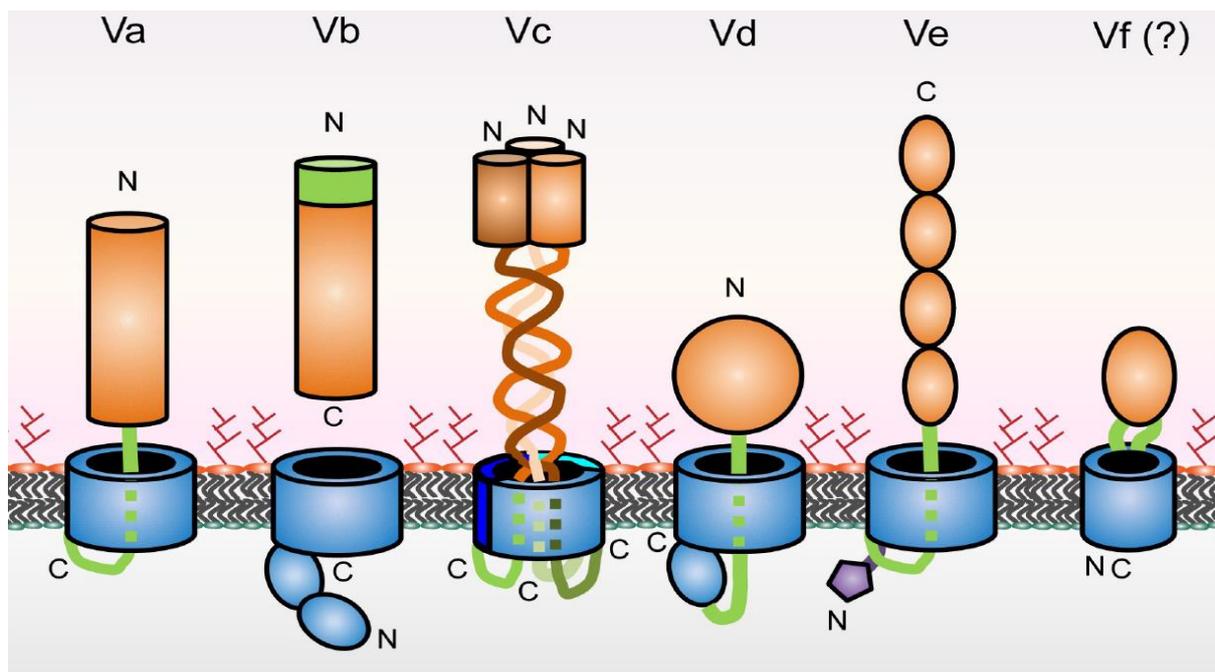


FIGURE 6 : (Figure de [75]) Schéma représentant les différents sous-types de SST5. Les sous types Va, Vb, Vc, Vd, Ve et Vf seront définis en détails ci-dessous. La membrane externe est représentée en gris. Les domaines translocateurs sont présentés en bleu et les domaines « passager » en orange. Les domaines TPS et les régions liantes sont représentés en vert. L'extension périplasmique du SST5e est indiquée en violet. Les extrémités N-terminale et C-terminale sont notées N et C respectivement. Vf est noté avec un point d'interrogation car sa catégorisation n'est pas encore définie.

I.3.5.1. Les différents systèmes de sécrétion de type V :

Entre les différents sous types, les séquences des protéines du SST5 divergent beaucoup. Cependant, la présence des domaines « passagers » et translocateurs restent présents et sont similaires entre eux [90], ce qui permet de reconnaître et ensuite classer les protéines dans les différents sous-types en fonction de la présence et de la disposition de domaines spécifiques. Le fonctionnement des différents type d'auto-transporteurs va donc être expliqué ci-dessous [90] [91] [92].

I.3.5.1.1. LE SST5A :

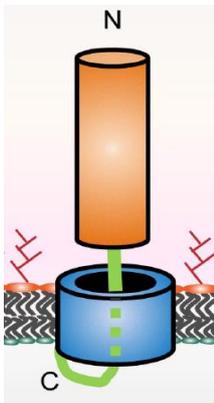


FIGURE 7 : SST5A

Le type SST5a regroupe les auto-transporteurs communément appelés « auto-transporteurs classiques » [93]. Ce sont des protéines qui sont composées d'un tonneau β à 12 feuillettes (en bleu dans la figure) qui sert d'ancre C-terminale dans la membrane externe bactérienne et qui permet le passage du domaine « passager » (orange dans la figure) [91]. Le domaine « passager » s'étend dans le milieu extérieur et est en général replié en hélices- β (comme par exemple la pertactine de *B. pertussis* PDB : 1DAB [94]) mais peut être replié en hélices- α comme pour EstA de *Pseudoalteromonas* sp. 643A [95]. L'ensemble reste associé grâce à une région liante (en vert sur la figure) [96]. Les domaines passagers sont porteurs de l'activité spécifique de la protéine et sont donc majoritairement des facteurs de virulence [97].

I.3.5.1.2. LE SST5B :

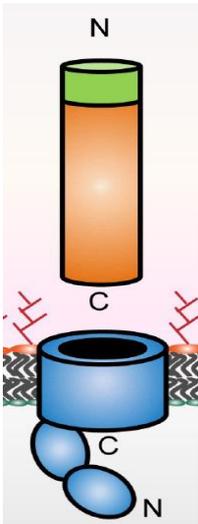


FIGURE 8 : SST5B

A la différence du SST5a, le SST5b est constitué de deux polypeptides bien distincts encodés dans un seul opéron ce qui définit son nom de système de sécrétion à deux partenaires (Ou TPSS pour Two-Partner Secretion System) [98]. Parmi ces deux protéines, le partenaire B ou TpsB est la protéine au rôle translocateur et la protéine A ou TpsA est la « passagère » (en orange dans la figure). Le TpsB est un tonneau β comportant aussi deux domaines POTRA (POlypeptide TRansport Associated) (en bleu sur la figure). Sur TpsA on peut identifier le domaine TPS caractéristique (en vert dans la figure).[99] La reconnaissance du domaine TPS par le domaine POTRA induira le début de la translocation de TpsA. [100] La dissociation du polypeptide entre les deux fonctions permet à TpsA de se détacher de TpsB sans nécessité de protéolyse ce qui peut mener à la sécrétion du partenaire A. Cette sécrétion est observée dans le cas de ShIA de *Serratia marcescens* [101]. Dans d'autres cas, le TpsA peut rester accroché à TpsB comme par exemple pour l'adhésine HMW1 de *Haemophilus influenzae* (ou cet ancrage se produit après maturation et formation d'un pont disulfure entre TpsA et TpsB [102]).

I.3.5.1.3. LE SST5C :

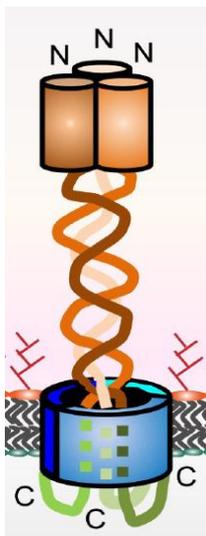


FIGURE 9 : SST5C

Le SST5c est composé par la famille des auto-transporteurs trimériques. Leur fonctionnement est assez similaire à ceux de la famille des SST5a avec l'expression d'un polypeptide contenant les fonctions de « passager » et de translocateur [103]. La différence vient du fait que leur domaine translocateur est complet et fonctionnel uniquement lorsqu'un homo-trimère est assemblé pour former le tonneau β . En effet chaque protéine ne comporte qu'une partie du tonneau β qui est alors reconstitué par l'assemblage de trois auto-transporteurs. Les trois domaines « passagers » du trimère ainsi formé passent par le même domaine translocateur formé et dépassent ensemble de la membrane dans le milieu extracellulaire [103]. Les auto-transporteurs sont en général des adhésines dont la présence de trois récepteurs rapprochés dans l'espace contribue à améliorer l'avidité envers leurs ligands [104]. Les protéines de cette famille sont donc appelées TAA pour Trimeric Auto-transporter Adhesin (un exemple connu est la protéine YadA de *Yersinia enterocolitica* [105]).

I.3.5.1.4. LE SST5D :

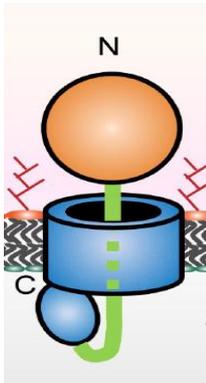


FIGURE 10 : SST5D

Dans SST5d on retrouve des protéines comme PlpD de *P. aeruginosa* [106], [107]. Ce système est un hybride entre le SST5 a et b. En effet, le domaine translocateur contient aussi un domaine POTRA comme chez les TpsB du SST5b à l'exception du fait que chez le SST5d un seul domaine est présent (contre deux chez le SST5b). Cependant, de la même manière que pour les protéines du SST5a, chez le SST5d un seul polypeptide porte les deux fonctions de translocateur et de « passager ». Les domaines « passagers » de ce sous type de système de sécrétion semblent adopter en général un repliement α/β -hydrolase avec une activité lipase ce qui les différencie des SST5a et SST5b qui sont majoritairement observés repliés en hélices β [108].

I.3.5.1.5. LE SST5E :

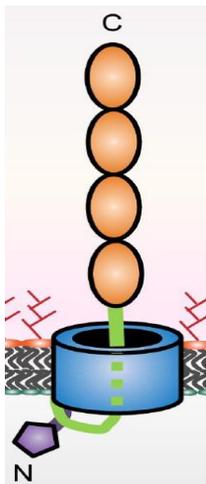


FIGURE 11 : SST5E

L'un des derniers SST5 découverts est le SST5e qui est similaire au SST5a [109]. Il dispose lui aussi d'un domaine translocateur replié en tonneau β et d'un domaine « passager » monomérique qui reste accroché à son partenaire. La différence vient du fait que la disposition des extrémités N-terminale et C-terminale sont inversées entre les deux sous-types [110]. L'extrémité N-terminale chez le SST5a est située dans le cytoplasme alors qu'elle est dans le milieu extracellulaire pour le SST5e et inversement pour l'extrémité C-terminale. Cette particularité a fait en sorte que les protéines appartenant au sous type e soit appelées auto-transporteurs inversé [110]. Ils disposent d'une dernière particularité résidant dans le fait qu'ils déploient un domaine supplémentaire du côté périplasmique, permettant l'interaction avec le peptidoglycane ou aidant à la dimérisation [111]. Des protéines de ce type de SST5 sont les intimines de *E. coli* et les invasines de *Yersinia* spp. entéro-pathogéniques [112].

I.3.5.1.6. LE SST5F :

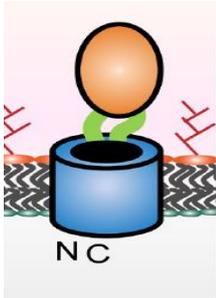


FIGURE 12 : SST5F

Le dernier sous type nommé SST5f a été découvert assez récemment (en 2018) avec la protéine BabA de *Helicobacter pylori* [113]. Chez cette protéine, le domaine « passager » est situé dans une boucle extracellulaire divisant la séquence du domaine translocateur en deux parties N-terminale et C-terminale. Cependant, la topologie des deux domaines est très différente des autres sous types. Si l'on associe cela au fait que la découverte de ce sous-type est récente on peut comprendre que l'ajout du sous-type **f** à la famille des SST5 soit controversé [91].

Partie 1 :

Exolysine A et Exolysine B

I.1. Introduction au contexte de découverte de l'Exolysine

I.1.1. Découverte de la souche CLJ1 et de l'Exolysine

Parmi tous les différents types de systèmes de sécrétion énoncés ici, les infections par *P. aeruginosa* sont généralement médiées par le SST3 chez des souches répandues et bien connues comme PAO1. La toxicité véhiculée par ces bactéries est directement corrélée à la présence du SST3 et à l'expression des toxines et effecteurs associés [8]. (Voir Figure 13)

Comme il a pu être montré précédemment, les infections à *P. aeruginosa* sont donc extrêmement problématiques et engagent la survie du patient infecté. Or il a pu être observé au CHU de Grenoble, il y a quelques années, le décès d'un patient suite à une infection pulmonaire à *P. aeruginosa*. Cette infection a entraîné une hémorragie pulmonaire suivie d'une septicémie conduisant à la mort du patient [8].

Cette infection mortelle était due à une nouvelle souche de *P. aeruginosa* appelée CLJ1 qui est capable, lorsqu'elle est utilisée pour infecter des modèles murins, d'induire une pneumonie aigüe entraînant une hémorragie pulmonaire suivie d'une septicémie et d'une mort rapide des sujets [8] [114]. Ces effets sont clairement corrélés avec ce qui a été observé chez le patient duquel la souche est originaire. Or, CLJ1 est relié à PA7 qui sont donc des souches qui n'expriment pas le système de sécrétion de type 3 [8].

En effet, il est possible de voir sur la Figure 13 en comparant PAO1 au souches PAO1 Δ PscD (PAO1 Δ PscD étant une souche PAO1 dont le SST3 a été inactivé) et PA7 (PA7 étant une souche ne comportant pas le SST3) que le taux de survie des souris est extrêmement réduit lorsque les bactéries infectieuses possèdent le SST3. Or, il est surprenant de voir que CLJ1 (souche ultratoxique retrouvée dans les poumons du patient) échappe à cette règle. Cette souche est plus toxique que les souches exprimant le SST3, sans pour autant être capable de l'exprimer.

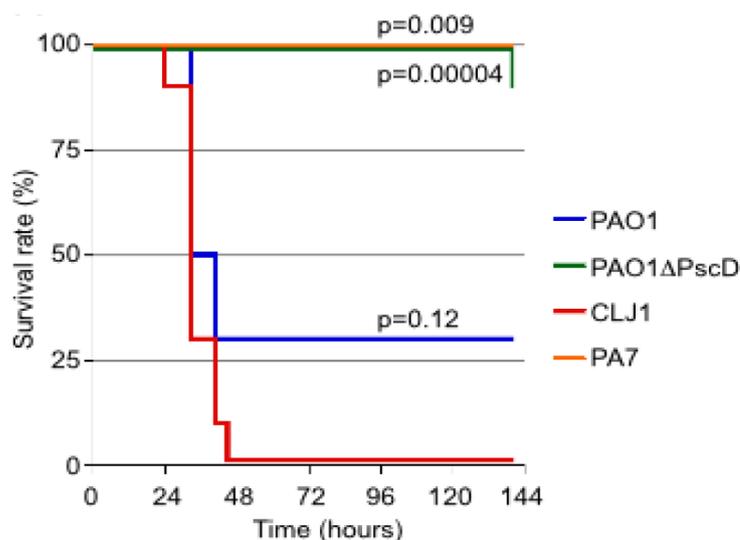


FIGURE 13 : Adapté de [8]. Taux de survie de souris après infection par différentes souches de *P. aeruginosa*. La souche PAO1 est la souche virulente couramment étudiée. PAO1ΔPscD est une souche PAO1 dont le système de sécrétion de type III a été inactivé. PA7 est une souche ne comportant pas le système de sécrétion de type III et CLJ1 est la souche ultratoxique retrouvée dans les poumons du patient. Il est surprenant de voir que CLJ1 est plus toxique que les souches exprimant le SST3, sans pour autant le posséder.

La virulence de CLJ1 est donc médiée par un autre composant. En analysant les surnageants de culture de ces souches pour identifier la sécrétion de molécules uniques à ces bactéries, une protéine homologue à l'hémolysine de *Serratia marcescens* a été découverte [8] [115]. Cette nouvelle protéine a été nommée Exolysine A (ExlA) et de manière similaire à l'hémolysine, elle semblait être transportée par un partenaire formant ainsi un TPS [8]. La séquence de ce partenaire codant pour un partenaire TPS a été trouvée en amont de la séquence d'ExlA et il a alors été nommé Exolysine B (ExlB).

Il a ensuite été montré que la sécrétion d'ExlA dépendait bien de l'expression d'ExlB confirmant le modèle de sécrétion avec TPS. De plus, l'expression de l'opéron *exlBA* dans une souche déficiente en SST3 confère à cette même souche un phénotype toxique, confirmant l'impact des protéines ExlA et ExlB sur la toxicité bactérienne [8].

1.1.2. Comportement d'ExlA *in vivo* :

Lorsque infectées par des bactéries étant capables de sécréter ExlA, les cultures de cellules épithéliales meurent après rupture de leur membrane plasmique. Au microscope confocal, il est possible de voir des blebs apparaître après 120 minutes d'exposition des cellules aux bactéries infectieuses. Ensuite les cellules gonflent et explosent. Ce phénomène est dû à l'entrée de calcium dans le cytoplasme cellulaire, ce qui induit nécrose et mort de la cellule [115].

L'entrée de calcium induit aussi l'activation d'ADAM10, une métalloprotéase extracellulaire qui coupe les cadhérines E et VE. Ces cadhérines sont impliquées dans l'adhésion des cellules épithéliales (E-cadhérines) et de l'épithélium vasculaire (VE)[115].

L'exposition de macrophages à ExlA entraîne aussi une activation des voies inflammatoires ce qui entraîne la mort de la cellule par pyroptose [116].

Des souches bactériennes exprimant différentes constructions d'ExlA ont été utilisées pour vérifier quelle partie de la protéine était responsable de la toxicité. Il en a été déduit que le domaine C-terminal d'ExlA est responsable de la formation de pores dans les liposomes et les cellules eucaryotes. De la même façon, la protéine complète a induit la mort de cellules en 60 minutes alors que la forme tronquée du domaine C-terminal n'a pas eu d'influence sur la survie cellulaire (Figure 14) [117]. Les quantités de protéines sécrétées étaient pourtant similaires.

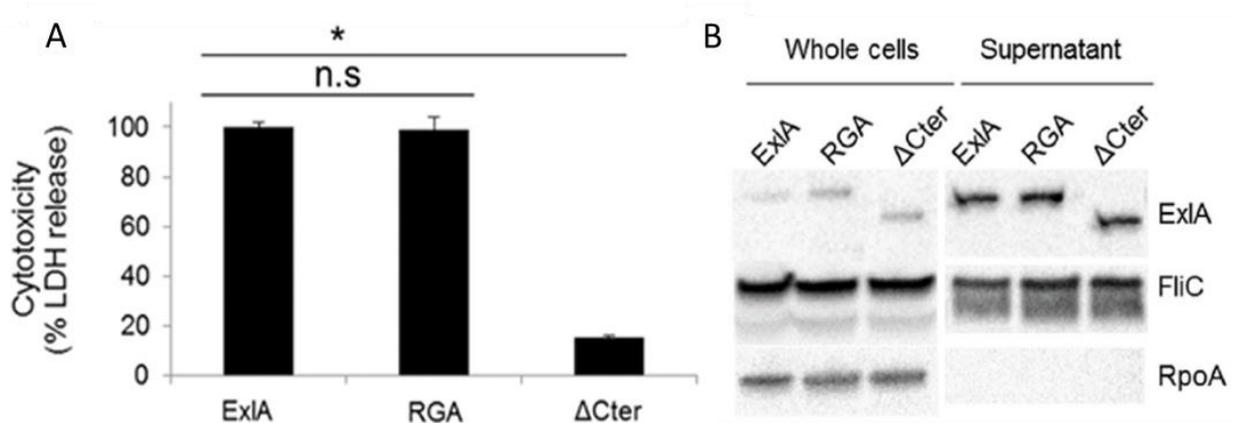


Figure 14 : Adapté de [117] **A.** Test de cytotoxicité sur cellules A549 infectées par *P. aeruginosa* PAO1 exprimant ExlB et des mutants d'ExlA (ExlA : protéine native, RGA : protéine ExlA mutante dont les domaines RGD ont été mutés pour des domaines RGA, ΔCter : protéine ExlA tronquée de son domaine C-terminal.) La cytotoxicité est mesurée par l'activité de la lactate déshydrogénase. **B.** Western-Blot indiquant la sécrétion de différentes constructions d'ExlA. Pour vérifier la capacité des différentes constructions d'ExlA à être sécrétées, des fractions des cellules entières et du surnageant de cultures ont été comparées. ExlA est la protéine entière, ΔCter est la protéine ExlA avec le domaine C-terminal tronqué. RGA est une construction d'ExlA dont les motifs RGD liant les cadhérines ont été mutés en RGA. FliC est une protéine du pilus bactérien et est présente dans et hors les cellules, elle sert ici de témoin de charge. RpoA est une protéine intracellulaire, elle sert de contrôle et est bien absente dans les fractions du surnageant cellulaires. Il est possible de voir que les différentes constructions sont toutes sécrétées en même quantité.

Il est à noter la présence de motifs RGD constitués des acides aminés arginine-glycine-acide aspartique. Ces motifs sont connus pour interagir avec des intégrines eucaryotes, mais leur mutation pour des motif RGA n'affecte pas la toxicité d'ExlA (Figure 14) [117].

I.2. Analyses des informations apportées par les séquences de ExlB et ExlA

ExlA et ExlB (UNIPROT code : ExlB= A6VAA0_PSEA7 ; ExlA= AVAA1_PSEA7) peuvent être classifiées comme faisant partie du SST5b [8].

I.2.1. Concernant ExlB :

La protéine dont la séquence donne le plus d'informations structurales est ExlB. Cette protéine a une forte homologie de séquence avec la famille des transporteurs ShlB (36% d'identité de séquence, 51% de similarité) et FhaC (23% d'identité de séquence, 46% de similarité) appartenant au SST5b. Comme toutes les protéines de cette famille, ExlB comporte deux domaines POTRA périplasmiques suivis par un domaine en tonneau β qui réside dans la membrane externe de la bactérie (Figure 15).

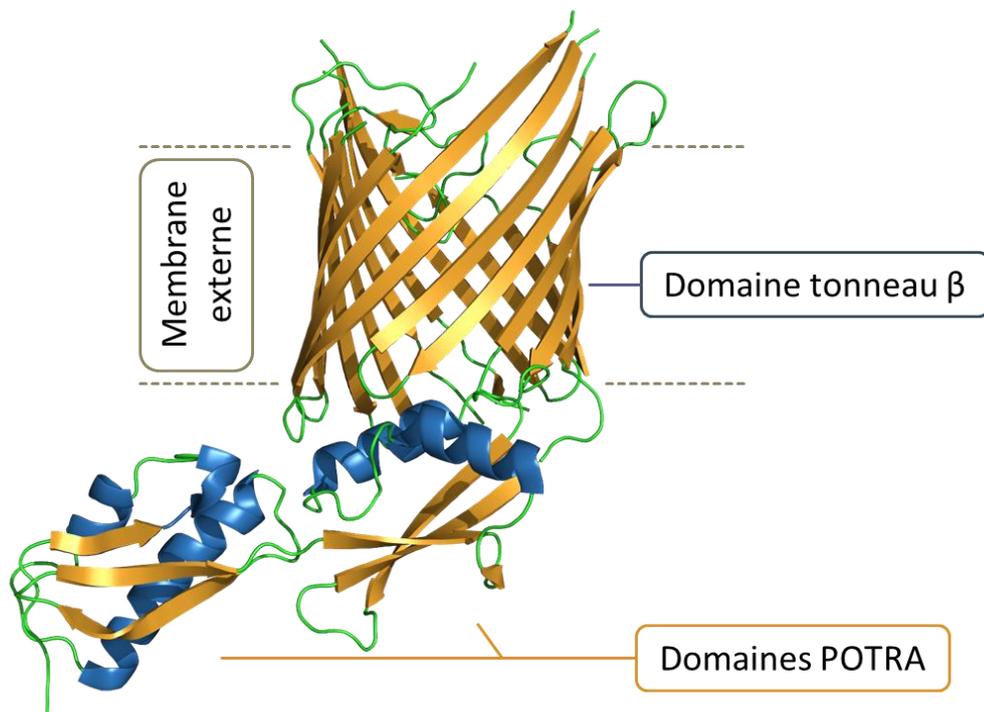


FIGURE 15 : Structure de FhaC servant de modèle pour ExlB. La structure présentée ici est celle de FhaC de *Bordetella pertussis* (code PDB : 4QKI [118]) où les feuillets β sont colorés en jaune et les hélices α sont colorées en bleu. Les boucles n'adoptant pas de structures secondaires sont colorées en vert.

Comme pour toutes les protéines du SST5b, ExlB permet le transport d'ExlA à travers la membrane externe bactérienne. ExlB est d'abord transloquée dans le périplasma (grâce au system Sec) et se replie dans la membrane externe où son rôle dans la sécrétion de ExlA pourra débuter.

Un modèle du mécanisme de sécrétion est présenté dans [119] pour les protéines FhaC et FhaB. Ces protéines faisant parties du SST5b comme ExlA et ExlB, il est possible d'extrapoler le mécanisme de sécrétion pour nos protéines. Voir Figure 16.

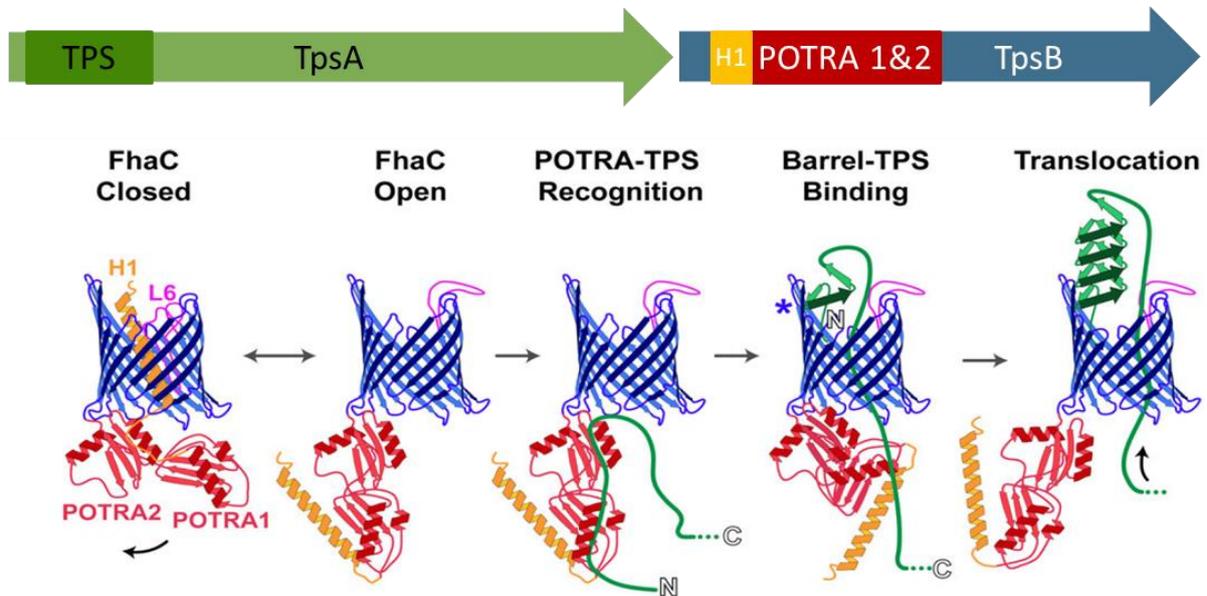


FIGURE 16 : Adapté de [119]. Modèle du mécanisme de translocation pour FhaC et le domaine TPS de FhaB. Le tonneau- β formé par FhaC est représenté en bleu, les domaines POTRA sont en rouge. L'hélice H1 est indiquée en jaune et la boucle L6 est représentée en rose. Le domaine TPS de FhaB est présenté en vert et ses extrémités N-terminale et C-terminale sont respectivement indiquées par N et C. L'astérisque représente la localisation sur FhaC où débute le repliement du domaine TPS.

Chez FhaC, le canal formé par le tonneau- β est capable de passer d'un état fermé par la boucle L6 et l'hélice H1 à un état ouvert. Dans cet état ouvert la boucle L6 est exposée au milieu extracellulaire et l'hélice H1 est située dans le périplasme [120]. Les domaines POTRA sont alors capables de reconnaître le domaine TPS (Two Partner System) à l'état déplié [100] [121] ce qui entrainera le passage de ce dernier à travers FhaC. Le domaine TPS interagira avec les feuillettes- β B5-B8 sur FhaC (marqué par un astérisque sur la Figure 16) ce qui induira son repliement en hélice- β . Ce repliement stable sera le moteur du passage de FhaB à travers FhaC [122].

De la même manière que pour FhaC et FhaB, la délétion de ExlB chez les cellules exprimant l'opéron ExlBA empêche la sécrétion d'ExlA, qui se retrouve alors dans le périplasme [123].

I.2.2. Concernant ExIA :

La recherche de protéines homologues à partir de la séquence d'ExIA est plus complexe que pour ExIB car peu d'homologues sont détectés. Seul le domaine TPS qui est extrêmement bien conservé entre les protéines du SST5**b** est typiquement reconnaissable. Ce domaine est très conservé entre toutes les protéines du SST5**b**, et sa structure est connue chez FhaB (code PDB : 1RWR [124]). Ce domaine se replie en hélices β (comme on peut voir sur la Figure 19). Ensuite, la robustesse des alignements de séquence diminue au long de la séquence d'ExIA qui ne semble pas avoir de similarités avec d'autres toxines dont le fonctionnement est connu, ce qui a permis de définir le domaine C-terminal. Seulement deux protéines ressortent des recherches d'homologie de séquence, ShIA et FhaB.

Pour aller plus en détails concernant les mécanismes de fonctionnement de ce système, nous nous sommes renseignés sur deux homologues FhaB et ShIA.

I.2.2.1. Homologie avec ShIA :

On retrouve une similarité de séquence intéressante de 35% entre ExIA et ShIA, hémolysine de *Serratia marcescens*, un organisme qui (comme *P. aeruginosa*) est régulièrement responsable d'infections nosocomiales [125]. Les infections de ce pathogène sont souvent causées par des souches multi-résistantes dû au fait que la bactérie est naturellement résistante à certains antibiotiques [126]. ShIA est au même titre que ExIA une toxine sécrétée par le SST5**b** et requiert ShIB pour être transloquée [101]. Outre leur appartenance au même système de sécrétion, on retrouve des similarités entre ces protéines notamment dans l'organisation des domaines et leurs tailles, 172 kDa pour ExIA contre 165 kDa pour ShIA (Figure 17). Une fois sécrétée ShIA est aussi capable de lyser les cellules eucaryotes en créant des pores dans les membranes cellulaires. Aucun récepteur cellulaire ne semble nécessaire à ShIA mais son activité demeure exclusivement toxique pour les cellules eucaryotes. Ces multiples points font que ShIA semble fonctionner de manière similaire à ExIA. Ces protéines appartiendraient alors à une classe de toxine formant des pores (PFT pour Pore Forming Toxin) qui ne serait pas caractérisée et dont aucune information structurale ne serait connue [127].

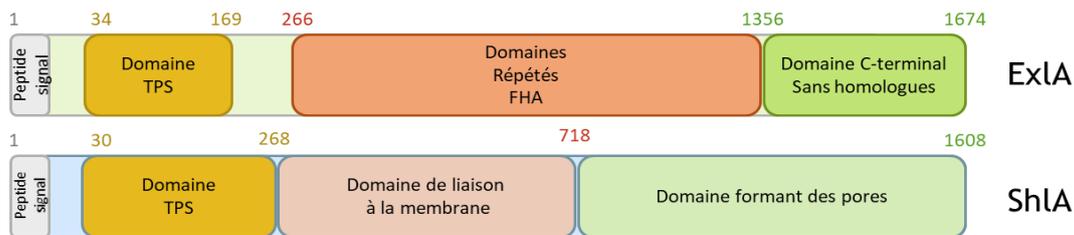


FIGURE 17 : Comparaison des différents domaines prédits pour les protéines ExlA et ShlA. Avec les informations de [127].

On peut trouver des informations intéressantes concernant son activité, par exemple, ShlA requiert lors de sa sécrétion un lipide phosphatidyléthanolamine pour être fonctionnelle [127] [128]. Cette toxine semble aussi capable de se lier à des liposomes uniquement s'ils présentent des charges négatives (la phosphatidylsérine par exemple) [128].

I.2.2.2. Homologie avec FhaB :

D'un autre côté, le serveur BLAST a classé certaines régions de la séquence d'ExlA comme étant de la superfamille des « filamentous-repeats ». Ces domaines ont été identifiés à l'origine chez la protéine FhaB (Filamentous hemagglutinin adhesin B) du pathogène *Bordetella pertussis* qui est responsable de la coqueluche.

Il n'est pas étonnant de retrouver cette protéine comme un homologue car il s'agit de d'une des protéines du SST5b dont le mécanisme d'action est le plus connu (donnant même son nom aux domaines « FHA-repeats ») [119].

Ces domaines FHA-repeats sont prédits comme adoptant des repliements de type hélices β mais leur structure n'a jamais été obtenue. Cependant, ils ont pu être modélisés à partir de données de microscopie électronique [129]. Voir Figure 18.

Nous avons donc pensé dans un premier temps qu'ExlA serait une protéine très allongée comme FhaB. Cependant, le mécanisme de fonctionnement entre ExlA et FhaB en reste potentiellement différent. En effet, ExlA ne comporte pas en totalité tous les domaines caractéristiques de FhaB. Des domaines tels que PRR (Proline Rich Region) sont absent chez ExlA [130]. De plus, leurs tailles sont différentes, ExlA fait 172 kDa et sa forme sécrétée ne semble pas subir de maturation alors que le polypeptide de FhaB fait 370 kDa et passe à environ 250 kDa après maturation [130][131]. Pour avoir plus d'informations quant aux structures secondaires adoptées par ExlA nous avons utilisé le serveur JPred4 (et anciennement JPred3) pour prédire leurs localisations. Le résultat indique que ExlA est composée principalement de feuillets β , qui sont prédits à un haut taux de confiance au début

de la séquence mais ce taux de confiance diminue vers la fin de la séquence, coïncidant avec le domaine C-terminal (voir Figure 18).

I.2.2.3. Prédiction de structures secondaires :

Nous avons ensuite utilisé le serveur Jpred4 pour confirmer la présence de possibles feuillets- β comme pour FhaB. En effet, d'après ce serveur, ExlA serait majoritairement composée de feuillets- β ce qui semble valider l'hypothèse du repliement en hélices- β observé chez les protéines du SST5b.

Cette prédiction de feuillets- β et de repliement en hélices- β est corroborée par les modèles issus des serveurs Phyre² et Rosetta. Les meilleurs modèles obtenus avec le serveur Phyre² sont issus de protéines repliées en hélices- β . Le modèle qui couvre une plus grande portion de la séquence est présenté dans la Figure 19. Il est basé sur une hemopexin binding protein dont la structure (code PDB : 4RM6) [132] est connue. Le Serveur Rosetta à lui aussi construit un modèle qui comporte des motifs hélices- β . Cependant, le domaine N-terminal qui est le domaine TPS caractéristique au repliement stable est modélisé déplié indiquant que ce modèle est de qualité discutable [133]. Cependant, les serveurs de modélisation semblent s'accorder sur le fait que la majeure partie N-terminale de la protéine soit repliée en hélices- β . En revanche, ils ne trouvent aucune information pour la partie C-terminale dont la structure reste définitivement inconnue.

I.2.2.4. Fonctions des hélices β chez d'autres protéines :

Si l'on utilise le serveur FFAS03 qui détermine des homologues par similarité de structures, on obtient des correspondances avec des protéines bactériennes très différentes. On retrouve par exemple l'hémopexin binding protein de *Haemophilus influenzae*, protéine dont la structure a ensuite été utilisée par Phyre² pour créer un modèle d'ExlA comme décrit plus haut [133]. Les hémopexin binding proteins des bactéries sont des molécules servant à capturer l'hémopexine de l'hôte dans le milieu extracellulaire [132]. L'hémopexine est une molécule servant à capturer et recycler l'hème de l'hôte, les hémopexin binding proteins sont donc des facteurs de virulence qui peuvent détourner les ressources en fer de l'hôte infecté pour le compte de la bactérie sécrétrice [134].

On observe aussi des similarités avec des pectine lyases, qui sont des facteurs de virulence bactériens présents chez des souches infectant les plantes. Ces protéines seraient

capables de se lier à la pectine qui est un polysaccharide constituant la paroi cellulaire des cellules de plantes [135].

Une dernière similarité qui semble éloignée du rôle d'ExIA mais qui reste intéressante est celle que l'on peut trouver avec des protéines contrôlant la formation de glace. En effet, lorsque la température s'approche trop de 0 °C, les organismes vivants sont confrontés à différents problèmes, l'un des exemples étant le risque d'explosion de leurs membranes par la glace. Certains organismes ont donc développé des défenses contre la formation de cette glace [136], et sont capables de sécréter des protéines contrôlant sa formation. Ces protéines peuvent être repliées en hélices- β , ce qui leur permet de maximiser la surface d'interaction avec les cristaux de glace [137]. L'interaction avec les faces en croissance des cristaux de glace gêne leur croissance qui est alors ralentie [138].

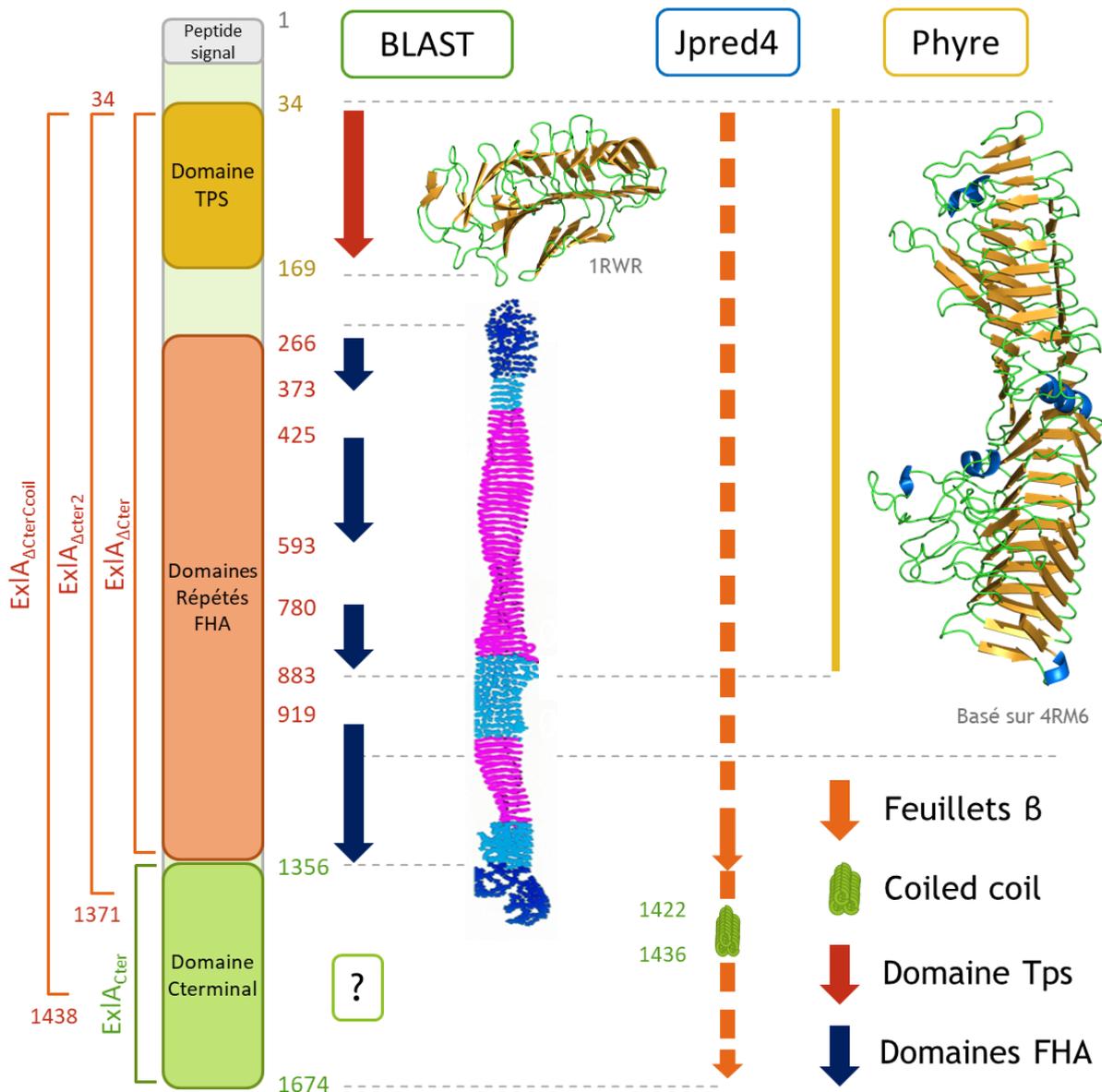


FIGURE 18 : Récapitulatif des informations obtenues grâce à la séquence d'ExlA. Les différents clones sont présentés à gauche. D'après le serveur BLAST, ExlA peut être sectionnée en différents domaines : le domaine TPS canonique chez les protéines « passager » du SST5b ; ensuite, des répétitions de domaines désignés comme étant similaires à la protéine FhaB de *Bordetella pertussis*. Ces domaines sembleraient se replier en hélices-β d'après le modèle présenté ici en rose et bleu ([129]). Enfin, on retrouve un domaine C-terminal sans homologues qui serait responsable de la toxicité de cette protéine en permettant la formation de pores chez les cellules eucaryotes. D'après le serveur JPred4, qui modélise les structures secondaires à partir de séquences, il est possible de voir que la protéine adopterait un repliement en feuillet β majoritairement. Il est à noter la présence d'un domaine coiled-coil dans la séquence du domaine C-terminal. Le serveur Phyre2 a pu construire un modèle très similaire à la structure d'une hemopexin binding protein (code PDB : 4RM6). Ce modèle ne s'étend que sur une partie de la séquence représentée par la barre en jaune. Pour les modèles structuraux, les hélices α sont présentées en bleu, les feuillets β en jaune et les boucles non-structurées en vert.

Cependant, récemment, la classification des domaines filamentous hemagglutinin a été mise à jour par BLAST. Nos domaines auparavant appelés FHA-repeats ont été classés comme FHA-2 (pfam13332) ce qui les différencie des domaines FHA-1 (pfam05594). Les domaines FHA-1 sont des domaines repliés en hélices- β qui permettent le déploiement d'un filament et qui correspondent au modèle que nous avons précédemment. Les domaines FHA-2 adoptent un repliement en feuillets- β mais il n'est pas certain qu'ils puissent se replier en hélices- β et former des filaments [139]. Ceci a donc entraîné une modification de notre modèle hypothétique d'action d'ExIA. D'après [140], le domaine FHA-2 s'insérerait dans les membranes cellulaires du côté externe et induirait le passage d'une toxine présente en C-terminal dans le cytoplasme de la cellule cible. Ceci sera exposé plus en détails dans la discussion.

I.2.2.5. Le domaine C-terminal :

La différence de classification mentionnée ci-dessus n'influe pas sur le domaine C-terminal d'ExIA. Ce domaine n'a aucun homologue et ne semble pas prétendre à une structuration précisément identifiable. Les serveurs de prédiction de structure secondaire établissent parfois avec peu de certitudes qu'il est constitué de brins- β (Figure 18 Blast). Il est aussi à noter qu'un domaine coiled-coil est prédit au centre de ce domaine C-terminal, le vecteur de l'activité cytotoxique [117].

II. Objectifs de cette partie de la thèse :

Comme discuté ci-dessus, ExIA est une protéine responsable d'un fort niveau de cytotoxicité et qui a un mécanisme d'action inconnu et possiblement totalement nouveau. Le but de cette partie de ma thèse était donc de comprendre à l'échelle moléculaire le mécanisme de virulence d'ExIA, en utilisant des techniques de biologie moléculaire, de biochimie et de biologie structurale.

La séquence de la protéine a donc été divisée en différentes constructions présentées sur la Figure 19, la première étant la protéine complète appelé FL (Full-Length). La deuxième construction contient la séquence de la protéine entière tronquée du domaine C-terminal. Et enfin, la dernière construction est composée de la séquence du domaine C-terminal uniquement.

Le projet a alors été reparti en différentes étapes, dont la première était de caractériser la protéine et les différentes constructions dans leurs états solubles, non liées aux membranes. La deuxième partie du projet a été de caractériser les différentes formes protéiques dans un état associé avec des lipides. Pour arriver à ces objectifs, j'ai utilisé des techniques de biophysique de pointe comme la Résonance Magnétique Nucléaire et l'AFM (Atomic Force Microscopy). Ces efforts m'ont permis de caractériser l'aspect « molten globule » du domaine C-terminal d'ExlA, de localiser les différentes régions d'ExlA capables d'interagir avec des lipides (et de les identifier), et d'effectuer des études cinétiques détaillées permettant la visualisation du processus de rupture des membranes cibles par cette toxine. Finalement, en collaboration avec le groupe d'Ina Attree, nous avons pu étudier en détail le comportement d'ExlA dans un environnement cellulaire. Un manuscrit qui décrit ses découvertes est en cours de préparation, et plusieurs des figures présentées dans ce manuscrit de thèse seront incluses dans cette publication. Ce travail nous a permis de proposer un mécanisme d'activation d'ExlA à l'échelle atomique.

III. La construction ExlACter :

III.1. Obtention d'un échantillon compatible avec les expériences de biophysique :

Le projet ExlA visait à caractériser le mécanisme d'action d'une nouvelle toxine formant des pores. Or, en utilisant les logiciels d'alignement de séquence, il a été possible de diviser la protéine ExlA entière en différents domaines, comme décrit ci-dessus. Ces différents domaines ont montré des activités différentes, notamment le domaine C-terminal qui semble perforer des liposomes et n'a aucune homologie avec d'autres toxines formant des pores. Le projet a donc démarré avec le clone ExlACter, le domaine de la protéine qui comporte l'activité cytotoxique, avec pour but de caractériser son fonctionnement et sa structure. Par soucis de clarté, les clones utilisés dans cette partie-là de l'étude sont indiqués ici.

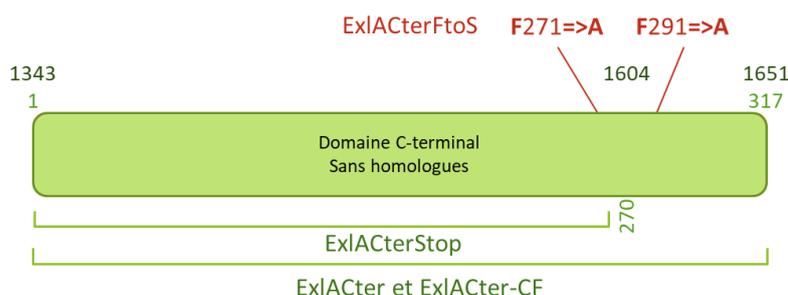


FIGURE 19 : Présentation des différentes constructions d'ExlACter utilisées dans cette étude. La numérotation de la séquence pour la protéine entière est indiquée en vert foncé. Les mutations sont indiquées en rouge.

Le clone d'ExlACter a été construit dans un vecteur pET-15b. Il a servi à transformer des cellules BL21 DE3 pour l'expression. Après expression de la protéine et lyse des cultures bactériennes, il a été possible de voir que la protéine était exprimée et soluble (du moins en partie). Cependant après la première étape de purification par colonne d'affinité au Nickel, la présence de nombreux contaminants de taille inférieure à la protéine d'intérêt ont été identifiés (Figure 20), ce qui semblait indiquer une forte dégradation d'ExlACter. Comme le tag histidine était en région N-terminale et les espèces dégradées ont été retenues sur colonne de Nickel, nous en avons conclu que la protéine était dégradée par l'extrémité C-terminale.

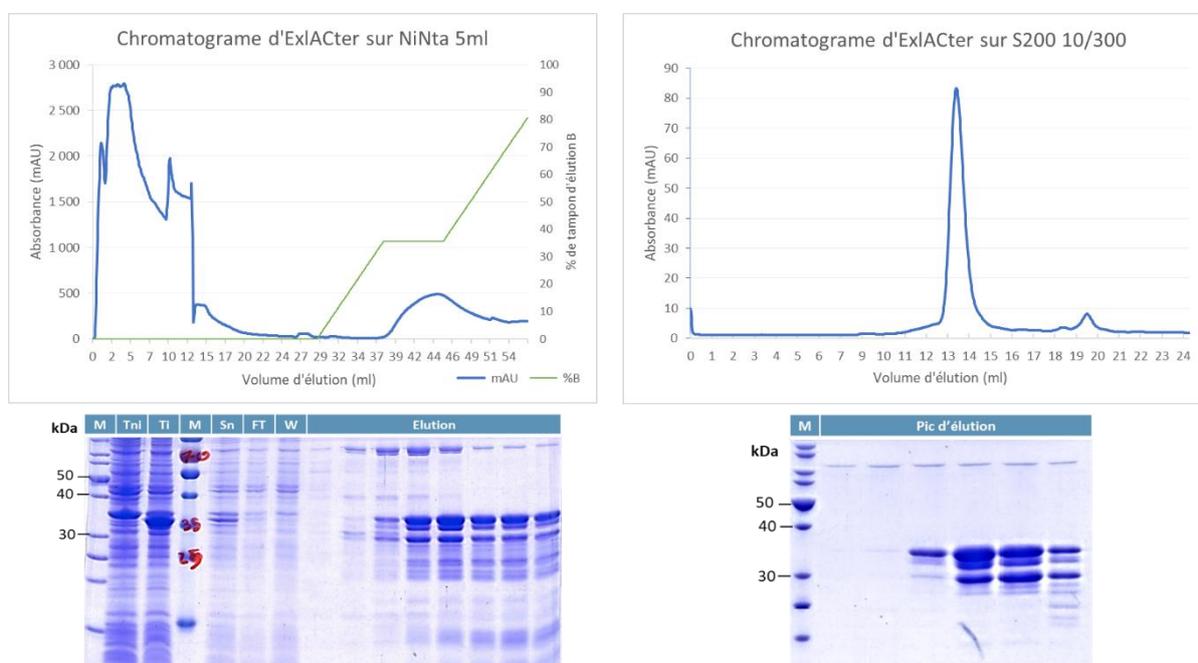


FIGURE 20 : A gauche, Chromatogramme de l'élution de la colonne d'affinité au Nickel pour ExlACter. En dessous, SDS-PAGE indiquant Tni : Culture avant induction de l'expression ; Ti : culture après induction de l'expression ; Sn : protéines solubles après centrifugation du lysat cellulaire ; FT : protéines non retenues sur la colonne ; W : protéines éluées dans l'étape de lavage de la colonne et enfin, l'élution de la colonne. A droite, profil d'élution d'ExlACter sur colonne d'exclusion stérique S200 10/300. Associé au SDS-PAGE des fractions du pic d'élution.

La purification s'est poursuivie avec une colonne d'exclusion stérique (SEC pour Size Exclusion Chromatography) pour tenter d'éliminer les produits de dégradation de la protéine. Comme il est possible de voir sur la figure 20, les sous espèces dégradées de ExlACter n'étaient pas séparables. La décision a été prise de recloner le plus petit domaine stable observable sur gel pour éviter de futurs problèmes de dégradation. Un échantillon d'ExlACter a été envoyé à la spectrométrie de masse (Plateforme du PSB) et au séquençage N-terminal afin de pouvoir déterminer la séquence exacte des espèces dégradées majoritaires d'ExlACter.

III.1.1. Identification et sous-clonage d'une forme dégradée d'ExlACter :

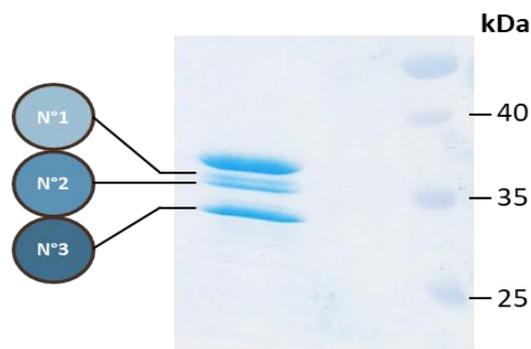


FIGURE 21 : Membrane PVDF chargée avec un échantillon d'ExlACter qui présente des dégradations. Il est possible de voir les différentes sous-espèces 1, 2 et 3 produites à partir de l'espèce complète non numérotée.

Les deux coupures qui donnaient naissance aux espèces n°2 et n°3 de ExlACter ont pu être identifiées. Il s'agissait de coupures entre deux motifs alanine/phénylalanine en position 271 et 291 de la séquence d'ExlACter. Deux clones ont été construits pour remédier à ce problème. D'une part la coupure semblant spécifique, les acides aminés Phénylalanine ont été mutés en serines afin de changer le site de coupure, donnant le clone pET-15-ExlACter-FtoS. Cependant, après purification de cette construction, d'autres contaminant de dégradation étaient toujours présents, indiquant que cette forme était aussi instable.

Nous avons donc effectué un nouveau clone visant la production d'une forme plus stable d'ExlACter, en introduisant un « stop » à la position de la phénylalanine 271 (pET-15-ExlACterStop). Ce clone a ensuite été transformé dans des *E. coli* BL1(DE3) et la protéine a été exprimée. La purification par colonne de Nickel (Figure 22) indiquait toujours la présence de contaminants mais ceux-ci semblaient être présents en quantité moindre que précédemment (Fig 21 précédente). Le fait que l'espèce majoritaire ExlACterStop soit en plus grande quantité que pour l'expérience précédente a permis de séparer cette espèce des contaminants de plus petite masse moléculaire en utilisant une colonne SEC. Les fractions contenant toujours des contaminants ont été purifiées à nouveau par SEC pour améliorer les rendements. En répétant

ainsi ces étapes de chromatographie par la taille, nous avons pu rassembler un échantillon suffisamment pur et homogène pour permettre sa caractérisation par des techniques de biophysique (Figure 22). La taille de la protéine ExlACterStop purifiée a ensuite été confirmée par spectrométrie de masse (Disponible à la Plateforme PSB avec l'aide de Luca Signor).

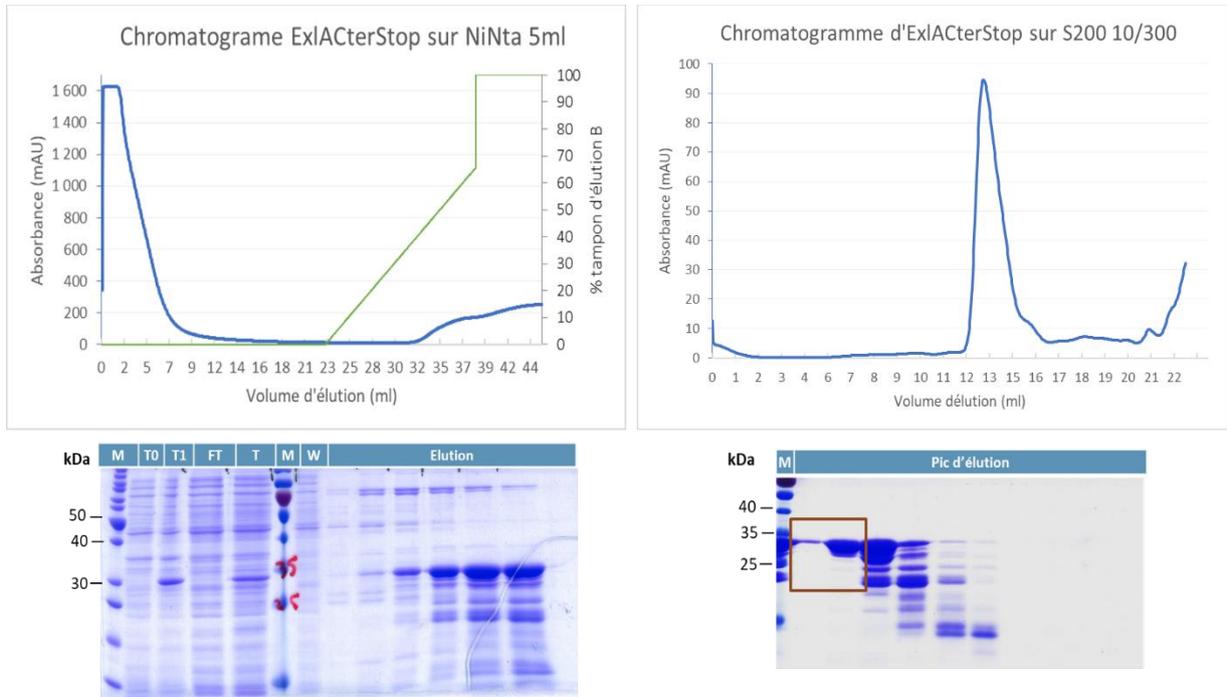


FIGURE 22 : A gauche, Chromatogramme de l'élué d'ExlACterStop après colonne d'affinité au Nickel et SDS-PAGE associé. Sur le gel, la fraction T0 correspond à la culture avant induction de l'expression, et la fraction T1 à la culture après induction de l'expression. L'apparition d'ExlACterStop entre T0 et T1 indique que la protéine est exprimée. Ensuite sont déposées les fractions de la purification par colonne de Nickel ; FT : protéines non retenues sur la colonne, T : Protéines solubles après centrifugation du lysat, W : protéines éluées pendant l'étape de lavage de la colonne nickel et enfin, le dépôt des fractions obtenues pendant l'élué de la colonne. A droite, l'élué d'ExlACterStop sur colonne d'exclusion stérique S200 10/300 et le SDS-PAGE associé. Les fractions du pic d'élué sont indiquées sur le gel. Le carré rouge encadre les fractions conservées après chaque itération de colonne après réinjection des fractions non encadrées en rouge.

Cette construction a été la première à permettre une purification donnant un échantillon dont la pureté était compatible avec la cristallogénèse. (Voir Figure 23) Trois plaques de criblage ont été réalisées à la plateforme HTX avec la protéine à 5 mg/ml. Des gouttes semblant contenir des cristaux ont été obtenues (Figure 23).

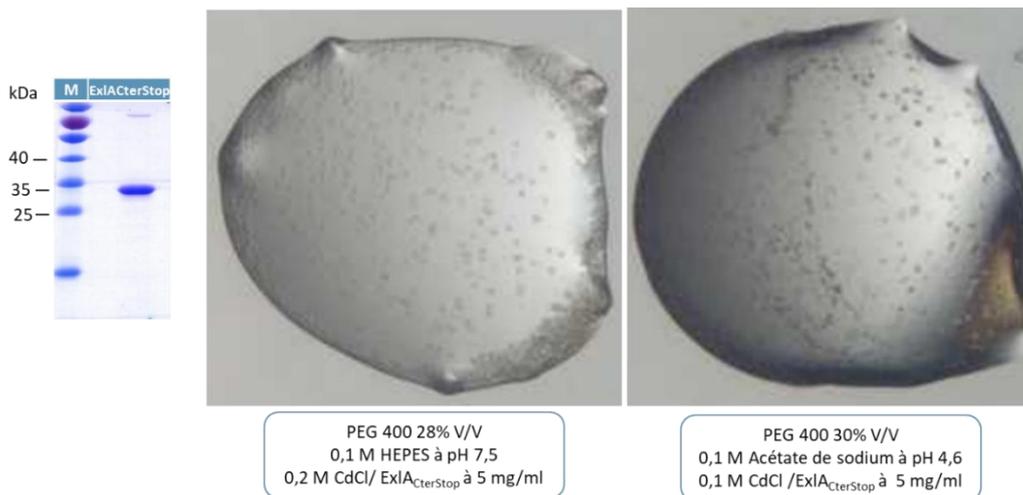


FIGURE 23 : Gouttes obtenues après criblage de condition de cristallisation d'ExlACTerStop. Le SDS-PAGE de l'échantillon utilisé pour la cristallisation est présenté à gauche, il semble pur et homogène. Les gouttes présentées ici sont issues des deux seules conditions ayant donnée des potentiels cristaux.

Afin de vérifier la reproductibilité de ce résultat, les gouttes ont été reproduites et améliorées manuellement (Fig 24), et les cristaux qui sont apparus ont été amenés au synchrotron ESRF (ID30a-3) pour vérifier leur potentiel de diffraction. En effet, les clichés de diffraction obtenus après exposition de ces cristaux aux rayons X nous ont découragé de continuer cette étude, car ils ont indiqué une grande hétérogénéité qui pourrait indiquer des cristaux de petits peptides ou sels (voir un mélange des deux).

Ces résultats nous ont donc encouragé à essayer un autre moyen d'expression d'ExlACTer visant la production d'une forme stable, comme le système « cell-free ».

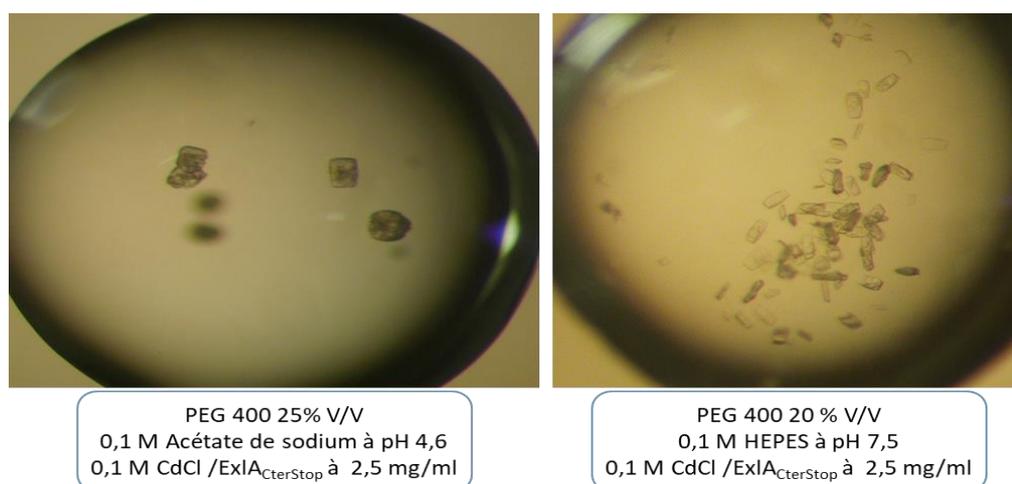


FIGURE 24 : Images des cristaux d'ExlACTerStop optimisés manuellement. Les conditions de cristallisation sont indiquées en dessous de chaque goutte.

III.1.2. Changement de système d'expression pour le Cell-Free :

Le système d'expression *in vitro* ou Cell-free, permet l'expression de protéines en s'affranchissant du besoin de cellules vivantes. Il était donc intéressant dans notre cas pour permettre l'expression de protéines sans avoir de problèmes avec la dégradation engendrée. Le gène d'ExlACTer a été reclone dans les vecteurs pIVEX2.3 et pIVEX2.4. Le site de coupure à la thrombine présent dans les plasmides commerciaux a été enlevé, la protéine étant très sensible aux protéases comme il a été indiqué plus haut.

Une fois les deux clones pIVEX2.3-ExlACTer et pIVEX2.4-ExlACTer finalisés, des tests ont été faits avec la plateforme Cell-free du PSB avec l'aide de Lionel Imbert. Parmi les deux clones énoncés, seul le clone pIVEX2.4-ExlACTer a fonctionné pour permettre l'expression. Il est possible de voir ici, au long de la purification par colonne d'affinité Nickel et colonne SEC, l'absence de dégradation grâce au changement de clone et de système d'expression (Figure 25).

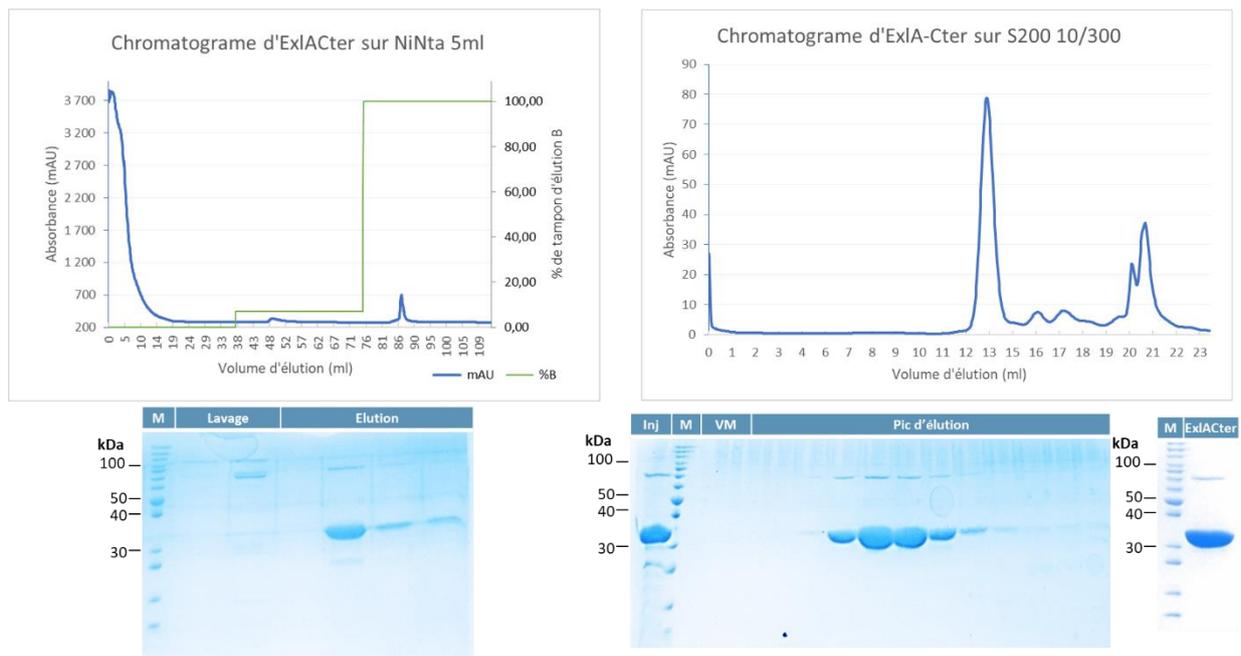


FIGURE 25 : A gauche, Chromatogramme de l'élué d'ExlACTer exprimé en cell-free après colonne d'affinité au Nickel et SDS-PAGE associé. Sur le gel, la fraction Lavage contient les protéines éluées pendant l'étape de lavage de la colonne Nickel. Les fractions Elution contiennent les protéines éluées pendant l'étape d'élué de la colonne. A droite, l'élué d'ExlACTer exprimé en cell-free sur colonne d'exclusion stérique S200 10/300 et SDS-PAGE associé. Il est possible de voir sur le gel les fractions du pic d'élué. Le dernier SDS-PAGE montre l'homogénéité de la protéine utilisée pour les futures expériences.

Comme il est possible de voir sur la Figure 25 nous étions désormais capable d'obtenir un échantillon d'ExlACTer pur et homogène. En vue de la qualité supérieure de cet échantillon exprimé avec le système cell-free, nous avons poursuivi nos études de sa caractérisation en utilisant des techniques de biophysique disponibles dans les plateformes du PSB.

III.2. Caractérisations de l'échantillon *in vitro* :

III.2.1. Expérience de Résonance Magnétique nucléaire 1D :

Il a donc été décidé de commencer la caractérisation d'ExlACter en effectuant des expériences de RMN 1D. Cette approche permettrait d'avoir des informations rapides concernant le repliement de la protéine en solution.

Les spectres RMN ont été enregistrés sur la plateforme RMN du PSB avec l'aide d'Adrien Favier en utilisant ExlACter à différents pH, car la littérature indiquait qu'ExlACter ne formait des pores dans les liposomes qu'à pH 4,0 [123].

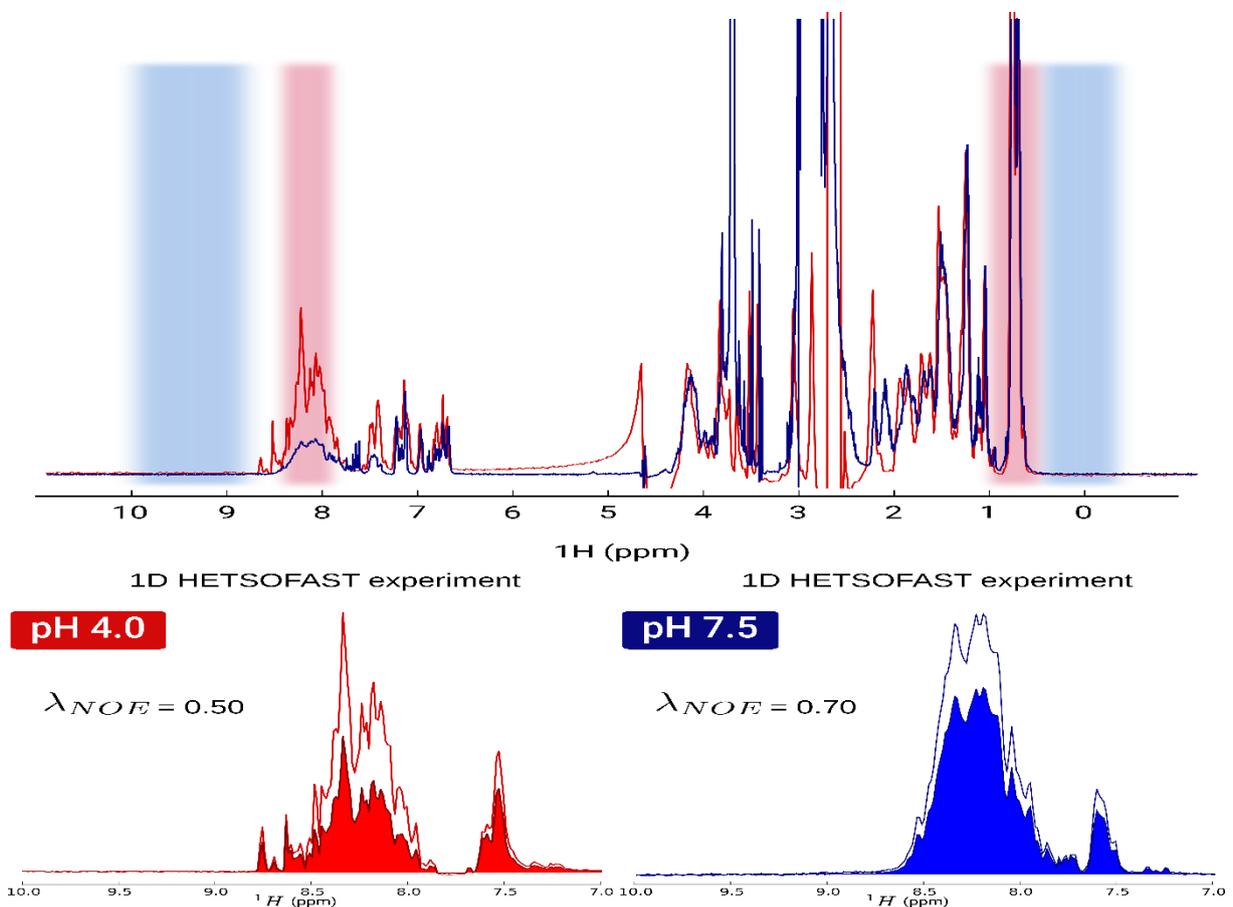


FIGURE 26 : En haut, spectre RMN enregistré pour ExlACter à pH 4,0 en rouge et à pH 7,5 en bleu. Les régions du spectre illuminées en rouge indiquent, si des pics apparaissent, une protéine dépliée. A l'inverse, lorsque l'échantillon est une protéine repliée, on attend des pics sur le spectre dans les régions bleue [141]. En dessous, présentation des expériences HETSOFAST 1D à pH 4,0 et à pH 7,5.

Le premier spectre RMN 1D de l'échantillon a été enregistré de 0 à 10 ppm. Sur ce spectre, des pics sont disposés différemment en fonction de l'état de repliement de la protéine étudiée. Lorsque la protéine est dépliée, des pics sont observés dans les régions indiquées en rouge sur le spectre. En revanche, lorsqu'une protéine repliée est étudiée, on observe un déplacement des pics des régions rouges du spectre vers les régions indiquées en bleu. Il est possible de voir qu'à pH 4,0 les pics du spectre RMN d'ExlACter sont majoritairement situés dans les zones rouges. Cependant, certains pics sortent de la zone de 8 ppm à 8,5 ppm pour se retrouver vers la région de 8,5 ppm à 10 ppm. Ceci pourrait indiquer qu'ExlACter n'est pas une protéine entièrement dépliée.

Pour avoir une idée plus claire de l'état structural de la protéine des expériences HETSOFAST-1D ont alors été réalisées [141].

Ces expériences sont capables de déterminer l'état structural d'une protéine en donnant un score λ NOE qui sera obtenu par comparaison entre deux spectres RMN 1D. Cette expérience se concentre sur la région du spectre comprise entre 7 ppm et 10 ppm. Un premier spectre est enregistré suivi d'un deuxième peu de temps après. Il est important de noter que les protéines dépliées se relaxent plus vite que les protéines repliées, et que le temps de relaxation est lié à l'intensité des pics obtenus en RMN. Pour les protéines dépliées il sera possible d'enregistrer un deuxième spectre équivalent au premier, alors que pour les protéines repliées, mettant plus de temps pour se relaxer, le deuxième spectre obtenu sera beaucoup plus faible que le premier. La différence entre l'aire sous la courbe des deux spectres enregistrés donnera un score appelé λ NOE [141]. Ce score λ NOE obtenu est directement relié à l'état structural de la protéine. Une valeur de 0,25 est obtenue pour une protéine repliée alors qu'une valeur de 0,75 indique une protéine dépliée. Ici à pH 4,0 ExlACter a donné une valeur de 0,5, entre les deux extrêmes, ce qui suggère un « molten globule » (Figure 26) [141]. Les « moltens globules » sont des protéines à la structure tertiaire qui oscillent entre différents états de repliement intermédiaires. Ces structures tertiaires sont des étapes de repliement avant que la structure native soit adoptée, après liaison d'un cofacteur par exemple ou formation de pont disulfures [142][143].

Ensuite, pour ExlACter à pH 7,5, les pics dans la région de 8,5 ppm à 10 ppm ont entièrement disparu. De plus la valeur λ NOE atteint 0,70, ce qui s'est rapproché de la valeur d'une protéine dépliée.

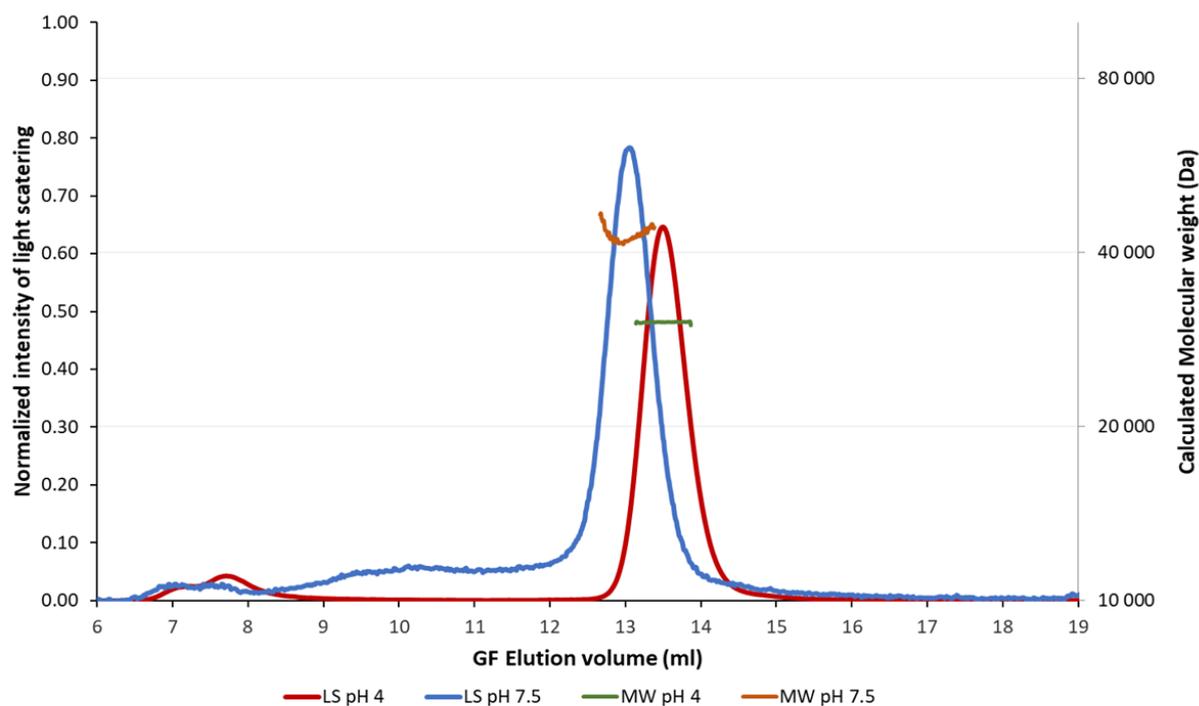
Donc, les résultats de RMN 1D ont indiqué qu'à pH 4,0, ExlACter était dans un état « molten-globule », alors qu'à pH 7,5, la protéine était plus proche de l'état déplié.

Le signal RMN 1D est cependant faible considérant la concentration de l'échantillon, il a donc été envisagé qu'ExlACter soit dans un possible état dimérique transitoire. Ceci aurait pour effet d'augmenter la taille de l'échantillon mesuré et induirait alors un aplanissement

des pics observés. Plusieurs techniques permettent de vérifier la présence d'un état multimérique pour une protéine d'intérêt. Il est possible d'utiliser le SAXS, l'Ultra Centrifugation Analytique ou encore la spectrométrie de masse native mais l'une des alternatives la plus simple consiste à utiliser le SEC-MALLS.

III.2.2. Caractérisation de l'échantillon ExIACter avec le SEC-MALLS :

Le MALLS (pour Multi-Angle Laser Light Scattering) couplé à une colonne d'exclusion par la taille permet de séparer les échantillons par leurs masses tout en mesurant leurs indices de réfraction. Il est donc possible de séparer des espèces de tailles différentes tout en mesurant leurs masses respectives. Ceci permet de définir par exemple si un pic observé en SEC est dû à un monomère ou à un dimère de la protéine de l'échantillon observé. Ici, les expériences de SEC-MALLS ont été réalisées à pH 4,0 et pH 7,5 à la plateforme de biophysique du PSB avec l'aide de Caroline Mas pour mesurer des différences potentielles. Les résultats sont présentés dans la figure 27 ci-dessous [144].



Sample	Elution volume	Polydispersity	Calculated molecular weight
ExIACter pH 4,0	13.48 ml	1(+/- 1.5%)	30320 (+/- 1%)
ExIACter pH 7.5	13.05 ml	1(+/- 1.6%)	42780(+/- 1.1%)

FIGURE 27 : Résultats des expériences de SEC-MALLS sur ExIACter à différentes valeurs de pH.

Le poids moléculaire théorique d'ExlACter est de 32 kDa. A pH 4,0, la masse d'ExlACter mesurée est d'environ 30 kDa ce qui correspond à un monomère, qui est élué à la taille et masse attendues. En revanche, à pH 7,5, un décalage dans l'éluion est observé, ExlACter étant élué en avant le pic d'éluion à pH 4,0. De plus, sa masse est enregistrée comme étant à 43 kDa et serait donc plus élevée à pH 7,5 qu'à pH 4,0. Sachant que si un dimère est présent, il serait attendu aux alentours de 64 kDa, il est possible que le décalage soit dû à la présence d'une dimérisation extrêmement transitoire et rapide qui influencerait sur la mesure du MALLS. Ceci peut expliquer aussi le changement de spectre enregistré à pH 7,5 en RMN 1D, induisant alors son aplanissement.

III.2.3. Caractérisation de l'échantillon avec les expériences SAXS :

Les résultats de RMN 1D à pH 4,0 étaient en accord avec les résultats du SEC-MALLS et la protéine semblait donc bien être un « molten globule ».

Pour confirmer cette hypothèse, d'autres expériences de biophysique ont été menées. Le SAXS (Small Angle X-ray Scattering) permet d'avoir des informations concernant l'état de repliement et la flexibilité d'un échantillon en solution ainsi que sur son état multimérique, [145] ce qui permettrait ici de vérifier l'état structural d'ExlACter directement *in vitro*, tout en donnant des informations sur son possible état multimérique à pH 7,5. Pour éviter tout phénomène d'agrégation dû à la concentration de l'échantillon, les échantillons ont été passés sur une colonne d'exclusion avant l'expérience de diffusion selon le protocole de SEC-SAXS. Les expériences ont été menées sur la ligne BIOSAXS de l'ESRF (BM29) de la même manière à pH 4,0 et à pH 7,5 pour vérifier un possible changement d'état conformationnel de la protéine. Les résultats sont présentés ci-dessous.

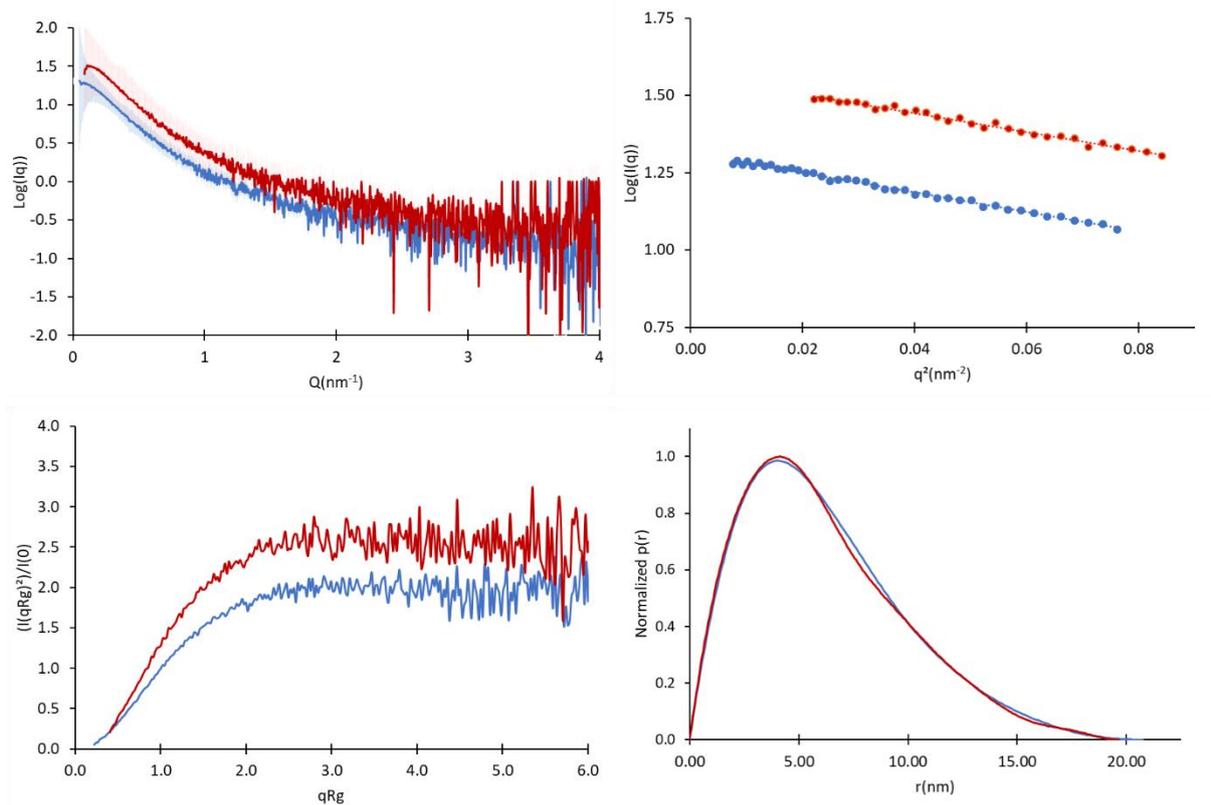


FIGURE 28 : Données SAXS obtenues avec ExIACter à pH 4,0 en rouge et pH 7,5 en bleu. Le graphe A représente les données brutes obtenues à partir de la diffusion des deux échantillons en SEC-SAXS. La courbe B est le Guinier plot pour les deux échantillons. Les points sont tous alignés sur une courbe linéaire indiquant qu'il n'y a pas d'agrégation. La courbe C représente le Kratky plot pour les deux échantillons, il est possible de voir que les valeurs du Kratky plot augmentent avec les valeurs X et ne redescendent pas vers 0. Ceci est caractéristique des protéines dépliées et flexibles. La courbe D représente la fonction de distribution des paires pour les deux échantillons. Il est possible de voir que l'échantillon aux deux pH génère des graphes en forme de cloche asymétrique. Ce type de graphe est caractéristique des molécules dépliées [145].

Les résultats sont très similaires pour les deux expériences aux deux pH. Les courbes de diffusion sont superposables pour les deux expériences indiquant les similarités de mesure pour les deux échantillons. Ensuite, le Guinier Plot est en adéquation avec les données car les écarts résiduels sont minimes. Nos données sont donc exploitables. Une donnée intéressante dans notre cas est révélée par le Kratky plot qui est un indicateur de l'état de flexibilité des molécules dans l'échantillon [145]. Pour les deux expériences, il adopte une tendance caractéristique qui n'est obtenue qu'avec des protéines flexibles et dépliées [146], voir Figure 28 et 29. Un autre indicateur révélateur de la flexibilité de ExIACter est le graphique de distribution des paires de distances. Pour les protéines globulaires, il adopte une forme de courbe en cloche, indiquant une répartition des distances homogènes le long du centre de la molécule [146]. Voir Figure 28 et 29. Ici, l'apparence de la courbe, indique que la molécule est dépliée.

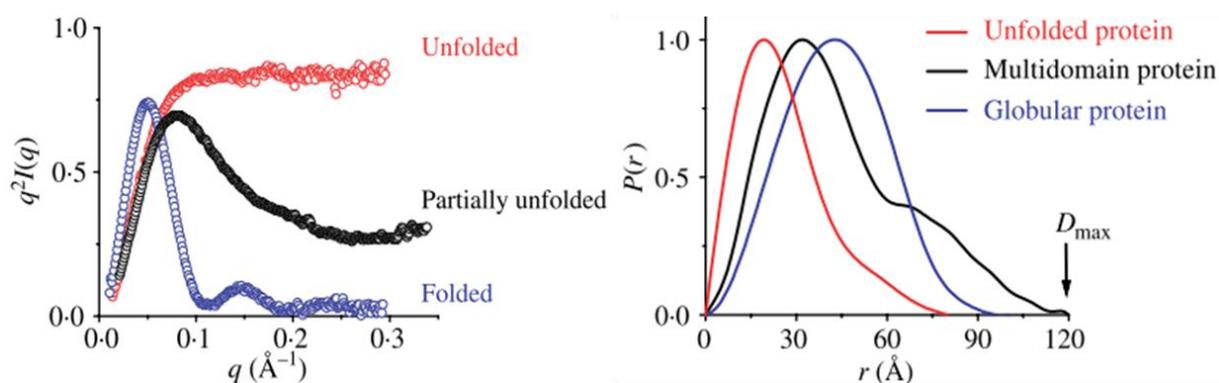


FIGURE 29 : Adapté de [145]. Allures caractéristiques des courbes de SAXS en fonction de l'échantillon observé pour, le Kratky plot à gauche et la fonction de distribution des distances à droite.

ExIACter est donc une molécule flexible voir dépliée à pH 4,0 comme à pH 7,5. Ceci confirme l'hypothèse la caractérisant comme « molten globule », en effet, on retrouve bien ici les composantes de flexibilité et de dynamique qui leurs sont caractéristiques.

III.2.4. Conclusion sur l'échantillon en solution :

La construction ExIACter a donc pu être caractérisée *in vitro*, grâce à son expression dans le système cell-free, qui a permis la production d'un échantillon pur et homogène. Ensuite les techniques de RMN, SEC-MALLS et SEC-SAXS nous ont permis d'affiner les connaissances sur la protéine à l'état soluble. Il est désormais clair que la protéine est dans un état transitoire « molten globule » en solution, à pH 4,0 et à pH 7,5 (et possiblement en forme homodimère transitoire dans ce dernier). ExIACter étant caractérisée en solution, le prochain défi était celui de comprendre comment fonctionnent les mécanismes de sa toxicité. Or pour cela, il fallait se rapprocher du contexte biologique, lors de son activation dans les membranes de cellules eucaryotes.

En effet, ExIA est une toxine formant des pores dans les membranes des cellules épithéliales pulmonaires [8]. Cette protéine est donc capable de s'insérer dans une bicouche lipidique pour interférer avec sa structure. Or les protéines membranaires sont généralement difficilement stables en dehors de leur environnement membranaire. Cependant, ExIA étant une toxine sécrétée, elle doit d'abord passer par le milieu extérieur avant de pouvoir s'insérer dans les membranes. Il faut donc qu'elle soit soluble, tout en étant capable d'interagir avec les membranes, à l'image d'autres toxines formant des pores sécrétées [147][148]. Certaines de ses autres toxines ont un état transitoire ou les parties hydrophobes servant à la déstabilisation de la membrane sont enfouies dans le cœur replié de la protéine. Cet état sert d'intermédiaire jusqu'à l'activation de la PFT qui entrainera son interaction avec les membranes, les régions hydrophobes précédemment enfouies seront alors exposées à la

membrane entraînant un changement de structuration ce qui donnerait alors à la protéine sa fonction [149] [150]. Il est possible qu'ExIA suive le même modèle.

De plus, l'étude structurale des protéines à l'état de « molten-globule » étant difficile, il a été décidé suivant le modèle énoncé précédemment de chercher à mimer un environnement lipidique dans lequel ExIACter pourrait devenir fonctionnelle. Sa structure pourrait ainsi être étudiée par des techniques plus classiques, de la même manière qu'une protéine membranaire.

III.3. Caractérisation de l'échantillon en milieu lipidique :

Les PFT sont capables de s'insérer dans les membranes lipidiques après reconnaissance d'un ligand. Ce ligand peut être une protéine de surface présente dans la membrane, un polysaccharide ancré à la membrane ou un lipide particulier [148]. Pour comprendre plus en détails le fonctionnement d'ExIACter ainsi que pour mieux caractériser son environnement physiologique, une expérience a été réalisée avec différents types de lipides (*lipid-strip de Echelon lipids*). De plus, il est important de noter que ShIA, protéine homologue, requiert de la phosphatidyléthanolamine pour son activation et se lie spécifiquement aux lipides chargés négativement [128][151]. Il serait intéressant de vérifier si les ExIA comporte les mêmes caractéristiques.

III.3.1. Identification de lipides cibles d'ExIACter :

Cette expérience fonctionne comme un dot-blot à l'exception du fait que ce sont des lipides qui sont fixés sur la membrane support et non des protéines. Un échantillon d'ExIACter a été déposé sur la membrane contenant différents lipides et lavé après incubation. La présence de la protéine a été ensuite révélée avec des anticorps anti-ExIACter. Ce test réalisé par Antoine Maillard (du groupe d'Ina Attree) à partir de la protéine que j'ai purifiée a donc permis de voir si ExIACter s'était fixée sur certains types de lipides particuliers.

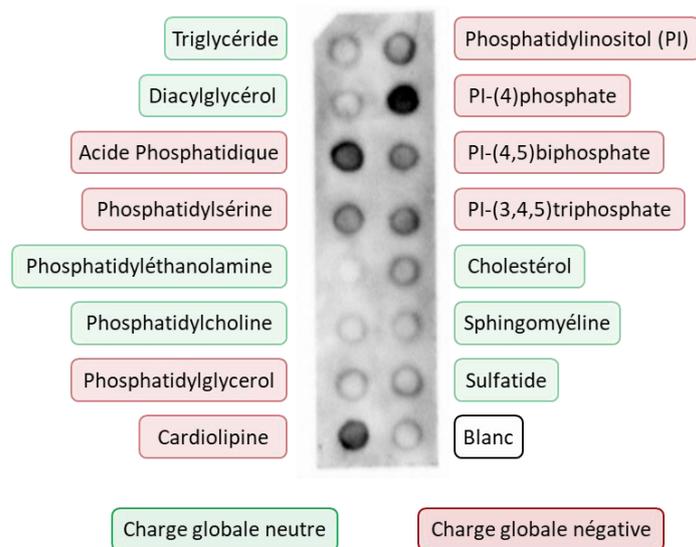


FIGURE 30 : La protéine ExlACTer a été déposée sur chaque position. Après incubation et lavage de la membrane pour éliminer les protéines non fixées sur la bandelette, la présence d'ExlACTer a été révélée avec un anticorps anti-ExlACTer. Les différents lipides présents sur cette membrane sont indiqués ainsi que leurs charges globales. Il semblerait qu'ExlACTer interagisse majoritairement avec les lipides négatifs.

Il est possible de voir qu'ExlACTer interagit avec certains types de lipides particuliers. Nous avons donc essayé de vérifier s'il était possible de trouver un point commun entre tous les lipides permettant l'interaction.

Premièrement, pour les lipides qui n'interagissent pas, avec ExlACTer on retrouve les triglycérides qui sont des lipides servant principalement comme réserve métabolique d'énergie chez l'humain [152] ; le diacylglycérol, qui est un produit de clivage du PIP3 et est un messager cellulaire [153] et la phosphatidyléthanolamine (PE) ainsi que la phosphatidylcholine (PC) qui sont des phospholipides constituant la majorité des membranes de tout être vivant [154]. Ils contribuent à contrebalancer les charges négatives présentes en surface induites par d'autres phospholipides. Le PE est aussi très présent dans les membranes bactériennes [155]. Il est à noter qu'il est un cofacteur nécessaire à l'activation de ShlA, protéine homologue d'ExlA [151]. Chez les eucaryotes le PE est principalement situé dans la partie intérieure de la membrane plasmique alors que le PC principalement situé à l'extérieur [154].

Finalement, la sphingomyéline et le sulfatides sont des composant principaux de la myéline, mais ils sont aussi présents dans les radeaux lipidiques de la membrane des cellules eucaryotes [156]. Le point commun de ces lipides est leur charge globale neutre, qui ne sembleraient donc pas interagir avec ExlACTer.

Parmi les lipides permettant l'interaction avec la protéine on retrouve l'acide phosphatidique, qui est un précurseur de production des autres phospholipides [153]. Il est particulier car il force des courbure dans la membrane induite par ses propriétés biophysiques. Ensuite, on retrouve aussi la phosphatidylsérine qui est un phospholipide constituant les

membranes cellulaires eucaryotes ; il est généralement situé sur la face intracellulaire de la membrane, étant responsable de la différence de charge entre les deux côtés de la membrane [154].

Le cholestérol semble interagir faiblement aussi. C'est un composant important des membranes cellulaires eucaryotes, en s'intercalant entre les autres lipides, il permet la modification des propriétés physico-chimiques des membranes. Il peut générer des zones appelées radeaux lipidiques qui permettent l'enclassement de protéines particulières dépendantes des conditions physico-chimiques de fluidité qu'il crée [157]. Ceci nous a fait émettre l'hypothèse qu'ExIA était peut-être localisée dans les lipids-rafts durant l'infection. Ce point sera discuté plus tard.

On retrouve aussi la cardiolipine, qui est un lipide situé principalement chez les mitochondries, ou il constitue 20 % des membranes [158]. (Il est donc, par extension, extrêmement présent dans le cœur, d'où son nom.) C'est aussi un constituant important des membranes bactériennes [159].

Enfin, on observe une série d'interactions avec les phosphatidylinositols (PI) qui sont des phospholipides présents dans le feuillet interne de la membrane cellulaire. Ils sont cruciaux pour le développement correct de la cellule et sont impliqués dans de nombreux phénomènes cellulaires. Dans ces phénomènes, leurs principales fonctions restent la communication intracellulaire et le trafic intracellulaire de vésicules [160].

Il ne semble pas qu'ExIA cible des lipides aux fonctions particulières mais que l'interaction soit plutôt médiée par leurs charges. En effet, la plupart des lipides permettant l'interaction ont une charge globale négative. Ceci est similaire à ce qui est observé pour ShIA. En revanche, ExIACter ne semble pas se lier au PE, nécessaire à l'activation de ShIA [151]. Ceci peut être dû au fait, que soit ExIA ne requiert pas ce lipide pour être fonctionnelle, soit il est nécessaire mais uniquement pour la partie N-terminale d'ExIA.

Sachant que le pI d'ExIACter se situe autour de 9, il est possible qu'il y ait interaction grâce aux charges. Ayant connaissance du profil d'interaction d'ExIA avec les lipides, nous avons voulu confirmer cette interaction de manière plus physiologique en incubant ExIACter avec des liposomes.

III.3.2. Expérience de flottaison de liposomes :

L'expérience de flottaison de liposomes a été réalisée en partenariat avec Viviana Job (dans le groupe d'Ina Attree) pour vérifier l'interaction d'ExIACter avec les lipides. Pour cette expérience, un échantillon de liposome est mélangé avec la protéine d'intérêt. Au-dessus de

cet échantillon est déposé un gradient de sucrose. Le tout est centrifugé dans une ultracentrifugeuse. Les lipides flottent différemment des protéines, ils seront séparés les uns des autres par la centrifugation. Cependant, si les protéines interagissent avec les liposomes, ils migreront ensemble. Ceci est visible en déposant sur gels les fractions du gradient après centrifugation. Ces gradients ont été réalisés pour ExlACter. Une chose remarquable est l'apparition d'une opacification des échantillons après incubation entre ExlACter et les liposomes.

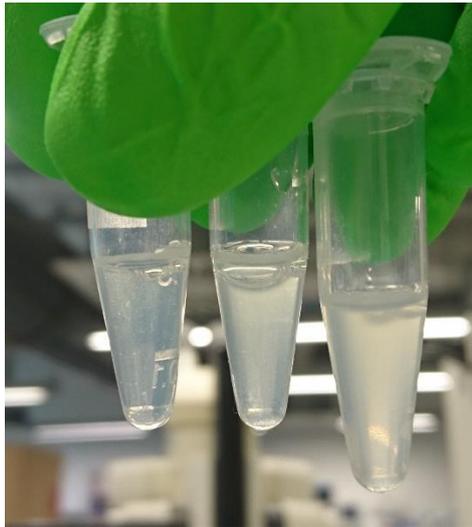


FIGURE 31 : Aspect des échantillons après incubation avec ExlACter. (Avant ultracentrifugation) L'échantillon gauche contient uniquement ExlACter. L'échantillon au centre contient uniquement des liposomes. L'échantillon à droite contient ExlACter et des liposomes. L'ajout d'ExlACter induit la formation d'un précipité avec les liposomes.

Ceci implique que la protéine est capable d'être active lorsqu'elle est incubée avec des liposomes. Cette activité est probablement à la base de la formation de ce précipité. Après ultracentrifugation de ces échantillons, et dépôt des différentes fractions sur gel, les résultats suivants ont été obtenus.

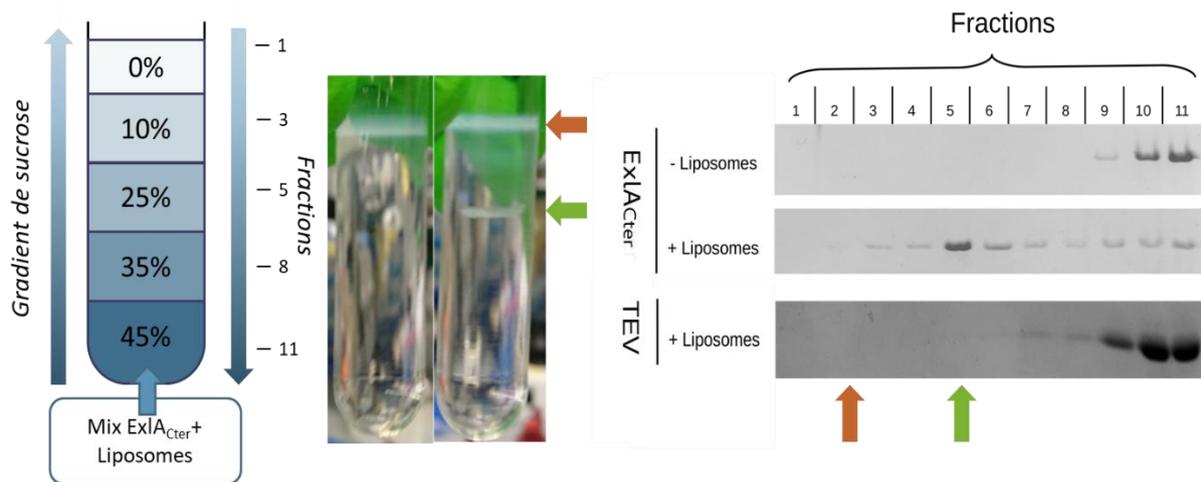


FIGURE 32 : Résultats du gradient de sucrose pour ExlA_{Cter}. Après 2 h d’incubation, la protéine et les liposomes ont été déposés au fond du tube. Les couches du gradient de sucrose ont été pipetées au-dessus. Après centrifugation, les fractions des fractions de 500 μ L ont été récupérées, numérotées comme indiqué et déposées sur SDS-PAGE. Parmi les tubes présentés ici, le tube à gauche contient uniquement des liposomes alors que le tube à droite contient des liposomes et ExlA_{Cter}. La flèche marron indique où sont situés les liposomes et la flèche verte où est située ExlA_{Cter}. On peut voir que ExlA_{Cter} migre avec les liposomes, indiquant une interaction entre les deux molécules.

Il est possible de voir qu’avec cette expérience, ExlA_{Cter} restait au fond du gradient de sucrose lorsque les liposomes étaient absents. En revanche, lorsque des liposomes étaient rajoutés au mélange, ExlA_{Cter} était entraînée avec ceux-ci lors de la migration et « flottait » au-dessus du gradient. Si l’on compare avec la TEV qui n’interagit pas avec les lipides, après migration celle-ci restait bien au fond du gradient même si des liposomes étaient ajoutés au mélange. Ceci semble indiquer qu’ExlA_{Cter} interagit bien avec des liposomes. Il est à noter qu’ExlA_{Cter}, après migration, ne se situait pas avec la fraction contenant les liposomes intacts mais deux fractions après (représentée par les flèches vertes et marrons sur la Figure 32). Cette fraction était reconnaissable car elle contenait un précipité floconneux blanc qui pourrait contenir des morceaux de liposomes détruits en complexe avec ExlA. Ce type de précipité avait déjà été observé dans l’équipe lorsque les protéines PopD et PopB (formant le pore translocon du SST3) ont été incubées avec des liposomes [161].

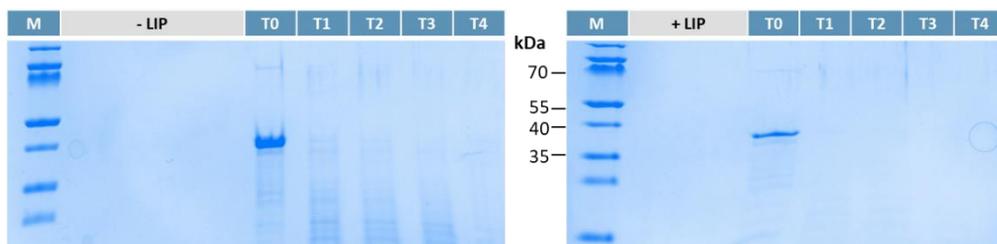


FIGURE 33 : Protéolyse ménagée sur les échantillons ExlA_{Cter} avec et sans liposomes. L’échantillon sans liposomes est un aliquot de la fraction 11 sans liposomes de la figure 27. L’échantillon incubé avec liposomes est un aliquot de la fraction 5 avec liposomes de la figure 27. T0 = avant digestion. T1= 2H, T2= 3h30, T3= 5H, T4= 18H de digestion. Dans les deux cas, la protéine est dégradée par la pepsine utilisée à 1/2000 à un ratio molaire.

Pour vérifier l'état d'ExIACter dans les liposomes, des tests de protéolyse ménagée ont été menés sur les échantillons ayant été incubés avec ou sans liposomes. En effet, si la protéine est insérée dans les membranes lipidiques, certaines régions devraient être inaccessibles aux protéases. La protéine insérée dans les liposomes devrait donc être plus résistante à la protéolyse que la protéine seule. ExIA étant à pH 4,0 nous avons utilisé la Pepsine qui reste active à ce pH ci. Utilisée sur les deux échantillons, il est possible de voir que dans les deux cas, après 2 heures de digestion, il ne restait plus d'ExIACter visible sur gel. La protéine est donc sensible à la Pepsine même après avoir interagi avec les liposomes. Il est possible que la ExIACter ne soit que partiellement insérée dans les liposomes et donc toujours accessible à la protéase ou qu'elle soit composée de nombreuses boucles accessibles hors des liposomes ce qui induirait une digestion en fragment trop petits pour être visibles sur gel. Ceci implique que ExIACter ou une partie serait accessible depuis le solvant même lorsqu'elle interagit avec les lipides.

III.3.3. Reconstitution de membranes supportées et utilisation de la Microscopie de force atomique :

Nous avons donc décidé de continuer nos études en utilisant la microscopie de force atomique (ou AFM pour Atomic Force Microscopy). Au PSB, cette plateforme est dirigée par Jean-Luc Pellequier et Jean-Marie Teulon, qui ont participé activement à cette étude. Pour réaliser ces expériences, des liposomes ont été préparés et incubés sur un support de mica, formant une bicouche lipidique supportée. Cette bicouche a pu ensuite être imagée par AFM. Durant les expériences présentées ici, la bicouche a été imagée une première fois afin de servir de contrôle visuel et de vérifier ses propriétés biophysiques. La protéine ExIACter a ensuite été ajoutée dans la cellule d'imagerie et les images de son effet ont été enregistrées au cours du temps. Il est à noter que les membranes et la protéine ont été préparées dans le même tampon. Les premières images enregistrées d'après ce protocole sont présentées ici.

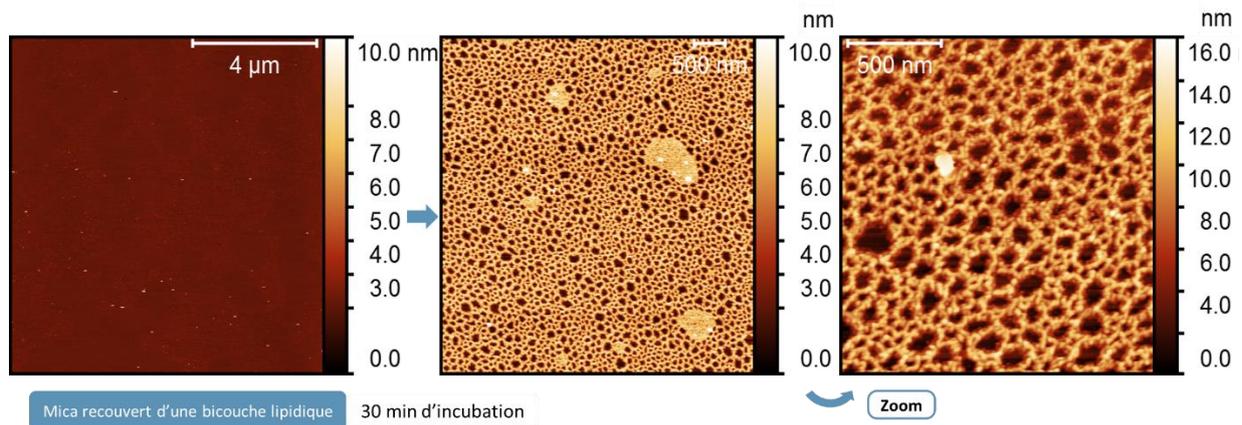


FIGURE 34 : Images des premières expériences d’AFM avec ExlACter. A gauche, image de la membrane supportée avant ajout de la protéine imagée sur un champ de $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$. La protéine a été ajoutée sur cette membrane, puis l’ensemble a été imagé de nouveau après 30 min d’incubation à température ambiante. On obtient alors l’image centrale qui correspond à un champ de $4\ \mu\text{m} \times 4\ \mu\text{m}$. L’image à droite est un zoom de la précédente sur une zone de $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$. La membrane auparavant complètement plane est maintenant parsemée de trous énormes.

Les premières images qui ont été obtenues montrent l’impact destructeur d’ExlACter sur les bicouches lipidiques. On observe un changement total de l’aspect de la membrane avec des trous de tailles différents qui parsèment les restes de la membrane entièrement détruite (ressemblant à un filet de pêche). Pour obtenir ces images, la concentration en protéine utilisée durant l’expérience était extrêmement élevée (1mM). La concentration en ExlACter déposée sur les membranes a donc été diminuée pour pouvoir visualiser un effet plus proche de l’effet physiologique sur les membranes. Une première série d’images a donc été réalisée avec une concentration croissante d’ExlACter pour déterminer quelle gamme de concentration permettrait d’imager correctement l’effet de la protéine. Suite à ces expériences, nous avons décidé d’utiliser des échantillons d’ExlACter à des concentrations entre 1 nM et 10 nM. Cette fois cependant, plusieurs images des mêmes zones ont été enregistrées les unes à la suite des autres dans le temps. L’effet de la toxine a pu être enregistré sur 40 minutes avec une image toute les 8 minutes environ.

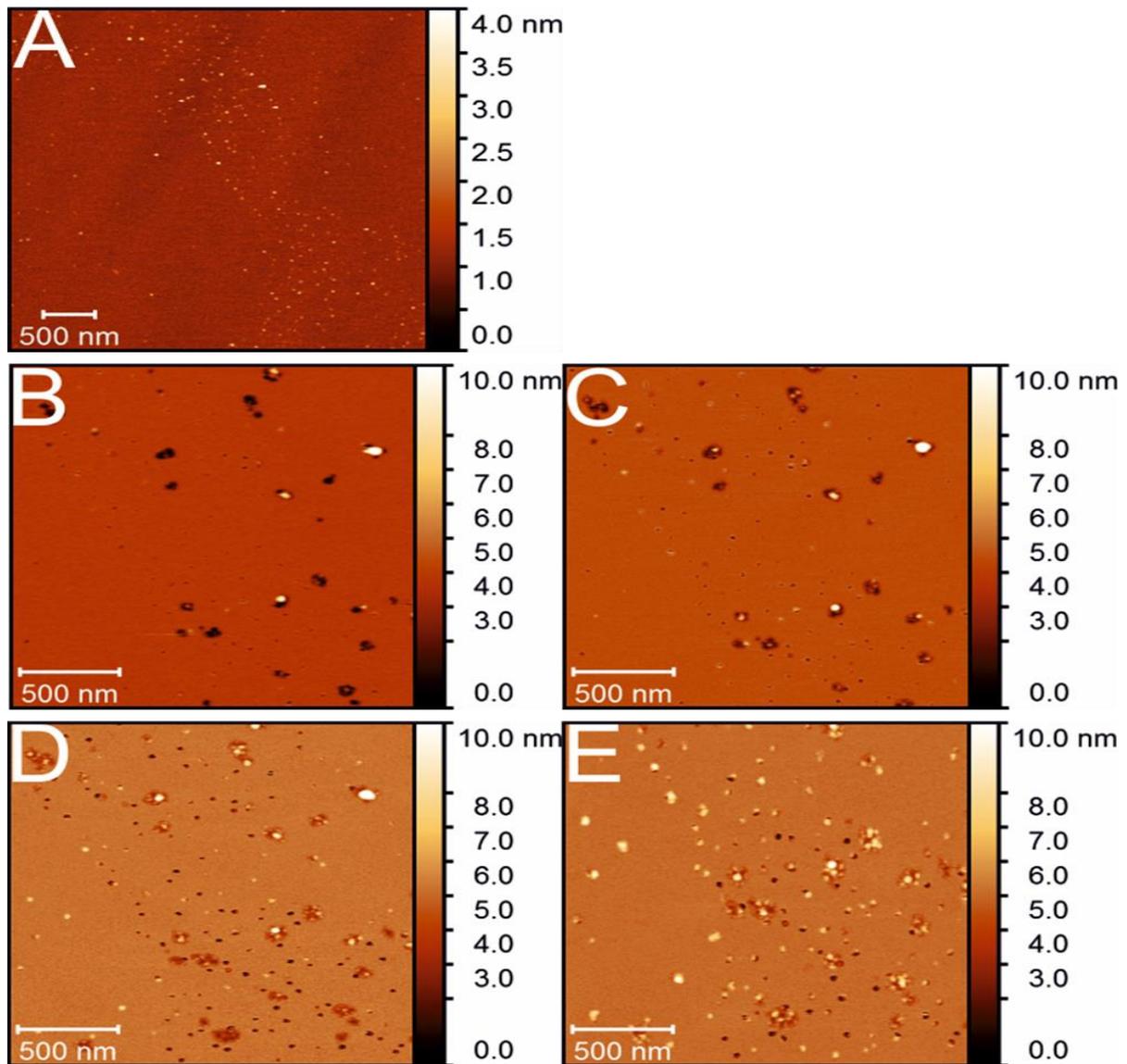


FIGURE 35 : Cinétique de l'action d'ExlACTer sur les membranes. Chaque image nécessite 8 minutes 30 pour être prise. Elles sont toutes prises à la suite sur la même zone. A. Image de la membrane avant ajout d'ExlACTer. Il est possible de voir qu'elle est plane et homogène. B. Image de la même membrane après ajout de 1 nM d'ExlACTer. (T= 8 min 30). Il est possible de voir des trous se former dans la membrane. C. Image suivante (T= 17 min). Les trous s'agrandissent. D. Image suivante (T= 25 min 30). Il est possible de voir que de nouveaux trous apparaissent. E. Image suivante. (T=34 min) Les trous commencent à être rebouchés par des protéines.

Des trous sont visibles dans la membrane après applications d'ExlACTer. Ces trous sont de taille variable et s'insèrent dans la membrane en moins de 8 minutes 30, ce qui indique que cette protéine est donc bien capable de perforer et déstabiliser la membrane. Cependant, les trous observés sont bien trop gros pour être des canaux laissant spécifiquement passer certains ions comme prévu par les expériences et le modèle proposé [117]. Il est possible que la variabilité des trous soit issue de la membrane imagée, qui ne subit pas de pression latérale comme dans les cellules. En effet, dans les cellules, les membranes sont soumises à une pression qui est donnée par la forme des cellules. Cette pression est absente en AFM car les membranes reconstituées sont planes et peuvent s'étendre sur le MICA. Ainsi, lorsqu'un trou

se forme sur une membrane reconstituée, les lipides sont déplacés et la membrane s'étend. Dans la cellule, lorsqu'un trou se forme, les lipides diffusent pour reboucher le trou sous la pression exercée par le reste de la membrane cellulaire. Il est aussi possible que la présence de la partie N-terminale d'ExlA puisse limiter la taille du pore formé.

En résumé, il a été possible de confirmer l'interaction d'ExlACter avec des liposomes formés de PS et de PC. Cette interaction entraîne aussi une destruction de la membrane lipidique. Cependant, il n'y a pour le moment aucune information quant au repliement potentiel d'ExlACter dans la membrane. Il n'est donc pas possible de l'associer à un type de PFT connu ou d'extrapoler son mécanisme d'action.

III.4. Recherche d'informations structurales sur l'échantillon en milieu lipidique :

III.4.1. Caractérisation par cristallographie rayons X :

Une des techniques utilisées pour permettre la détermination de structure de protéines membranaires est la cristallographie aux rayons X avec cristaux produits en phase cubique lipidique (LCP pour lipidic cubic phase)[162]. Cette technique utilise des lipides spécifiques qui adopteront des structures cristallines liquides en fonction de la température du milieu et de la quantité d'eau avec lesquels ils seront mélangés. Ces structures lipidiques serviront alors de matrice à la formation de cristaux de protéines membranaires. Cette technique a permis la résolution de structure de nombreuses protéines membranaires comme le récepteur β -adrénergique humain (code PDB : 2RH1 [163]) ou encore des protéines du complexe photosynthétique (code PDB : 2FKW[164]). Or, les structures de ces protéines membranaires sont très recherchées car elles sont impliquées dans des processus biologiques clés tel que la photosynthèse ou la communication intracellulaire.

Cependant, cette technique ne fonctionne efficacement qu'avec des cristaux de qualité, préparés avec des protéines correctement repliées, les parties flexibles des protéines pouvant gêner la cristallogénèse. Or, ExlACter, d'après les précédentes expériences menées en solution n'appartient pas à cette catégorie de protéines, ce qui rend sa cristallisation complexe. Cependant, il a été montré précédemment qu'ExlACter interagissait avec les lipides et bicouches lipidiques ; donc, nous avons envisagé d'utiliser la LCP comme support de cristallisation et de repliement pour ExlACter.

L'échantillon purifié à partir de l'extrait Cell-free était assez pur et en quantité suffisante (120 μ L à 9 mg/ml) pour permettre un criblage de conditions de cristallisation en LCP avec la plateforme HTX du PSB (avec l'aide de Delphine Blot et d'Anne-Sophie Humm). Les

premières tentatives de cristallisation ont été faites à 8,7 mg/ml. Pour ce faire, la monooleine, lipide constituant cette phase cubique, a été mélangée avec ExlACter. La formation de la phase cubique dépend de la quantité d'eau mélangée avec la monooleine et de la température. A 20 °C à un ratio 60 % monooleine – 40 % ExlACter, la monooleine devrait former une phase cubique. L'échantillon et la monooleine sont difficiles à mélanger, deux seringues ont alors été utilisées pour permettre le mélange de la phase en la passant d'une seringue à une autre à travers un fin canal.

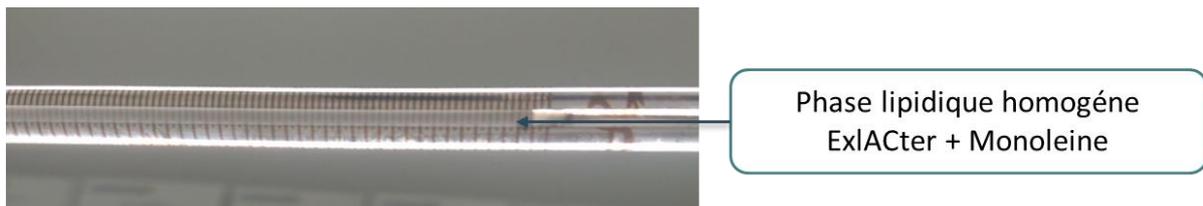


FIGURE 36 : Monooleine mélangée avec l'échantillon ExlACter (respectivement 60 % / 40 %). Il est possible de voir que la phase est limpide et homogène indiquant qu'elle est en phase cubique et prête à être utilisée.

Cette phase cubique contenant ExlACter a été utilisée pour réaliser 9 plaques de criblage de conditions de cristallisation. Quelques gouttes semblaient alors permettre la croissance de cristaux comme présenté dans la Figure 37. La majorité des cristaux obtenus avait la forme d'oursins ou de baguettes allongées. De manière intéressante, les cristaux ont poussé à pH acide ce qui rappelle le pH d'activation d'ExlACter avec les liposomes. Les cristaux sont apparus aussi majoritairement en présence de PEG 400 et de Chlorure de Cadmium. Or, il s'agissait approximativement de la condition qui avait généré les premiers cristaux d'ExlACterStop en goutte suspendue classique (Figure 23 et 24). Il est intéressant de noter qu'à cette quantité de PEG là, la LCP est devenue une Sponge phase, une phase lipidique cristalline contenant des canaux de solvant plus larges que la phase cubique classique [165].

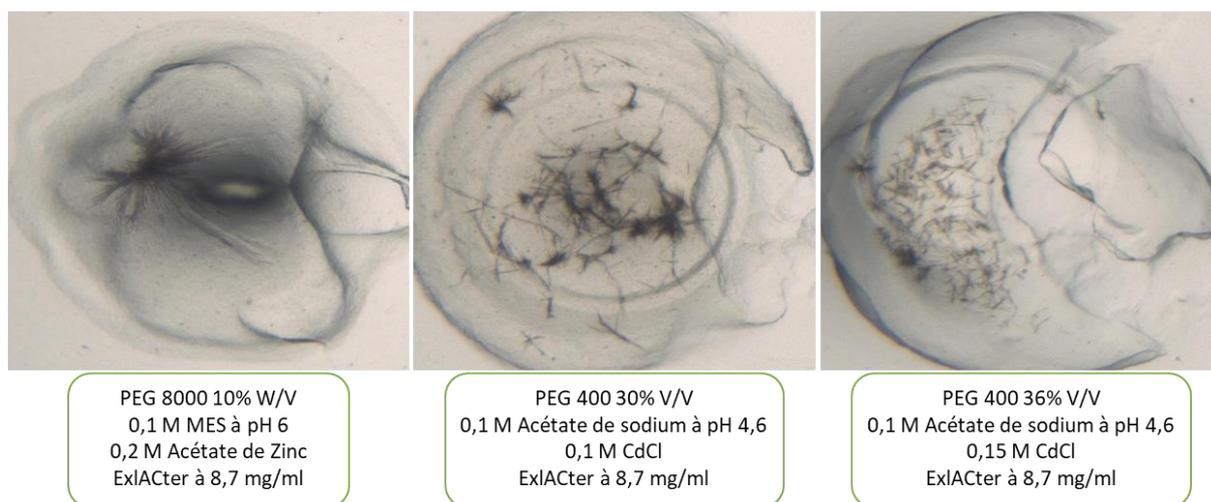


FIGURE 37 : Premiers cristaux obtenus en LCP. Les oursins de la condition à gauche n'ont jamais pu être reproduits. Les cristaux des deux autres gouttes nous ont encouragés à améliorer cette condition pour obtenir des cristaux plus gros et plus homogènes, compatibles avec l'utilisation d'une ligne synchrotron.

Les baguettes obtenues étant trop fines et pas assez homogènes pour être utilisées sur une ligne synchrotron, de nouveaux criblages ont été réalisés pour trouver de nouvelles conditions permettant la croissance de cristaux plus gros. Après criblage, la concentration de protéine a donc été diminuée progressivement à 6 mg/ml ainsi que la concentration en PEG 400 et Chlorure de Cadmium. Ceci a permis la croissance de baguettes plus épaisses et plus définies comme il est possible de voir sur la Figure 38.

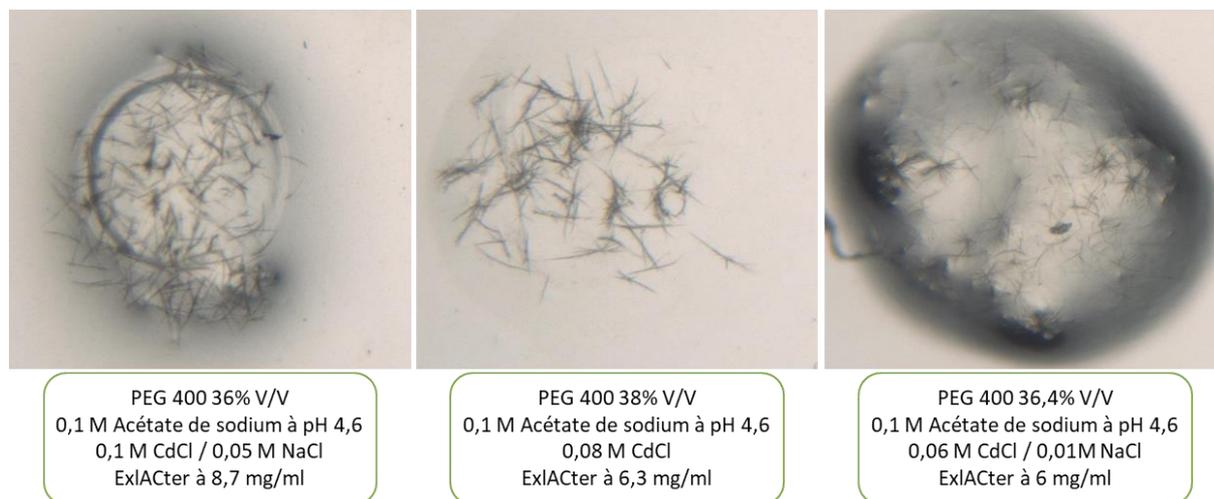


FIGURE 38 : Derniers cristaux obtenus. Les deux gouttes à gauche ont été pêchées par la plateforme HTX pour être soumises aux rayons-X sur ID 23-2.

Normalement, la détection des cristaux en LCP se fait par prise d'une image de la goutte en UV. Les protéines absorbant les UV, le cristal de protéine apparaît alors. Cependant, ExlACTer ne contient pas de tryptophanes, cette protéine est invisible en UV. La vérification de la qualité du cristal ne peut donc se faire que par diffraction aux rayons-X. Les cristaux ont donc été pêchés par la plateforme HTX. Pour ce faire, un robot est venu toucher, avec la pointe d'une boucle de pêche enduite de colle, le support sur lequel la goutte de LCP avait été déposée. La forme du cristal a alors été découpée au laser et le robot a pu se retirer en emportant, grâce à la colle, le support de la LCP ainsi que la LCP. L'ensemble a été cryogénisé dans l'azote liquide et était prêt à être soumis à une source rayons X. Les cristaux ainsi pêchés ont été soumis au rayonnement synchrotron sur ID23.2.

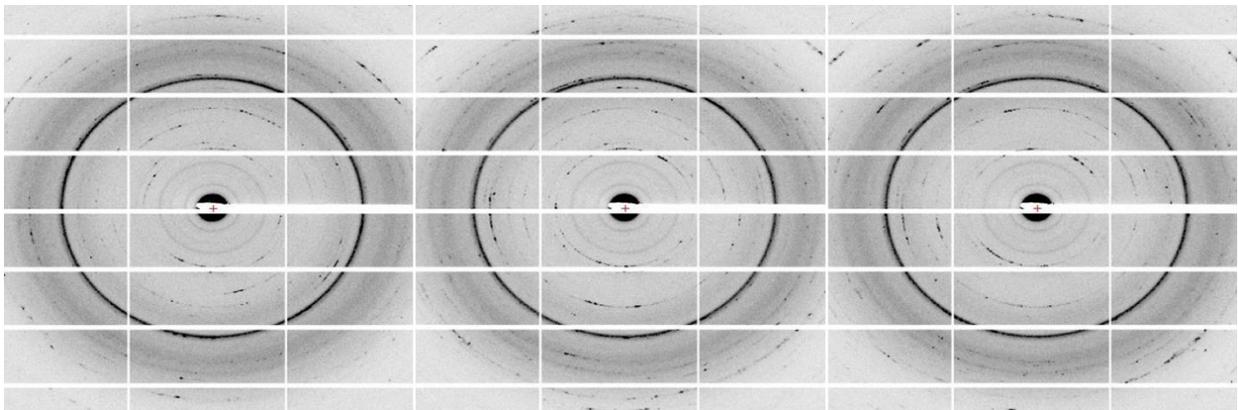


FIGURE 39 : Clichés de diffraction obtenus à partir de l'exposition des cristaux d'ExlACTer présentés dans la Figure 38. Il est possible de voir la diffraction de la phase lipidique sous forme d'anneaux, mais aucune tache de diffraction issue de la protéine ExlACTer n'est visible.

Les clichés de diffraction sont présentés dans la figure 39. La diffraction de la phase lipidique est visible mais aucune donnée de diffraction de protéine exploitable n'a pu être visible et extraite. Les cristaux étaient possiblement trop petits pour diffracter suffisamment. La fermeture temporaire du synchrotron ESRF pour amélioration pendant 18 mois a empêché la poursuite des expériences qui concernaient l'amélioration et la diffraction de ces cristaux.

III.5. Conclusions sur l'échantillon ExlACTer :

D'après ces expériences, nous avons pu clairement montrer que le domaine C-terminal d'ExlA avait une activité sur les bicouches lipidiques. Concernant notre modèle, nous pouvons dire que cette protéine est dans un état « molten-globule » en solution mais reste capable d'être activée une fois en présence de lipides. Une certaine spécificité envers les lipides

chargés négativement est observée. Enfin, ExlA_{Cter} est aussi capable de former des trous à une concentration très faible (1 nM) dans les bicouches lipidiques. Sur ces points, ExlA_{Cter} semble fonctionner de la même manière que ShlA. Cependant, pour obtenir plus d'informations quant aux mécanismes d'action de la protéine complète, nous avons cherché à caractériser le fonctionnement des autres constructions ExlA-FL et ExlA Δ Cter.

IV. Les constructions ExlA Δ Cter et ExlAFL :

Sur ce projet, nous nous sommes focalisés principalement sur la partie ExlA_{Cter} qui présente l'activité cytotoxique. Cependant, pour comprendre plus en détails le fonctionnement de la protéine complète ainsi que de son domaine C-terminal nous avons aussi essayé de caractériser les constructions ExlA Δ Cter et ExlAFL. Par souci de clarté, les constructions seront rappelées ici.

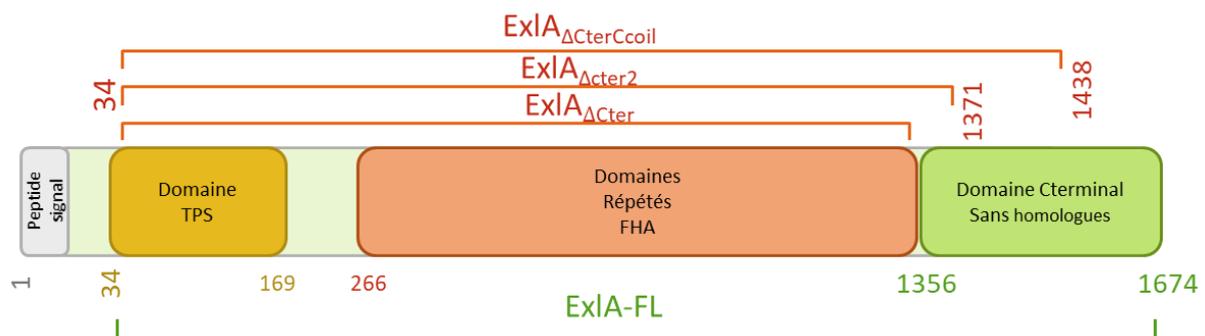


FIGURE 40 : Récapitulatifs des différentes constructions d'ExlA utilisées ci-dessous.

IV.1.1. Caractérisation de la protéine ExlA Δ Cter :

Nous avons poursuivi nos études avec la construction ExlA Δ Cter car cette partie de la protéine avait été prédite dans un premier temps comme étant formée par des répétitions de la séquence de la FHA-1 de la FhaB de *Bordetella pertussis*. Ces séquences sont prédites comme étant des β -hélices et sont donc repliées. De plus, le système de sécrétion de type 5b n'utilisant pas d'ATP pour permettre la sécrétion, il a été hypothétisé que la sécrétion utilise le repliement de ces domaines en β -hélices à l'extérieur de la cellule comme moteur pour le passage du polypeptide [122]. On peut donc penser que ces domaines sont stables et peu enclins à être dégradés car leur repliement dégage suffisamment d'énergie pour permettre la sécrétion. Or après expression de cette construction dans le cytoplasme bactérien, il a été possible d'observer la dégradation de la protéine ExlA Δ Cter (Figure 41).

Ce phénomène de dégradation a semblé continuer au long de la purification. Les premières expressions et purifications de cette construction se faisaient après expression à 25 °C sur la nuit. Pour empêcher la protéine de se dégrader dans le cytoplasme bactérien, il a été décidé de la produire en un temps minimum. La protéine a été exprimée à partir d'un pET-28 contenant l'opéron lactose ; or pour l'opéron lactose, l'apparition de protéines recombinantes se fait quelques minutes après induction [166]. Les cellules exprimant ExIA Δ Cter ont donc été laissées 45 minutes à 37 °C après induction. Les cellules ont été lysées et le lysat a été chargé sur colonne de nickel puis élué. Il est possible de voir sur le Western blot anti-his fait sur l'élué de Nickel la différence de dégradation entre les deux types d'expression (Figure41).

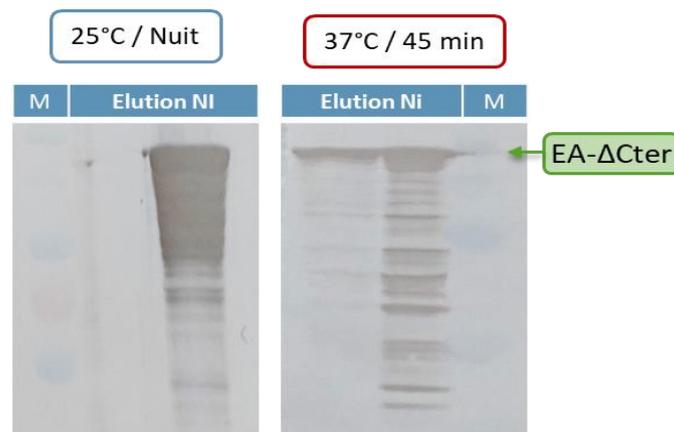


FIGURE 41 : Western-blot comparatif entre différentes fractions d'élué de Nickel d'ExIA Δ Cter. A gauche WB anti-6histidine sur élué de Nickel après expression de la protéine ExIA Δ Cter à 25 °C sur la nuit. A droite, idem mais après expression 45 min à 37°C. Il est possible de voir que la répartition des sous-espèces dégradées d'ExIA Δ Cter est différente entre les deux moyens d'expression.

Cependant, malgré ce changement dans le protocole, des espèces dégradées étaient toujours présentes, étant retenues sur colonne de nickel et révélées par Western-Blot anti-histidine. En sachant que le tag Histidine est en extrémité N-terminale de la protéine, il a été possible d'extrapoler que la dégradation se produisait par l'extrémité C-terminale d'ExIA Δ Cter. De plus, la dégradation a continué après purification. Comme il est possible de voir sur le gel ci-dessous, ExIA Δ Cter disparaît rapidement du gel au cours du temps. Toutes les purifications ont donc été faites en un jour depuis l'expression à la colonne d'exclusion par la taille pour limiter l'impact temporel de cette dégradation.

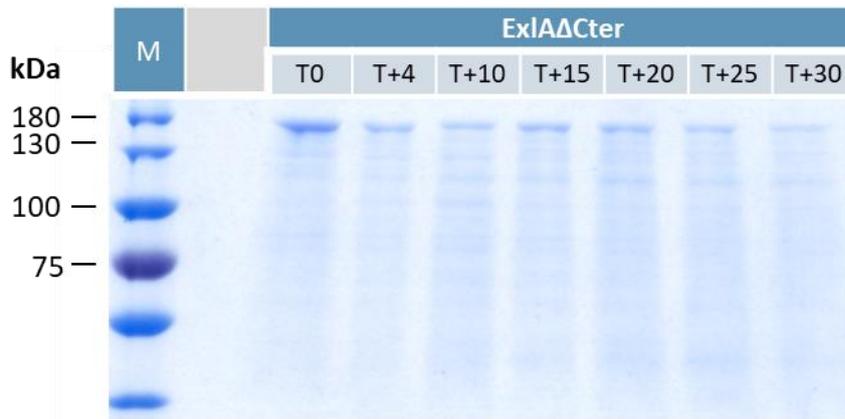


FIGURE 42 : SDS-PAGE indiquant la dégradation d'ExIA Δ Cter au cours du temps. Le temps est indiqué en jours. Un échantillon a été laissé en chambre froide pendant un mois. Des fractions ont été prélevées à différents temps et déposées sur gel. Il est possible de voir la protéine disparaître au cours du temps indiquant sa dégradation après purification.

IV.1.1.1. Création du clone ExIA Δ Cter2 :

Nous avons donc décidé de modifier le clone à son extrémité C-terminale. Or selon certains serveurs de prédiction de structure secondaire, la séquence du clone ExIA Δ Cter aurait été amputée d'un dernier brin de feuillet- β dans un premier clonage effectué par Michel Ragno (dans le groupe d'Ina Attree), de qui nous avons obtenus le clone. Un nouveau clone construit à partir du clone ExIAFL (par mutation d'un résidu en codon stop) a été effectué en incluant la séquence de ce potentiel brin β . Cette construction a été nommée ExIA Δ Cter2. Après expression de ce clone et purification de la protéine par colonne d'affinité au Nickel, la présence d'espèces dégradées était toujours visible.

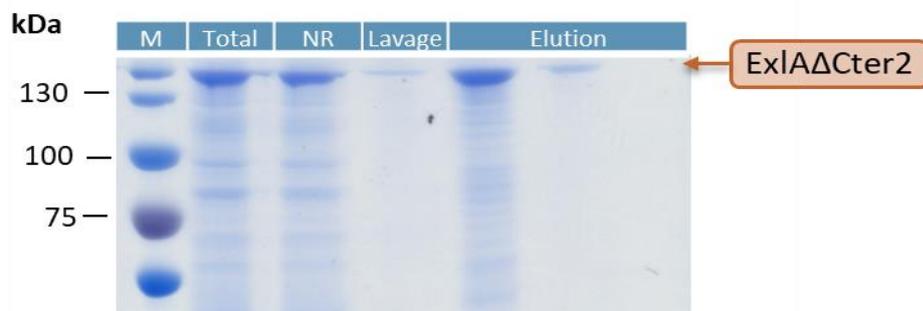


FIGURE 43 : SDS-PAGE de la purification sur billes de nickel de la protéine ExIA Δ Cter2. On peut voir sur gel les fractions : Total : fractions des protéines solubles après centrifugation du lysat cellulaire. NR : Protéines non retenues par les billes de nickel. Lavage : protéines éluées durant l'étape de lavage des billes. Elution : protéines éluées durant l'étape d'éluion des billes. Il est possible de voir la protéine ExIA Δ Cter2 retenue et éluee par les billes. Cependant, la présence de nombreuses bandes de plus petite taille que la protéine complète semble indiquer la présence de dégradation.

IV.1.1.2. Création du clone ExlA Δ Cter6his :

La présence de dégradation étant gênante, le tag-histidine a donc été placé en C-terminal afin de ne purifier par colonne d'affinité uniquement les espèces entièrement synthétisées. Ce clone a été appelé ExlA Δ Cter6his.

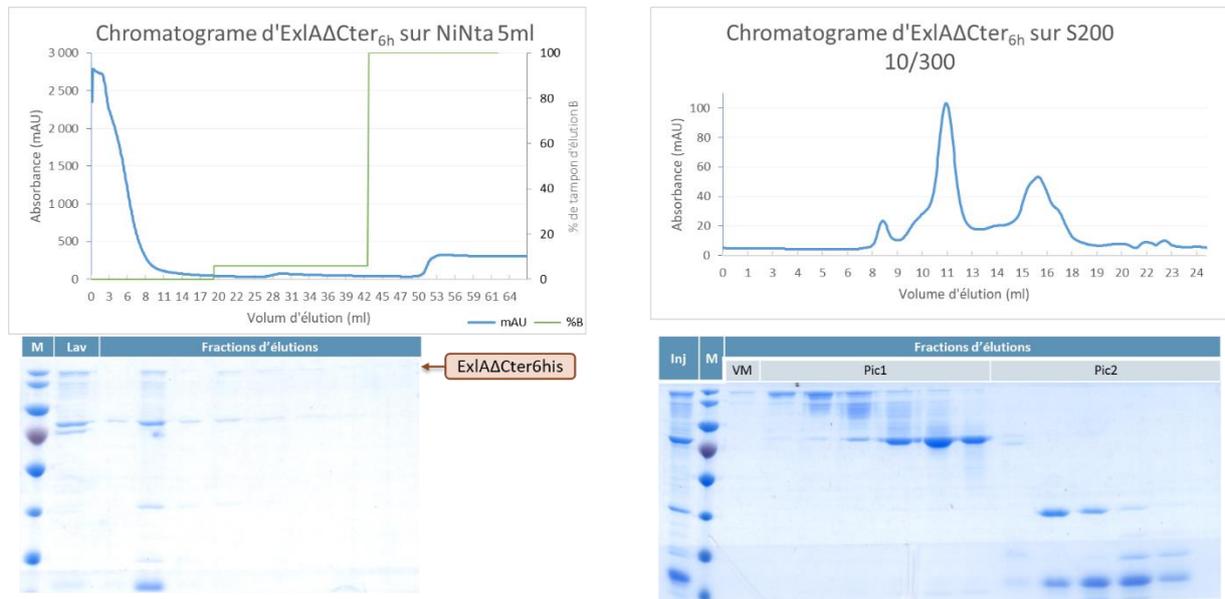


FIGURE 44 : Purification de la protéine ExlA Δ Cter6his. A gauche, profil d'élution de colonne de nickel de la protéine d'intérêt. En dessous, SDS-PAGE correspondant à l'élution de la colonne. Lavage = protéines éluées durant le lavage de la colonne. Il est possible de voir qu'un contaminant présent aux alentours de 75 kDa est co-purifié avec la protéine entière. A droite, profil d'élution de colonne d'exclusion stérique S200 10/300 et SDS-PAGE associé. VM = volume mort de la colonne, il s'agit du pic à 8 ml. Pic1 = pic entre 10 et 13 ml. Pic2 = pic entre 15 et 18 ml. Plusieurs espèces sont séparées par la colonne et sont probablement des produits de dégradation.

Après expression et purification il a été possible de voir que cette construction se dégradait toujours. Sur le gel résultant de la colonne d'exclusion par la taille, une espèce dégradée d'ExlA Δ Cter6his semblait être présente en quantité supérieure aux autres espèces dégradées (vers 75 kDa). Cette protéine a été isolée et analysée en séquençage N-terminal et en spectrométrie de masse (Plateforme du PSB) afin de pouvoir isoler un possible domaine stable. La spectrométrie de masse a identifié des espèces de 74 kDa mais le séquençage N-terminal ne fut pas concluant ce qui n'a pas permis l'identification de ce domaine.

IV.1.1.3. Création du clone ExIA Δ CterCcoil :

Un dernier clone a été expérimenté à partir d'un autre allongement de la séquence en N-terminal. De manière intéressante, les motifs β -hélices ont tendance à s'agréger s'ils ne sont pas correctement terminés. En effet, une terminaison prématurée du motif expose au solvant son cœur hydrophobe. Certains domaines courts sont alors connus pour servir de terminaison à ces domaines β -hélices [167]. Dans la séquence de ExIAFL, une séquence coiled-coil est prédite en N-terminal de la séquence de ExIA Δ Cter. Inclure ce domaine dans la construction servirait potentiellement de domaine terminateur pour ExIA Δ Cter. Ce clone, nommé ExIA Δ CterCcoil a été construit à partir du clone ExIAFL, et l'expression et purification de la protéine ont été faits comme expliqué pour les autres constructions.

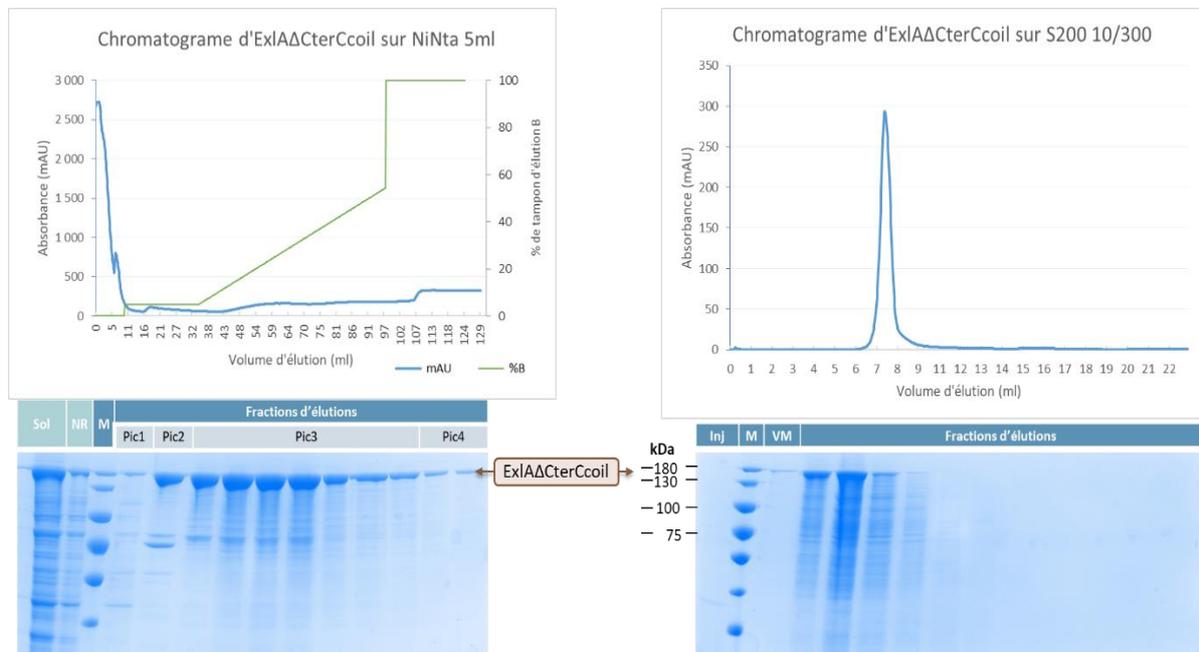


FIGURE 45 : Purification de la protéine ExIA Δ CterCcoil. A gauche, profil d'élution de la protéine sur colonne d'affinité au Nickel et SDS-PAGE associé. Sol= fractions des protéines solubles après centrifugation du lysat cellulaire. NR= protéines non-retenues sur la colonne. Pic1 correspond au pic de lavage à 16 ml. Pic2 correspond au pic à 48 ml. Pic 3 correspond au pic à 86 ml et pic 4 correspond au pic à 115 ml. La protéine est bien exprimée et retenue sur la colonne. A droite, profil d'élution d'ExIA Δ CterCcoil sur colonne d'exclusion stérique S200 10/300 et SDS-PAGE associé. Il est possible de voir qu'un seul pic est élué au volume mort de la colonne indiquant que la protéine s'est agrégée.

Il est possible de voir que comme précédemment, après expression et purification, cette construction est tout même dégradée. Cependant, son expression dans les mêmes conditions que précédemment a entraîné la production d'une plus grande quantité de protéine. Ceci était encourageant, et a indiqué que la protéine était mieux exprimée ou plus

stable et donc moins dégradée par la bactérie. En revanche, cette protéine était éluée dans le volume mort de notre colonne d'exclusion par la taille, indiquant qu'elle s'est agrégée.

IV.1.2. Caractérisation de la protéine ExIA-FL :

Une élongation du clone ExIA Δ Cter serait encore inutile puisqu'il reviendrait à travailler quasiment sur le clone ExIAFL. Nous avons donc décidé de travailler directement sur le clone complet d'ExIA. Considérant les problèmes récurrents de dégradation encourus, il a été décidé d'éviter l'expression en bactéries pour essayer d'exprimer la protéine en Cell-free, ce qui avait déjà fonctionné au préalable pour ExIA Δ Cter. Cependant, après clonage en pIVEX 23 et 24 et expression, un Western blot anti ExIA sur l'extrait de cell-free a indiqué que la protéine exprimée était tout de même dégradée. Ceci a pu être dû à l'expression cell-free, ou le ribosome peut se décomplexer de l'ARN et induire une transcription abortive car le gène est relativement long puisqu'il induit l'expression d'une protéine de 170 kDa. De plus, lors de sa production, une grande partie de la protéine produite s'est retrouvée non soluble ou ne s'est pas liée à la résine Nickel. Nous avons donc cherché à stabiliser la protéine entière en ajoutant des détergents, nanodisques ou liposomes dans le mélange réactionnel, le but ici étant d'utiliser ces additifs pour stabiliser les protéines entièrement exprimées. En effet, ExIA Δ Cter interagissant avec les membranes, il était possible d'imaginer qu'elle s'insérerait dans les lipides via son domaine C-terminal ce qui l'empêcherai d'être dégradée par cette extrémité. Il serait ensuite possible de séparer les protéines actives et fonctionnelles étant potentiellement entières des contaminants issus de dégradation en purifiant les liposomes, détergents et ou nanodisques (emportant avec eux les protéines ExIA fonctionnelles).

IV.1.2.1. Utilisation de la méthode Cell-Free pour exprimer le ExIA-FL en détergents :

Des expériences préliminaires ont été faites par Lionel Imbert, responsable de la plateforme Cell-Free du PSB, afin de vérifier que la construction ExIA-FL était bien exprimée et pour déterminer quels détergents pouvaient solubiliser la protéine. A partir des meilleurs résultats, nous avons augmenté la quantité de réaction pour vérifier avec un Western-blot anti-ExIA la qualité de l'expression et la solubilité des conditions testées.

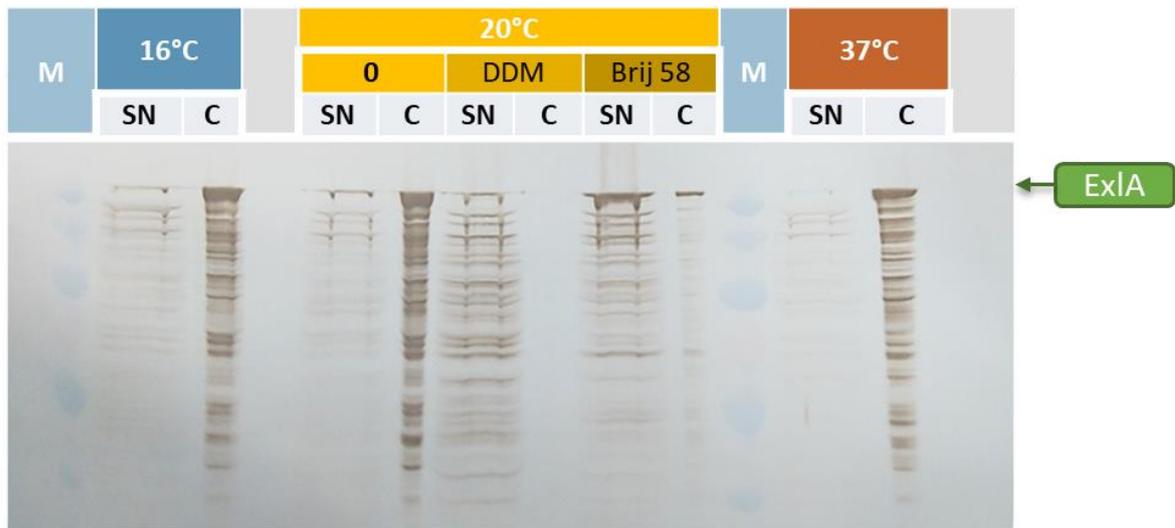


FIGURE 46 : Western-Blot anti-ExIA sur les réactions d'expression de Cell-Free avec ExIA-FL. Les fractions ont été centrifugées et le culot et le surnageant sont comparés en fonction des conditions d'expression, à 16°C, à 20°C et à 37 °C. L'ajout de détergent a été testé à 20°C. Sn= Protéines solubles après centrifugation, C= protéines insolubles après centrifugation. Les détergents aident à la solubilité de la protéine ExIA-FL.

Sur ce Western-blot anti ExIA, il est d'abord possible de constater la présence de nombreuses bandes de taille plus faible que la protéine entière, indiquant que la protéine exprimée, encore une fois, était dégradée. En outre, faire la réaction de Cell-free à 16 °C, 20 °C ou 37 °C sans détergent n'a pas permis de solubiliser la protéine ExIA-FL. A l'inverse, l'ajout de Brij 58 (50 CMC) ou de DDM (10 CMC) a entraîné le déplacement de la protéine des fractions insolubles vers les fractions solubles. Le Brij 58 notamment semblait solubiliser une grande partie de la protéine ExIA-FL produite. Cependant, lors de l'étape de purification par affinité au Nickel, (les protéines étant taguées-histidine) le changement de détergent pour du DDM 2 CMC a entraîné une précipitation de l'échantillon sur les billes de résine au Nickel. Nous avons donc essayé de changer les détergents pour des liposomes. Normalement, le domaine C-terminal étant présent, la protéine devrait interagir avec. Il s'agissait, là aussi, d'un moyen de séparer la protéine complète interagissant avec les liposomes de la protéine dégradée sans C-terminal.

IV.1.2.2. Utilisation de la méthode Cell-Free pour exprimer le ExIA-FL avec des liposomes :

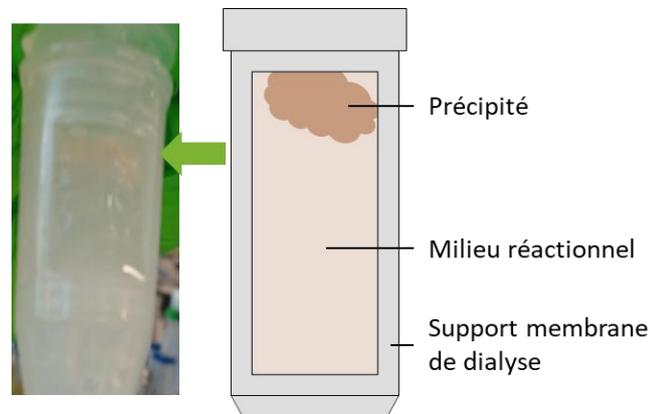


FIGURE 47 : Présence d'un précipité après expression d'ExIAFL en Cell-Free avec ajout de liposomes. Le milieu visible est le mix de réaction contenu dans une membrane de dialyse GEBAFLEX. Un précipité est visible et schématisé par le nuage.

Nous avons donc ajouté des liposomes à 1 mg/ ml dans le mélange réactionnel de Cell-free. A la fin de la réaction, il était possible de voir qu'un précipité floconneux était apparu (voir Figure 47). L'ensemble de la réaction a été centrifugé et le culot a été repris dans du tampon contenant du DDM 0.08%. L'échantillon a été centrifugé à nouveau. Le gel (Figure 48) indique que la majorité de la protéine était toujours dans le culot après re-suspension avec du détergent, mais une infime partie de la protéine ExIA-FL était soluble. Nous avons donc tenté de purifier cet échantillon avec une colonne d'affinité au Nickel.

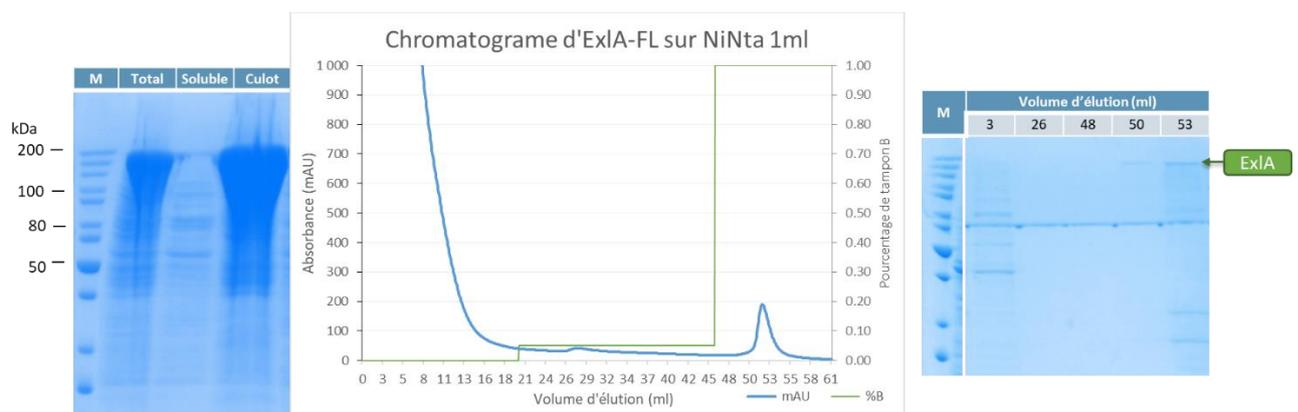


FIGURE 48 : A droite, SDS-PAGE des échantillons de la réaction de Cell-Free. Le total correspond à la totalité de l'échantillon récupéré. La fraction soluble est la fraction soluble obtenue après re-suspension et centrifugation de l'échantillon. Le culot est la fraction de protéine obtenues dans le culot après re-suspension avec détergent et centrifugation. Le chromatogramme d'éluion d'ExIA-FL sur colonne de Nickel est présenté ici. A droite, SDS-PAGE associé à la chromatographie d'affinité.

Comme il est possible de voir dans la Figure 48, la protéine ExIA-FL a été éluée en détergent de la colonne de Nickel. Une petite quantité était visible mais nous avons continué la purification avec une colonne SEC pour caractériser le comportement de l'échantillon en solution.

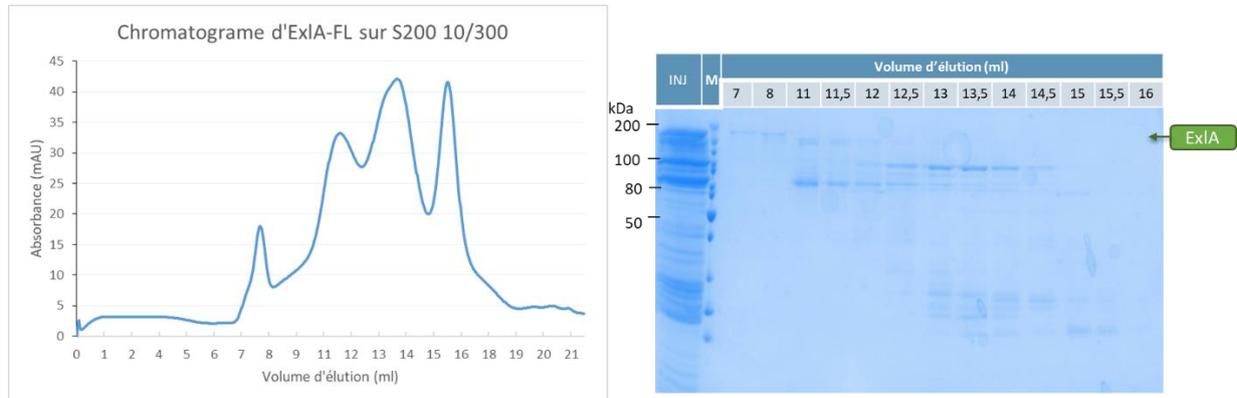


FIGURE 49 : Chromatogramme sur colonne SEC de l'échantillon ExIA-FL en détergents. A gauche, SDS-PAGE associé.

L'échantillon injecté dans la colonne d'exclusion contenait de nombreux contaminants. La colonne a été capable de séparer certaines espèces, mais la protéine la plus intéressante pour nous était l'espèce ExIA-FL (170kDa) qui a été éluée dans le volume mort de la colonne, indiquant sa probable agrégation.

L'ajout des différents additifs n'a pas permis de réduire la dégradation ni d'augmenter la solubilité de d'ExIA-FL. Ces expériences ont été faites à la fin de ma thèse. Le temps a manqué pour essayer de les améliorer. Cependant, nous avons pu travailler sur ExIA-FL et ExIAΔCter à partir d'autres échantillons, comme décrit ci-dessous.

En effet, ExIA-FL a pu être purifiée par Antoine Maillard du groupe d'Ina Attree à partir des corps d'inclusion et à partir du sécrétome de *P. aeruginosa*. La protéine est stable dans l'urée et est active lorsque l'urée est diluée de la même manière que pour ShIA, une toxine similaire [151]. ExIAΔCter a été aussi purifiée par Viviana Job du groupe d'Ina Attree en utilisant de nombreuses itérations de colonne d'exclusion par la taille. Cependant la protéine n'était pas stable au cours du temps, puisque à chaque itération de colonne, une portion du pic correspondant à la protéine soluble se déplaçait vers les pics élués au volume mort, correspondant aux protéines agrégées. Des échantillons compatibles avec des expériences de biophysique ont quand même été purifiés en utilisant ces stratégies.

IV.2. Caractérisation de ExIA-FL et de ExIA Δ Cter en solution :

Ensuite nous avons voulu reproduire les expériences de SAXS précédentes mais cette fois avec les deux échantillons ExIAFL et ExIA Δ Cter. Le SAXS est une technique très utile pour caractériser les échantillons en solution mais elle est très sensible à l'agrégation qui peut se produire avec les protéines. L'une de nos protéines, ExIA Δ Cter, avait une forte tendance à s'agréger au cours du temps. Il a donc été décidé de suivre le protocole SEC-SAXS pour éviter toute possibilité de gêner les mesures avec des agrégats. Pour la construction ExIAFL, la protéine a pu être purifiée en très petite quantité depuis le surnageant de *P. aeruginosa*. Le protocole de SEC-SAXS a donc été impossible à suivre car la dilution durant la colonne SEC risquait d'empêcher la mesure en diluant la protéine sous le seuil de détection. Cependant les expériences ont pu être effectuées correctement pour ExIA Δ Cter, et les données traitées sont présentées ci-dessous.

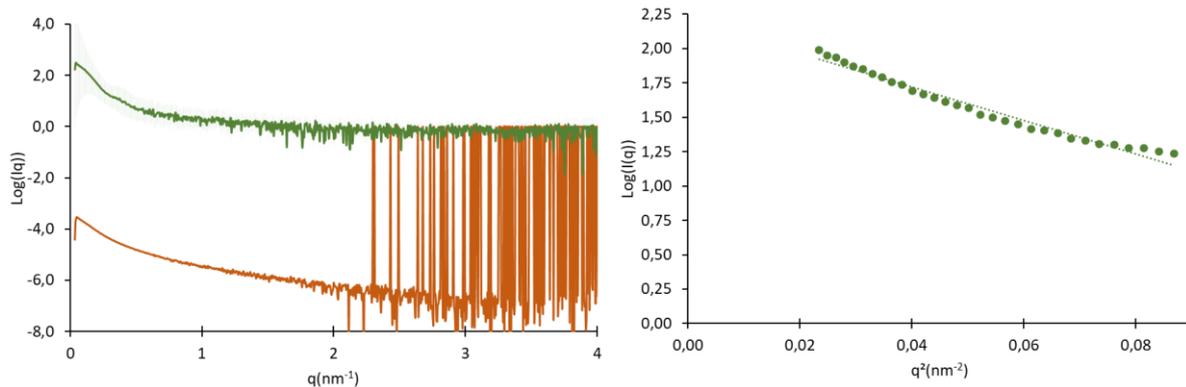


FIGURE 50 : Résultats du SAXS et du SEC-SAXS pour ExIAFL et ExIA Δ Cter. ExIA FL est présentée en vert et ExIA Δ Cter en orange. A droite, sur les courbes brutes, il est possible de voir qu'ExIA Δ Cter n'est pas assez concentré pour donner un signal permettant d'interpréter les résultats. La courbe d'ExIA-FL en revanche donne un signal correct. Cependant, comme il est possible de le voir avec le Guinier plot à droite, les points ne s'alignent pas avec la droite linéaire ce qui indique une agrégation de l'échantillon. Les données sont donc inutilisables, ces deux échantillons ne semblent pas compatibles avec le SAXS.

Les données de diffusion pour ExIA Δ Cter sont présentées en orange. Il est possible de voir sur le graphique représentant les courbes de diffusion brute que le signal des données est faible et bruité. Ceci est dû à la dilution de l'échantillon durant l'expérience de SEC-SAXS qui rend les données inutilisables. Une grande partie de la protéine était alors éluée dans le volume mort de la colonne indiquant qu'elle s'est agrégée. Pour la protéine ExIAFL, la courbe de diffusion brute est indiquée ici en vert. Cette courbe a été obtenue à partir de l'échantillon le plus concentré d'une série de dilution successives. Les autres dilutions n'ont pas donné un signal de diffusion suffisamment important contrairement à cette courbe qui semblait donner un signal suffisant pour pouvoir traiter les données. Cependant, comme on peut le voir le

Guinier plot, les données forment une légère parabole qui ne s'aligne pas avec la courbe de tendance linéaire de ces données indiquant une agrégation de l'échantillon. [145]

IV.3. Caractérisation de ExIA-FL et de ExIA Δ Cter avec un environnement lipidique :

IV.3.1. Caractérisation de l'interaction avec les liposomes par gradient de sucrose :

Ces échantillons ne semblaient pas être optimaux pour être utilisés avec le SAXS. Cependant, nous avons continué notre étude avec la protéine ExIAFL purifiée depuis les corps d'inclusion car la purification depuis le sécrétome entraînait une agrégation de la protéine. Pour comparer l'activité des constructions ExIAFL et ExIA Δ Cter à la construction ExIACter les expériences de flottaison de liposomes sur gradient de sucrose ont été reproduites. Les résultats sont présentés ci-dessous.

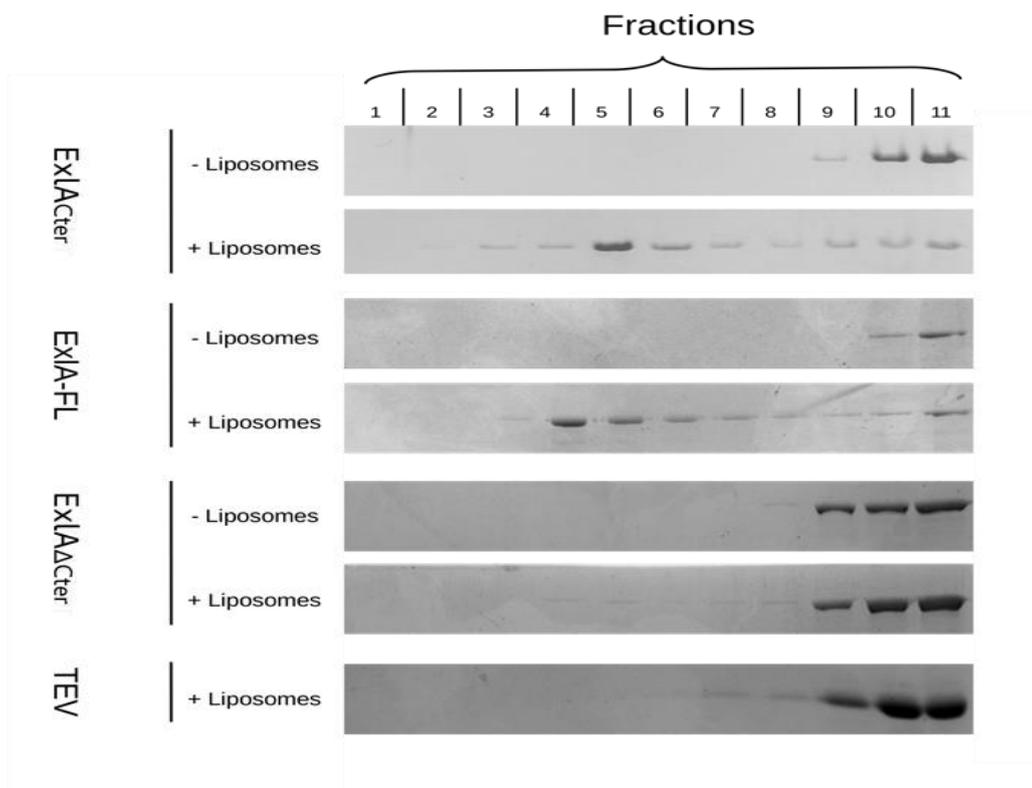


FIGURE 51 : Flottaison de liposomes avec les différentes constructions d'ExIA. Même expérience que précédemment mais avec toutes les constructions cette fois. Il est possible de voir que la migration de la protéine avec les liposomes ne se fait que si le domaine C-terminal est présent, indiquant que c'est bien ce domaine qui est responsable de l'interaction avec les lipides. La TEV (Tobacco Etch virus protease) sert de contrôle car elle ne lie pas les liposomes.

Comme attendu, ExIA Δ Cter ne semblait pas interagir avec les liposomes, puisque que sa migration était similaire dans les conditions avec et sans liposomes. Par contre, ExIAFL a bien interagi avec les liposomes puisque la protéine a migré vers le sommet du gradient lorsque les liposomes ont été ajoutés au gradient. L'interaction avec les lipides ne se fait donc que si le domaine Cter est présent dans la construction, prouvant à nouveau que ce domaine est bien responsable de l'interaction d'ExIA avec lipides. Nous avons donc continué à travailler avec ExIA-FL pour déterminer son mécanisme d'action sur les bicouches lipidiques.

IV.3.2. Caractérisation de l'interaction d'ExIA-FL avec des bicouches lipidiques par AFM :

De la même manière que pour ExIACter, l'AFM disponible en collaboration avec Jean-Luc Pellequer et Jean-Marie Teulon a été utilisée pour visualiser l'effet d'ExIA entière sur une bicouche lipidique. La protéine utilisée a été produite de la même manière que celle utilisée pour le test de flottaison des liposomes sur gradient de sucrose. Cette protéine étant purifiée en 6 M Urée, il a fallu diluer l'échantillon pour pouvoir l'utiliser, d'une part pour induire son repliement mais aussi pour ne pas détériorer les bicouches lipidiques avec l'urée. La concentration en protéine était donc limitée pour cette expérience, car la protéine a subi le même facteur de dilution que celui de l'Urée. Après dilution de la protéine sur les bicouches lipidiques, des images ont été enregistrées en permanence pour obtenir une cinétique d'action d'ExIAFL. Les images ainsi enregistrées sont présentées ci-dessous.

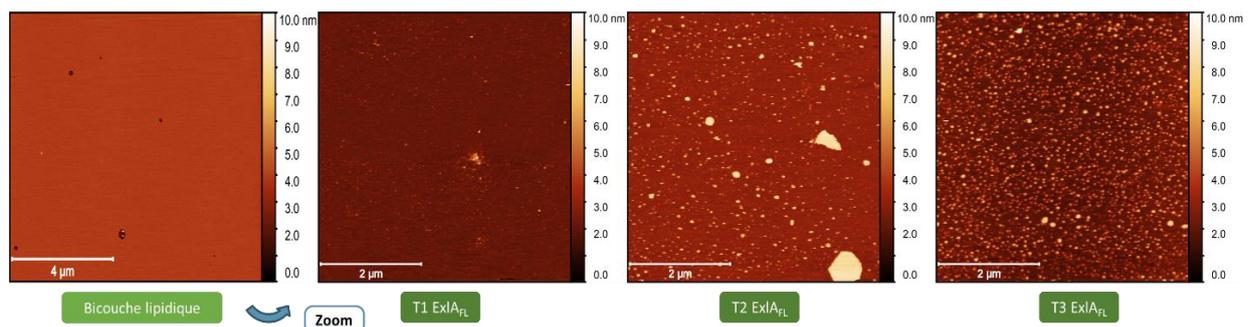


FIGURE 52 : Interaction d'ExIA-FL avec les bicouches lipidiques en AFM au cours du temps. A gauche, image de la membrane avant exposition avec ExIA-FL. Ensuite les images ont été prises à différents temps pour vérifier l'activité de la protéine sur la membrane. T1= 20 minutes, T2= 45 minutes et T3 = 90 minutes. Il est possible de voir une augmentation de l'aspérité de la membrane au cours du temps.

Sur ces images, les objets qui dépassent de la membrane (apparaissant comme des points blancs) devenir de plus en plus nombreux. Ces points blancs pourraient être dus à la protéine qui s'insérerait au cours du temps dans la membrane mais peuvent aussi dus à la

membrane qui se désagrègerait. L'ajout de la protéine a bien entraîné une modification de la membrane mais l'échelle de temps était beaucoup plus lente que pour ExlA Δ Cter (l'image T3 d'ExlAFL correspondant à 1h30 d'incubation avec la protéine). Cependant, malgré l'utilisation de la protéine entière, aucun trou ou pore dans la membrane n'était clairement observable après 1 heure 30 d'incubation. Néanmoins, ce résultat semblait indiquer que ExlAFL était capable d'interagir avec les bicouches lipidiques.

IV.4. Conclusion concernant les constructions ExlA-FL et ExlA Δ Cter :

Les protéines ExlA-FL et ExlA Δ Cter sont des échantillons difficilement manipulables. Ces deux protéines ont tendance à s'agréger ou à se dégrader. Pour éviter ce phénomène potentiellement dû à la manipulation *in vitro*, nous avons voulu nous rapprocher un peu plus du contexte biologique et nous servir du partenaire ExlB afin de voir si, comme pour ShlA, cela permettrait d'améliorer le repliement de la protéine ExlA. De plus, aucune observation structurale préalable n'avait été faite sur un système SST5b complet comprenant TpsA et TpsB ensemble.

V. Utilisation d'ExlB :

V.1. Expression des deux protéines ExlA et ExlB en Cell-Free :

Comme montré précédemment, l'agrégation et la dégradation de la protéine ExlA a été un problème récurrent pendant cette thèse. J'ai essayé de me rapprocher encore du contexte biologique en exprimant cette fois la totalité de l'opéron, à savoir ExlA-ExlB. Cette décision a été prise à cause de deux informations intéressantes. D'une part, il est possible que le passage de ExlA à travers ExlB permettrait le repliement correct du partenaire TpsA. En se basant sur ShlA, ou la présence du ShlB permet de rendre actif ShlA qui a été purifiée à partir du périplasma de cellules n'exprimant pas ShlB [151]. La présence de ExlB permettrait donc d'augmenter la stabilité d'ExlA. Le deuxième point a été prouvé par Alice Berry durant sa thèse au PBRC dans l'équipe d'Ina Atree. En digérant avec des protéases des culots de bactéries non lysées, il a été possible de voir que ExlA était digérée à la surface des bactéries (non publié). De plus, ExlA ne serait sécrétée qu'après diminution du c-di-GMP bactérien [168]. Ceci suggère que ExlB et ExlA pourraient interagir dans le périplasma bactérien et que ExlA pourrait être accessible à l'extérieur de la bactérie.

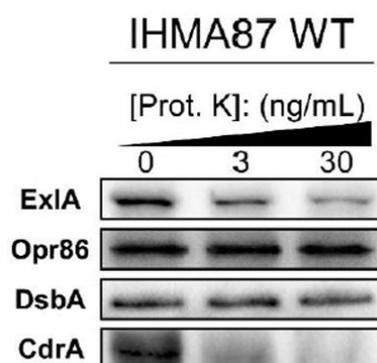


FIGURE 53 : Avec la courtoisie d’Alice Berry. Western-blot sur culot bactérien de souche IHMA87 traités à la protéinase K. Opr86 est une protéine présente dans la membrane externe. DsbA est une protéine périplasmique et CdrA est une protéine présente à la surface bactérienne. Il est possible de voir qu’après traitement des culots à la protease, ExIA subit le même sort que CdrA. La protéine est donc présente en surface des cellules.

L’idée a donc été d’exprimer les deux protéines en Cell-free avec ajout de liposomes, pour purifier le potentiel complexe. L’intérêt de l’expression des deux protéines aurait été de pouvoir « pêcher » la protéine ExIA complète en purifiant ExIB depuis les liposomes. Il aurait alors été possible de récupérer des informations structurales sur ce complexe en utilisant la cryo-microscopie électronique ou la cristallographie rayons-X avec cristallisation en LCP.

La séquence de la protéine ExIB a été clonée depuis le plasmide contenant l’opéron vers un pIVEX24. Les deux protéines ont ensuite été coexprimées en Cell-free avec ou sans liposomes et détergents.

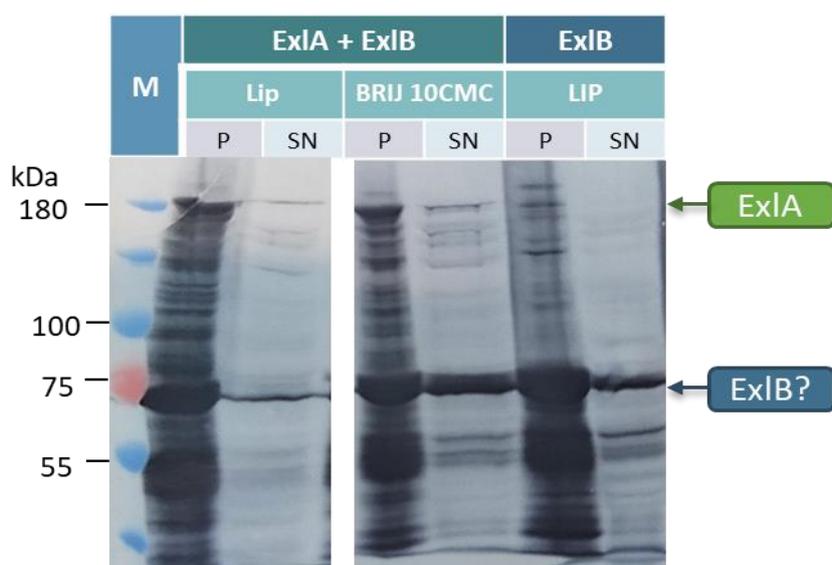


FIGURE 54 : Western-Blot anti-histidine sur les tests d’expression en cell-free. Les réactions ont été réalisées en batch et ensuite centrifugées. Le culot et le surnageant ont été déposés sur gel pour être analysés en Western-blot.

D'après les résultats, après séparation du culot d'expression Cell-free du surnageant par centrifugation, il semblerait que les deux protéines étaient bien exprimées. La condition d'expression avec 10 CMC de Brij 58 semblait prometteuse, car une partie d'ExIA semblait soluble. Il est aussi à noter la présence d'ExIB dans le surnageant indiquant que la protéine est bien exprimée et soluble. Evidemment ceci est préliminaire et demande à être amélioré mais les expériences ont été réalisées à la fin de ma thèse ce qui ne m'a pas laissé le temps de les finaliser. Cependant, ces données semblent prometteuses pour la suite du projet.

V.2. Expression de la protéine ExIB en bactéries :

En parallèle à l'expression Cell-Free, nous avons essayé de purifier ExIB exprimée en bactéries recombinantes. Comme indiqué dans [151] ShIB purifié permet d'activer ShIA *in vitro*. Il aurait donc été intéressant de purifier ExIB à partir de la membrane externe bactérienne d'une part pour caractériser la protéine et d'autre part pour vérifier s'il était possible d'activer et améliorer le comportement d'ExIA *in vitro*.

L'expression a été faite à partir d'un clone fourni par A. Maillard du groupe d'Ina Attree. Il comporte un tag OMP qui permet d'envoyer ExIB à la membrane externe de la cellule exprimant. Les premiers tests de solubilisation ont été produits à partir de 20 ml de cultures *E. coli* de souche C43.

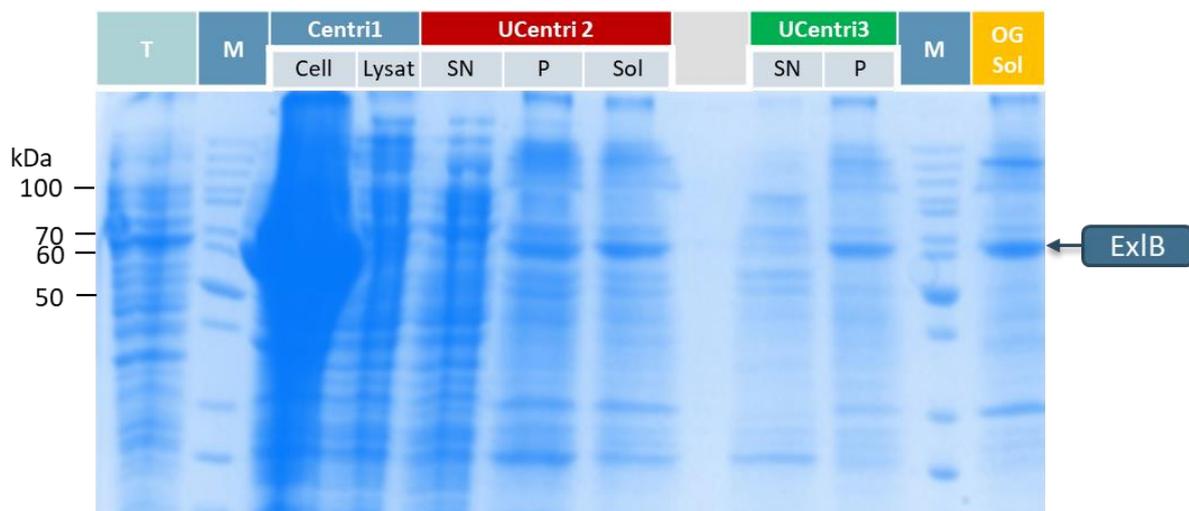


FIGURE 55 : SDS-PAGE de solubilisation différentielle d'ExIB. T= protéines totales exprimées par les cellules. La centrifugation 1 se fait après la lyse pour culoter les cellules non lysées. On peut voir que le culot cellulaire (cell) est chargé en protéines, indiquant que la lyse au sonicateur a été suboptimale. L'ultracentrifugation 2 a été produite à partir du lysat soluble pour séparer les membranes cellulaires des protéines solubles. Il est possible de voir que ExIB est avec les protéines membranaires culotées (P) et n'est plus dans la fraction des protéines solubles (SN). L'ultracentrifugation 3 a permis de séparer les protéines de la membrane externe (P) avec les protéines de la membrane interne bactérienne resolubilisée avec le sarkozyl (SN). ExIB est bien située avec les protéines de la membrane externe. On peut voir que ce culot repris avec du détergent OG contient bien la protéine.

Pour purifier ExIB depuis la membrane externe de la bactérie nous avons essayé de séparer les deux membranes bactériennes en les solubilisant différemment. Une première ultracentrifugation sur le lysat a permis de récupérer les portions de membranes dans le culot. Ce culot a été repris avec du Sarkozyl pour solubiliser uniquement les protéines de la membrane interne. Après une deuxième ultracentrifugation, il a été possible de récupérer les protéines de la membrane externe non solubilisées dans le culot. ExIB fait partie de ces protéines-là comme il est possible de voir sur la Figure 55. Ce culot a été repris dans du tampon contenant du détergent OG (Octyl Glucoside) (choisi pour purifier les tonneau- β , utilisé pour les Omp [169] et FhaC [118]) pour solubiliser ExIB et la purifier par affinité au Nickel. (Fig 55 et 56)

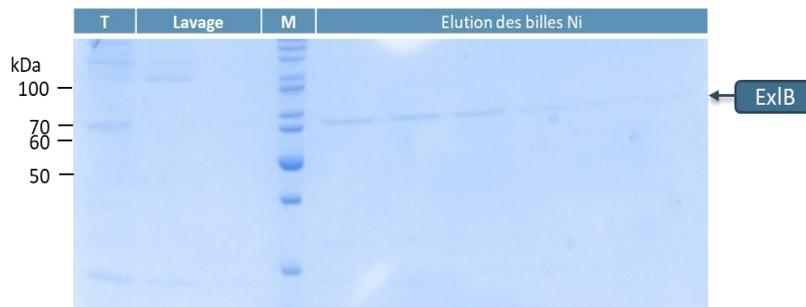


FIGURE 56 : SDS-PAGE de la fraction solubilisée en OG purifiée avec des billes d'affinité au Nickel. T = fraction totale. Le lavage contient les protéines non retenues par la colonne. L'élution contient bien ExIB, la protéine semble donc pouvoir être purifiée.

ExIB a donc été solubilisée par le détergent OG et est retenue sur billes de Nickel. Nous avons donc voulu aller plus loin et purifier la protéine sur un colonne SEC pour vérifier l'homogénéité de l'échantillon. Malheureusement, la protéine s'est agrégée lors de l'étape de concentration. Ce protocole peut être amélioré mais de la même manière que précédemment, ce sont des résultats obtenus à la fin de ma thèse. Une structure du transporteur d'ExIA aurait été un ajout intéressant pour aider à la compréhension du fonctionnement de ce type de toxine du SST5b.

VI. Informations supplémentaires faisant parties de l'article (en cours d'écriture) :

Les expériences qui seront présentées ci-dessous ont été réalisées par Viviana Job et Philippe Huber dans l'équipe d'Ina Attree.

VI.1. Lors de l'infection, ExlA est localisée avec les lipid-rafts des cellules eucaryotes :

L'expérience de flottaison différentielle a été réalisée sur des membranes de cellules préalablement infectées pour vérifier la position membranaire d'ExlA chez les cellules eucaryotes. Pour ce faire, des cellules épithéliales eucaryotes ont été infectées avec une souche de *P. aeruginosa* exprimant ExlA et ExlB. Les cellules ont alors été récupérées (et séparées des bactéries) et leurs membranes seront traitées avec des détergents pour être solubilisées. Les lipid-rafts (radeaux lipidiques) ont été identifiés originellement car ce sont des régions de la membrane plus résistantes à la solubilisation par détergent que la membrane elle-même [157][170]. On peut donc considérer qu'après traitement aux détergents, la partie membranaire majoritaire de la cellule ainsi que les protéines associées seront solubilisées par les détergents alors que l'autre partie composée par les lipid-rafts sera toujours sous forme de patch lipidiques. Ces membranes traitées sont déposées au fond d'un tube à ultracentrifugation et un gradient de sucrose est pipeté par-dessus. L'ultracentrifugation de l'échantillon sur ce gradient va entraîner la séparation entre les fractions lipid-rafts et les fractions solubilisées de la même manière que précédemment montré avec les liposomes. La présence de protéines d'intérêt est alors déterminée par Western-blot à partir des fractions du gradient. Les résultats de l'infection avec des bactéries exprimant ExlA-FL sont présentés ci-dessous.

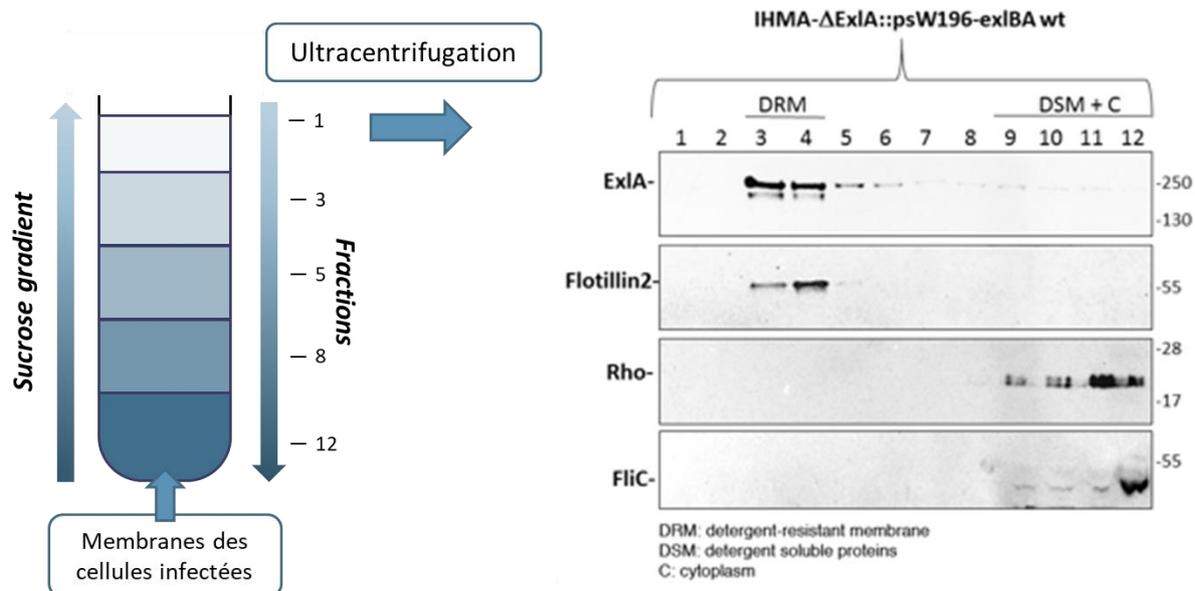


FIGURE 57 : Western-blot des fractions issues de l'expérience de flottaison différentielle. Sur le Western-blot, la présence des protéines est révélée par les anticorps spécifiques pour chaque protéine. La flotillin2 indique la localisation des lipid-rafts, la protéine Rho indique la localisation des protéines membranaires solubilisées par les détergents et FliC indique la position des protéines solubles. ExlA migre avec les fractions contenant les lipid-rafts indiquant qu'elle interagit préférentiellement dans ces régions-là.

Sur le Western-blot, il est possible de voir la localisation de quatre protéines. Trois de ces protéines sont des contrôles ; il y a d'abord la Flotillin2 qui est une protéine associée aux lipid-rafts, ensuite, la protéine Rho, qui est une protéine associée aux membranes mais n'est pas dans les lipid-rafts, et enfin la protéine FliC qui est sécrétée par la bactérie mais soluble.

On voit donc que d'une part, la protéine Rho associée aux membranes migre avec FliC et les protéines solubles indiquant qu'elle a été solubilisée par les détergents. En revanche, la Flotillin2 associée aux lipid-rafts migre différemment que la protéine Rho solubilisée par les détergents. Ceci nous permet de définir où sont situées les fractions contenant les lipid-rafts et les fractions contenant les membranes solubilisées.

Or, sur la Figure 57 ExlA migre sur le gradient aux mêmes fractions que la flotiline2, avec les lipid-rafts. ExlA serait donc associée aux lipid-rafts durant le processus d'infection des cellules de l'hôte.

Pour mieux caractériser l'interaction d'ExlA avec les lipid-rafts les cellules ont été traitées à la méthyl-β-cyclodextrine avant d'être infectées par les bactéries exprimant ExlBA. La méthyl-β-cyclodextrine est une molécule qui déstabilise les lipid-rafts en diminuant la quantité de cholestérol dans la membrane [171]. Des contrôles ont été faits et ont indiqué que l'addition de cette molécule n'a pas induit la mort cellulaire dans les conditions des expériences présentées ici. De la même manière, dans la Figure 58, l'ajout de méthyl-beta-

cyclodextrine (MbCD) ne diminue pas la toxicité induite par ExlA. Ceci indique que le mécanisme d'action toxique d'ExlA ne nécessite pas de cholestérol pour fonctionner.

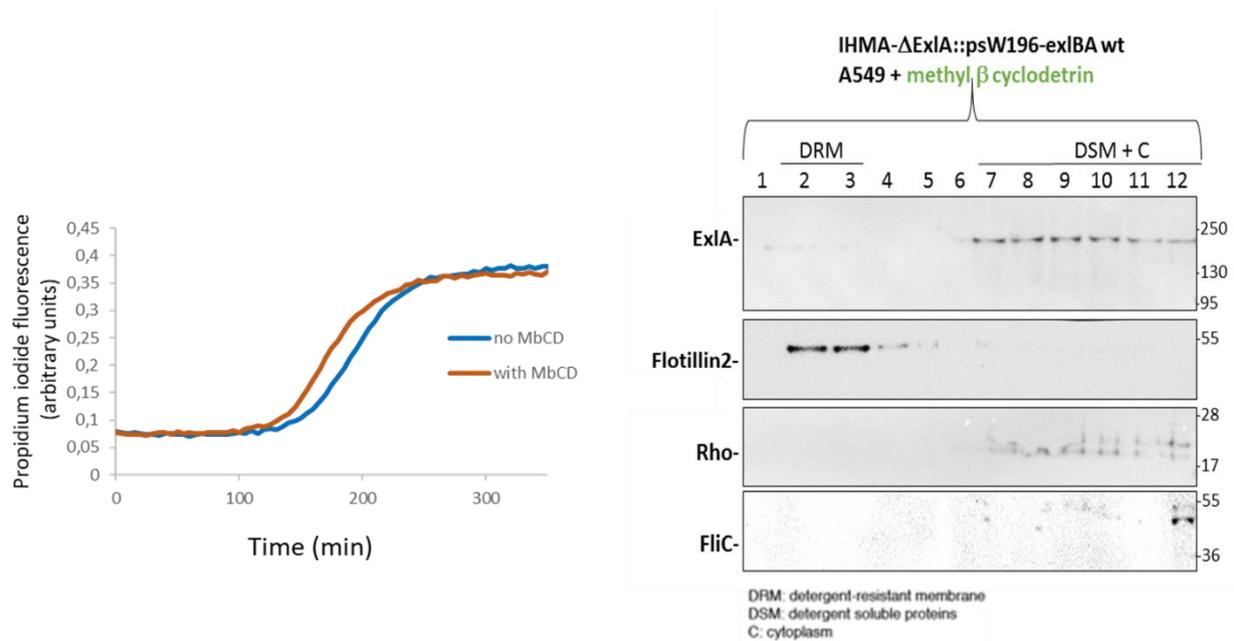


FIGURE 58 : A gauche, graphique indiquant l'incorporation de l'iodure de propidium dans les cellules eucaryotes infectées par des bactéries exprimant ExlBA au cours du temps. L'augmentation de fluorescence de l'iodure de propidium est un marqueur de la mort cellulaire. Il est possible de voir que le traitement des cellules avec la MbCD n'entraîne pas de changement de l'activité d'ExlA. À droite, Western-blot à partir des fractions du gradient réalisé sur les membranes de cellules infectées et traitées à la MbCD. Il est possible de voir qu'ExlA est relocalisée dans les fractions solubles après traitement à la MbCD des cellules.

Pour vérifier l'impact de la déplétion de cholestérol sur la localisation d'ExlA, l'expérience de flottaison différentielle sur les membranes des cellules eucaryotes a été reproduite sur les cellules traitées à la MbCD et infectées. La Figure 58 indique qu'après incubation des cellules à la MbCD, ExlA n'est plus localisée avec les lipid-rafts lors de l'infection. La flotillin2 était toujours présente au sommet du gradient ce qui indique que les lipid-rafts étaient toujours présents, mais la diminution de la quantité de cholestérol aurait pu les déstabiliser. Ceci a eu pour effet de délocaliser ExlA dans les régions membranaires solubilisées par les détergents.

Pour mieux comprendre l'implication du domaine N-terminal d'ExlA, cette expérience a été reproduite avec des bactéries n'exprimant que le domaine N-terminal de la protéine.

VI.2. Lors de l'infection, ExIA Δ Cter est aussi localisée avec les lipid-rafts :

De la même manière que précédemment, des cellules eucaryotes ont été infectées par des bactéries exprimant ExIB et ExIA- Δ Cter. Les membranes de ces cellules ont ensuite été solubilisées avec du détergent et séparées par centrifugation sur gradient de sucrose. Les résultats sont présentés ci-dessous.

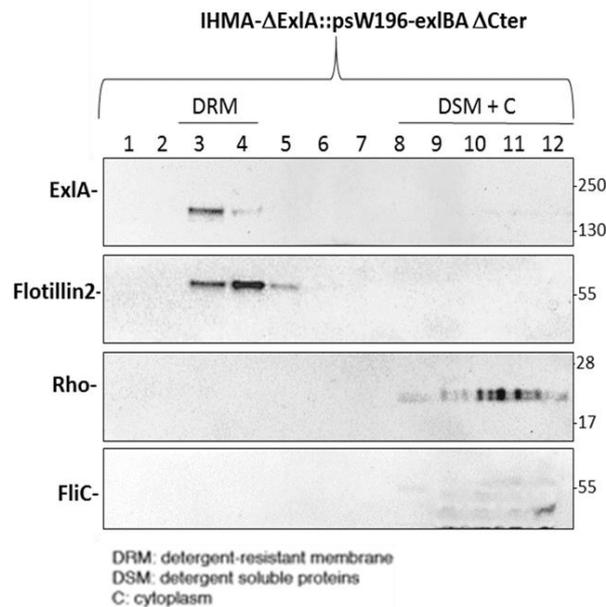


FIGURE 59 : Western-blot des fractions issus de l'expérience de flottaison différentielle. Il est possible de voir que ExIA- Δ Cter est localisée avec les lipid-rafts.

Il est possible de voir que lors de l'infection des cellules eucaryotes ExIA- Δ Cter est localisée avec les lipid-rafts. Ce résultat semble indiquer que le domaine N-terminal de la protéine est capable de se lier sur les membranes eucaryotes. Ce résultat est intéressant car nous avons montré au préalable que ce domaine-là de la protéine ne se liait pas aux liposomes. Il y a donc un phénomène supplémentaire qui se produit lors de l'infection *in vivo* et qui permet l'interaction du domaine N-terminal avec les membranes.

Ensuite, pour vérifier l'effet biologique de cette fixation sur la cellule du domaine N-terminal des courbes de mortalité sur des cellules infectées avec des bactéries exprimant ExIBA ou ExIBA- Δ Cter ont été mesurées. Les résultats sont présentés ci-dessous.

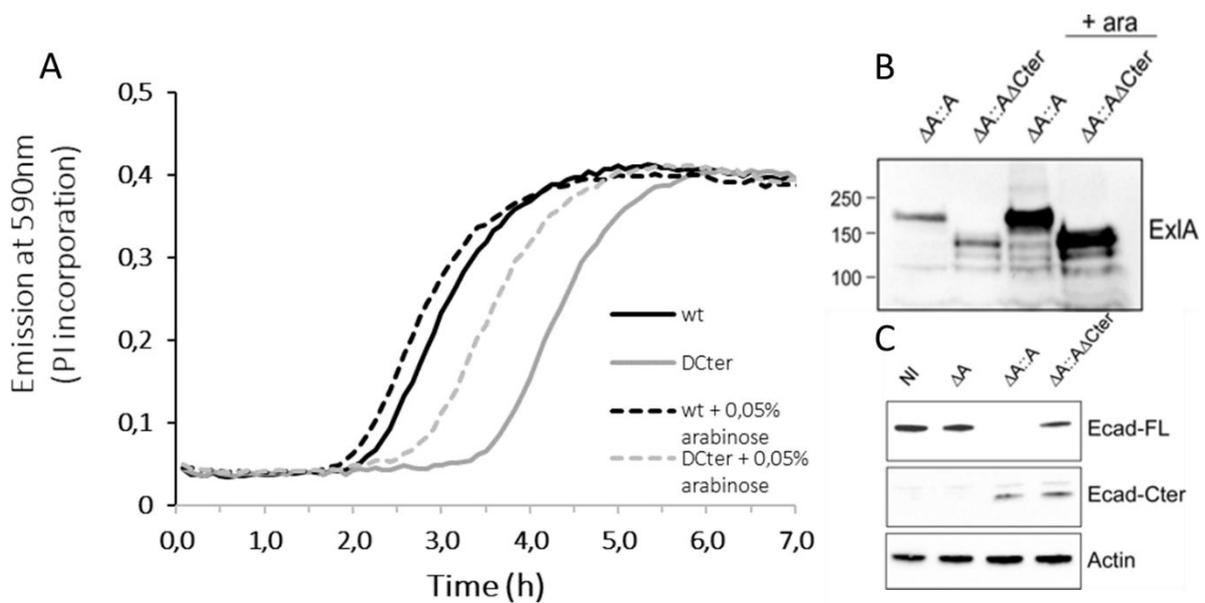


FIGURE 60 : A. Courbes de survies des cellules infectées par des bactéries exprimant ExIA ou ExIA- Δ Cter avec ou sans arabinose. L'incorporation d'Iodure de propidium (PI) est un témoin de la mort cellulaire. wt=bactéries exprimant ExIA. DCter=bactéries exprimant ExIA- Δ Cter. **B.** Western-Blot comparant les quantités d'ExIA sécrétées en fonction des conditions d'infection. $\Delta A::A$ = bactéries exprimant ExIA. $\Delta A::\Delta$ Cter bactéries exprimant ExIA- Δ Cter. On peut voir que les quantités produites entre les différentes bactéries sont similaires. Le domaine C-Terminal d'ExIA n'est pas requis pour la sécrétion. **C.** Vérification du clivage de E-Cadhérines chez les cellules infectées par les différentes bactéries.

Il est d'abord possible de voir sur la figure 60A que le domaine N-terminal est capable d'induire la mort des cellules eucaryotes comme en atteste l'augmentation de l'incorporation d'Iodure de propidium chez les cellules eucaryotes infectées par des bactéries exprimant ExIA- Δ Cter. L'échelle de temps à partir de laquelle la mort cellulaire est induite est néanmoins différente entre ExIA-FL et ExIA- Δ Cter suggérant un mécanisme d'action différent ou une activité ralentie.

De plus, les gènes codant pour les toxines ont été clonées dans un plasmide permettant la surexpression grâce à un promoteur arabinose. L'ajout d'arabinose au milieu durant l'infection est capable d'induire la surexpression des toxines ExIA et ExIA- Δ Cter (Figure 60.B) Or, la surexpression d'ExIA- Δ Cter chez la bactérie infectieuse est capable d'accélérer le phénomène de toxicité cellulaire. Ceci suggère que ExIA- Δ Cter aurait une activité dépendante de la concentration.

La figure 60C indique que le ExIA-FL et ExIA- Δ Cter sont toutes les deux capables d'induire le clivage des E-Cadhérines chez les cellules eucaryotes infectées. Pour ExIA le clivage des cadhérines est induit par l'influx de calcium dans la cellule eucaryote lui-même induit par la formation d'un pore à la membrane cellulaire. Chez ExIA- Δ Cter les E-Cadhérines sont aussi clivées mais ceci n'est pas dû à la formation de pore dans la membrane cytoplasmique. Il y

aurait donc une activité spécifique d'ExlA- Δ Cter différente de la formation de pore qui induirait le clivage des E-Cadhérines.

VII. Discussion sur un possible modèle d'action d'ExlA :

Le but de cette thèse était de mieux comprendre le mode d'action toxique d'ExlA de *P. aeruginosa*. De nombreuses informations ont été obtenues sur le mécanisme d'action de cette protéine au cours de cette étude. Pour établir un possible modèle d'interaction, il nous faut rassembler les informations obtenues tout au long de cet effort.

VII.1.1. Récapitulatif des informations sur le domaine C-terminal :

Commençons en premier avec les informations concernant le domaine C-terminal d'ExlA.

Nous avons pu définir avec les techniques de RMN et de SAXS que c'est un « molten-globule » en solution.

Grâce au lipid-strip, il a été déterminé qu'ExlA Δ Cter est capable de se fixer aux lipides à charge globale négative dont certains semblent être du côté intracellulaire de la cellule eucaryote. Cette action semble être similaire à ce qui est visible chez ShlA [128].

Comme il est possible de voir avec les expériences de flottaison sur gradient de liposomes, le domaine C-terminal d'ExlA semble être le médiateur de l'interaction de la protéine ExlA-FL avec des liposomes. Son action sur les liposomes entraîne la formation d'un précipité caractéristique.

Le test de protéolyse ménagée semblait indiquer que la protéine est en partie accessible aux protéases dans les liposomes.

Mais surtout, grâce à l'AFM, il a été possible de voir que cette protéine est capable de former des trous dans les membranes reconstituées. En AFM ces trous sont plus gros que ceux observés dans les liposomes mais cela peut être dû à la construction à laquelle il manque des domaines ou à l'expérience elle-même ou les bicouches lipidiques supportées ne subissent pas de pression latérale pour comprimer ces trous. Le deuxième cas impliquerait que le mécanisme de formation de pore d'ExlA ne soit pas dû à une structure rigide mais à une structure capable de varier en surface en fonction des pressions qu'elle supporte.

Comme il vient d'être expliqué, il est possible que des mécanismes d'actions aient été masqués par l'utilisation d'une seule partie de la protéine. Pour pallier à ce problème, nous avons décidé de caractériser l'effet de la protéine entière.

VII.1.2. Récapitulatif des informations sur ExlA entière :

L'expérience de flottaison des différents compartiments membranaires des cellules eucaryotes infectées a permis de déterminer qu'ExlA était localisée avec les lipids-raft durant l'infection.

Ensuite, avant l'infection par une souche exprimant ExlAB les cellules eucaryotes ont été traitées à la methyl- β -cyclodextrine. Cette molécule interfère avec la production de cholestérol diminuant ainsi la quantité présente dans les membranes. Les lipids-raft étant constitués en partie avec du cholestérol, ce traitement interfère avec leur formation en réduisant la quantité de cholestérol disponible. Or, il est possible de voir que lorsque les lipids-rafts sont moins présents, ExlA-FL est délocalisée dans la partie membranaire solubilisée en détergents. Il est à noter que des lipids-rafts sont toujours présents puisque la flotiline est toujours présente au sommet du gradient. Seulement il est possible que la diminution de quantité de lipids-rafts suffisent à décrocher ExlA ou alors délocaliser le récepteur d'ExlA et la protéine par la même occasion.

Enfin pour comprendre l'impact des différents domaines sur le fonctionnement de la protéine nous avons caractérisé la localisation et les effets durant l'infection de la protéine ExlA délété de son C-terminal.

VII.1.3. Récapitulatif des informations sur le domaine N-terminal :

Il a été très surprenant pour nous d'observer que le domaine N-terminal d'ExlA semblait être capable de se lier aux lipids-rafts des cellules. Ceci semblait aller à l'encontre de l'expérience de flottaison de liposomes avec les différentes constructions, ou ExlA Δ Cter ne s'est pas lié aux liposomes.

L'une des explications à ce phénomène pourrait venir du fait que les lipid-rafts sont des zones très riches en protéines eucaryotes, il se pourrait donc que la partie N-terminale d'ExlA soit la partie responsable de l'interaction avec un récepteur cellulaire. Ceci induirait la localisation d'ExlA sur la membrane cellulaire et plus précisément sur ce récepteur associé aux lipid-rafts, la localisant par la même occasion avec ces rafts.

En comparant ExlA à ShlA, pour qui le domaine N-terminal est défini comme interagissant avec la membrane nous pouvons conclure que ceci peut être le cas ici aussi. Le

fait que ce domaine n'interagissent pas avec les liposomes pourrait venir de la constitution de ces liposomes.

Une autre donnée surprenante a été obtenue lorsque nos collaborateurs ont vérifié l'activité des deux constructions sur une durée plus longue que celle de la première expérience (voir introduction). Ils ont été capables de voir que l'infection avec des bactéries exprimant uniquement le domaine N-terminal d'ExIA induisait aussi la mort cellulaire, mais sur une échelle de temps différente par rapport à la protéine entière. ExIA-FL induit la mort cellulaire en 2 h après infection alors que le domaine N-terminal d'ExIA induit la mort cellulaire plus lentement en 3 h 30. Il est intéressant de noter que cet effet peut être accéléré lors de la surexpression du domaine N-terminal d'ExIA. La diminution de l'effet d'ExIA Δ Cter peut donc être compensée par une augmentation de l'expression de la toxine.

ExIA-FL est responsable durant l'infection de l'induction du clivage des cadhérines cellulaire par ADAM10 [115]. Cet effet est aussi détecté avec le domaine N-terminal d'ExIA mais à un taux plus faible.

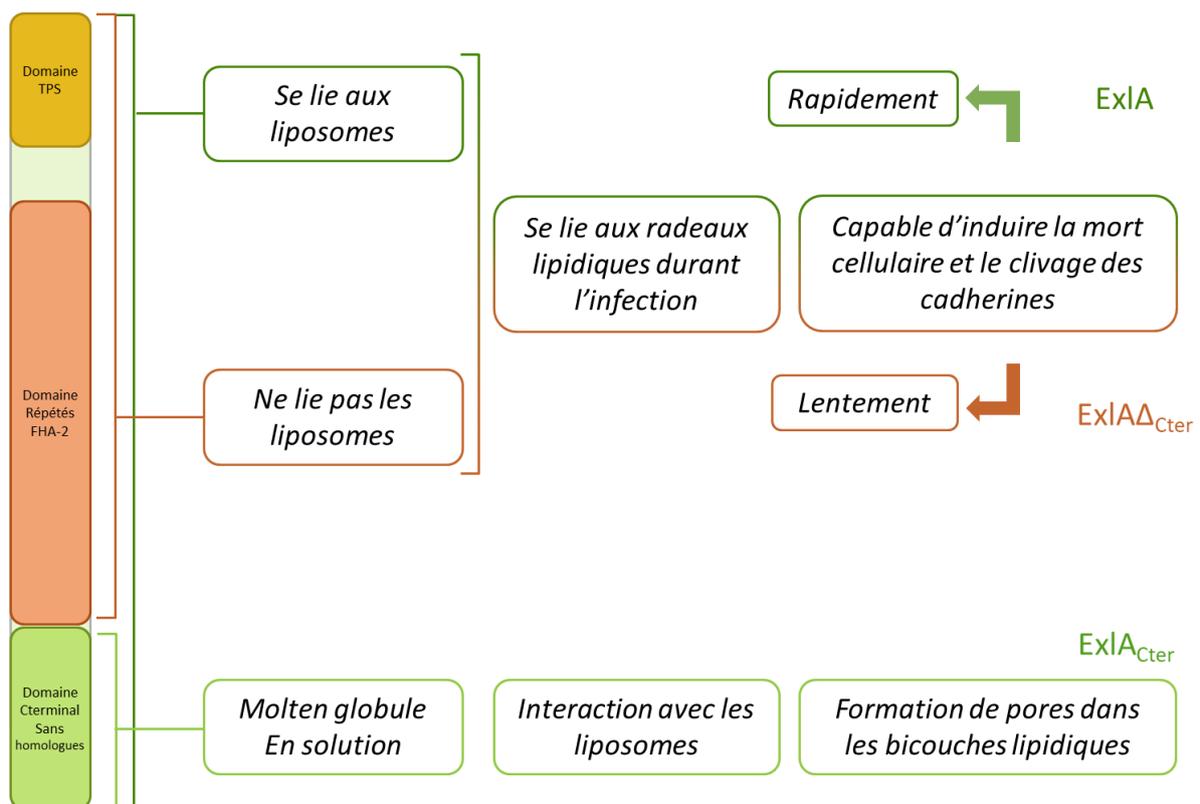


FIGURE 61 : Schéma récapitulatif des données obtenues sur ExIA en fonction des différentes constructions.

VII.1.4. Etablissement d'un possible mécanisme d'action :

Il semblerait donc que l'on observe deux cinétiques de toxicité ; ExIA agirait donc en deux temps à travers deux modes d'actions différents.

Or, pour CdiA, une protéine similaire à FhaB, un modèle d'action de domaine FHA-2 a été proposé [140]. CdiA est une protéine du SST5b, cependant elle est plus similaire à FhaB qu'à ExIA ou ShIA, ce qui fait que son mécanisme général d'action est différent. C'est une protéine de la famille des CDI (pour Contact-Dependent growth Inhibition). Ce sont des molécules qui sont présentes à la surface des bactéries les exprimant et qui sont capables d'inhiber la croissance de bactéries adverses par contact [140].

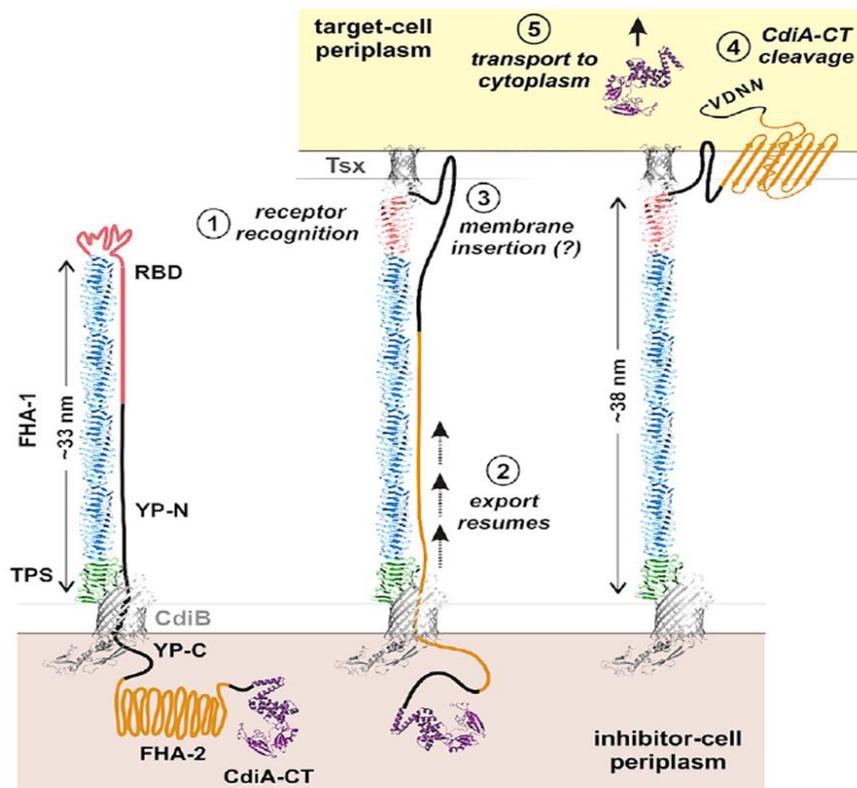


FIGURE 62 : Tiré de [140]. Modèle de fonctionnement de CdiA. CdiA est exporté à la surface de la cellule par son partenaire CdiB. CdiA contient des domaines spécifiques ; le domaine TPS, caractéristique des protéines du SST5b est présenté en vert, les régions FHA-1 sont présentées en bleu. Le RBD est le récepteur binding domain. La région YP est une région de la séquence riche en tyrosine et proline qui sert à garder le domaine FHA-2 et la toxine protégée dans le périplasme. (1). Lorsque le RBD reconnaît son récepteur cellulaire, il se replie, entraînant le passage de la région YT et (2) la reprise du transport de CdiA à travers son partenaire. (3). La région YT et la région FHA-2 s'inséreront dans la membrane et le domaine FHA-2 transloquera la toxine dans le cytoplasme de la cellule cible. (4). La liaison entre CdiA et sa toxine est clivée ce qui (5) relâche la toxine dans la cellule cible.

Comme pour FhaB, CdiA est une molécule allongée filamentaire, composée de divers domaines dont un domaine FHA-2. D'après les découvertes de cet article, il semblerait que les domaines FHA-2 soient capables d'adopter un repliement en feuillets- β dans la membrane cellulaire après liaison à un récepteur présent à la surface de la cellule [139]. Chez CdiA, ces domaines FHA-2 seraient capables de transloquer une toxine (située en C-terminal de la séquence des domaines FHA-2) directement dans la cellule cible [139].

En ayant connaissance de ce fonctionnement, il est possible d'extrapoler un mécanisme d'action pour ExlA. Il serait possible qu'après avoir interagi avec son récepteur, ExlA soit capable de se replier dans les membranes avec les domaines FHA-2 N-terminaux. Ces domaines FHA-2 permettraient le passage du domaine C-terminal du côté de la membranaire interne (comme pour CdiA) où il écarterait les membranes pour former un pore. La formation du pore induirait l'influx d'ions calcium qui entraîneraient la mort cellulaire par voie apoptotique (clivage des cadhérines). D'un autre côté, considérant que le domaine N-terminal est aussi capable d'induire le clivage des cadhérines, il est possible que son action sur le possible récepteur entraîne une activation de cette voie de signalisation intracellulaire.

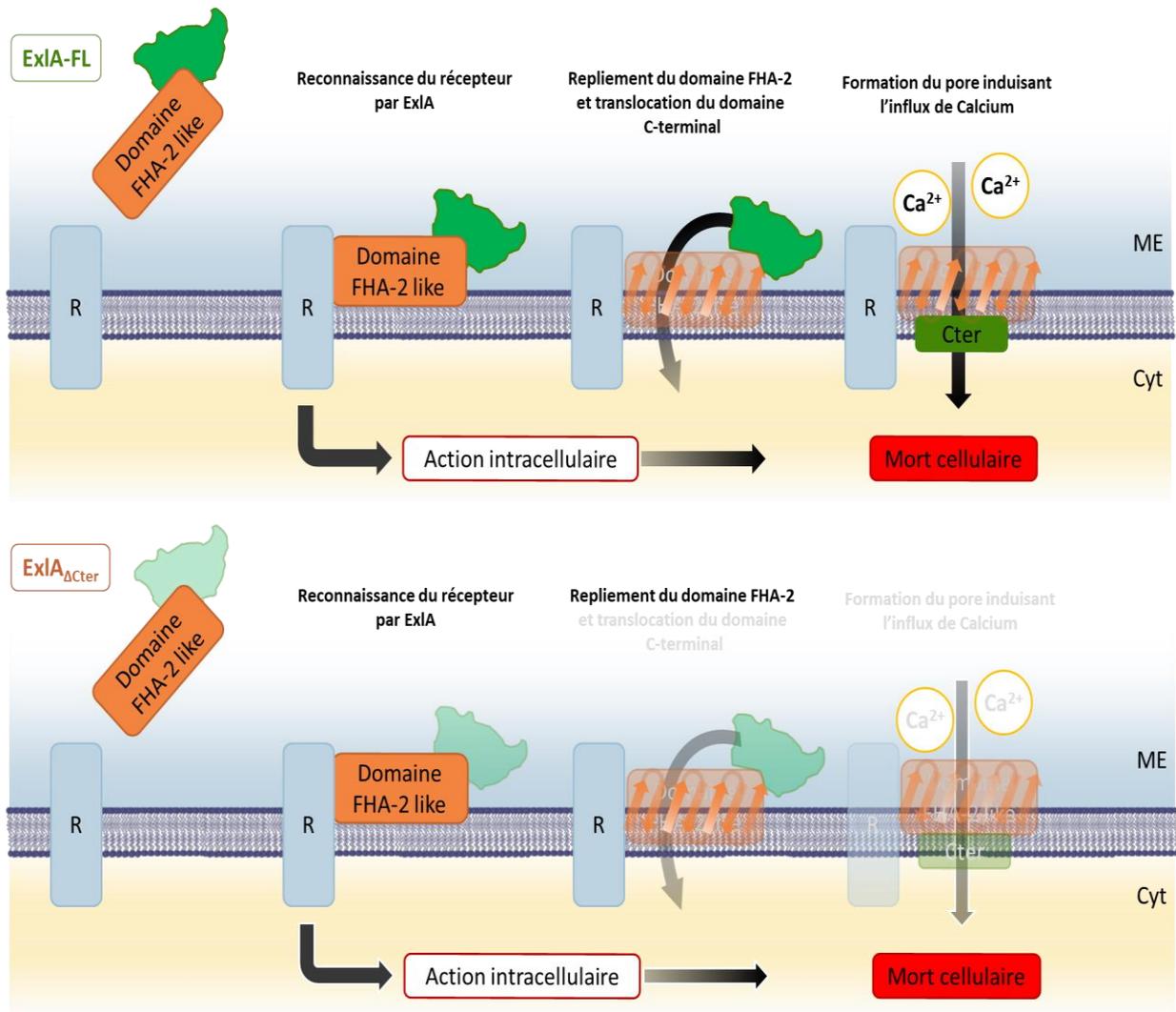


Figure 63 : Modèles des deux mécanismes d'actions envisagés pour ExlA-FL et ExlA Δ Cter. Le potentiel récepteur d'EXIA est représenté en bleu avec la mention R (Il serait présent dans les lipids-raft cellulaire). La membrane cytoplasmique est représentée par la bicouche lipidique violette. ME signifie milieu Extérieur et Cyt, cytoplasme. En haut est présenté le modèle d'action d'ExlA-FL. Le domaine N-terminal serait capable de reconnaître le récepteur d'ExlA. Ceci entrainerait la fixation de ce domaine N-terminal dans la membrane cytoplasmique et l'activation d'une voie de signalisation intracellulaire. Le repliement du domaine FHA-2 en feuillets- β permettrait la translocation du domaine C-terminal vers l'intérieur de la membrane cellulaire formant alors un pore qui laisserait entrer le calcium dans la cellule. L'action conjuguée du domaine C-terminal et N-terminal entrainerait une mort cellulaire rapide. En bas, pour ExlA- Δ Cter, la reconnaissance du récepteur entrainerait l'activation de la voie de signalisation intracellulaire. Cependant, le repliement de ce domaine en feuillets- β n'entrainerait pas la formation de pore par le domaine C-terminal. La seule action serait donc celle induite par le repliement dans les membranes et l'activation de voie de signalisation intracellulaire conduisant à une mort cellulaire plus lente que pour ExlA-FL.

VIII. Annexes:

Nom de la construction	Nombre d'acides aminés	Masse (Da)	pI	Epsilon (M^{-1}/cm^{-1})	Cystéines	Tryptophanes
ExIA FL (-PS)	1651 (1617)	171 651 (167 878)	6,6 (6,35)	68 760	1(0)	6
ExIA FL CF	1645	170 959	6,45	70 250	0	6
ExIA Δ cter	1343	138 682	6,13	59 820	0	6
ExIA Δ ter2	1358	140 276	6,14	59 820	0	6
ExIA Δ CT6hct	1349	139 341	6,07	59 820	0	6
ExIA Δ terCcoil	1423	147 354	6,42	59 820	0	6
ExIAcTer	317	33 874	9,38	8 940	0	0
ExIAcTerStop	270	28701	9,65	8 940	0	0
ExIAcTer-CF	305	32 694	9,28	8 940	0	0
ExIB (-PS)	570 (540)	62 893 (59 618)	9,44 (9,24)	10 130 (99810)	3(2)	13
ExIB-CF	566	62 555	9,22	10 1300	2	13
ExIB	579	63 915	9,29	10 1300	2	13

FIGURE 64 : Tableau récapitulatif des différentes protéines étudiées ainsi que de leurs caractéristiques biochimiques. L'indication (-PS) indique que les valeurs entre parenthèses sont pour les protéines tronquées de leur peptide signal.

Partie II :

TagR et TagQ

I. Introduction

I.1. Le système de sécrétion de type VI :

P. aeruginosa est un pathogène majoritairement responsable de maladies nosocomiales chez les eucaryotes mais qui a aussi une capacité à cibler les bactéries concurrentes [172]. Un des outils utilisés par *P. aeruginosa* pour survivre dans un milieu polymicrobien est le Système de sécrétion de type VI, qui a été présenté en détails dans l'introduction.

I.2. But du projet :

TagQ et TagR sont des protéines clés du SST6-HSI-I, lui-même extrêmement important dans la survie de *P. aeruginosa* et la compétition bactérienne [82]. Or, il est intéressant de noter que le système HSI-I est la copie du SST6 majoritairement présente chez les patients atteint de mucoviscidose [78].

Comprendre le fonctionnement de ces protéines permettrait de mieux comprendre ces phénomènes de compétition. Or la diminution du potentiel de compétition bactérienne de *P. aeruginosa* serait une voie intéressante pour diminuer sa capacité à coloniser un milieu. Des molécules affaiblissant ces mécanismes seraient donc d'un intérêt particulier pour contrer les infections chroniques à *P. aeruginosa* et pourraient augmenter le taux de survie des patients atteint de mucoviscidose.

De la même façon, le signal reçu par la bactérie agressée est inconnu et obtenir la structure du complexe TagQ et TagR pourrait éclaircir cette question. Pour comprendre le rôle de ces deux protéines dans la détection d'un signal d'agression et dans l'activation du SST6, nous avons exprimé et purifié les deux protéines et ensuite utilisé la cristallographie aux rayons-X pour essayer de comprendre le repliement tridimensionnel du complexe. Cette technique permet de comprendre le fonctionnement à échelle moléculaire d'un phénomène grâce à l'obtention d'une structure à haute résolution des molécules impliquées.

I.3. Recherche de protéines homologues :

Concernant les deux protéines TagQ et TagR, les alignements de leurs séquences avec des protéines homologues n'ont pas permis de trouver une similarité claire indiquant un possible mécanisme d'action précis. En utilisant les serveurs HHpred et FFAS₀₃ il a été possible de trouver que TagR est composée de deux domaines différents. La partie N-terminale de la

protéine appartiendrait à la famille des Formylglycine-Generating Enzymes (ou FGE). Ce sont des protéines globulaires composées d'un feuillet β antiparallèle entouré par deux groupes d'hélices α (topologie α/β). Ces enzymes sont impliquées dans la transformation des cystéines catalytiques des sulfatases en formylglycines [173][174] régulant ainsi leur activité enzymatique [175]. Un deuxième domaine semble être présent du côté C-terminal, celui-ci serait composé d'hélices- α et formerait des structures coiled-coil.



FIGURE 65 : Schéma recapitulant les informations structurales obtenues à partir de la séquence de TagR. Cette protéine est exprimée avec un peptide signal permettant son export vers le périplasma. On distingue ensuite du côté N-terminal de la séquence un domaine détecté comme étant homologue aux protéines FGE (en orange). Ce domaine semble être suivi par un domaine C-terminal composé de coiled-coil (en bleu clair). Les C en orange représentent les deux cystéines présentes dans la séquence de TagR, leur position exacte est numérotée en indice.

Il est possible de voir sur la figure suivante les homologues trouvés par le serveur HHPred pour le domaine N-terminal ainsi que les régions de la séquences similaires entre ces homologues et TagR.

Code PDB homologue	Fonction biologique (organisme)	Identité de séquence (résidus concernés)	Ions présent dans la structure
2Q17	FGE (<i>Streptomyces coelicolor</i>)	26 % (87-365)	Ca ²⁺
6S07	FGE (<i>Thermomonospora curvata</i>)	26 % (84-362)	Ca ²⁺ , Cu ⁺ , Cl ⁻
4X8E	Sulfoxide synthase (<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>)	21 % (87-366)	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Cl ⁻ , Fe ³⁺
2Y3C	Fonction inconnue / C-lectin fold (<i>Treponema denticola</i>)	26 % (84-362)	Ca ²⁺
1Z70	FGE (<i>Homo sapiens</i>)	24 % (87-364)	Ca ²⁺ , Cl ⁻
5HHA	Maturation de Chromophore (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	21 % (75-362)	Ca ²⁺
5AOH	Fonction inconnue / C-lectin fold (<i>Serratia sp.</i>)	26 % (84-366)	K ⁺
1Y4J	Sulfatase modifying factor (<i>Homo sapiens</i>)	23 % (87-365)	Ca ²⁺
6QKI	Sulfoxide synthase (<i>Chloracidobacterium thermophilum</i>)	22 % (87-363)	Fe ³⁺
2AFY	FGE (<i>Homo sapiens</i>)	34 % (215-325)	Ca ²⁺
5NYY	FGE (<i>Thermomonospora curvata</i>)	31 % (215-363)	Ca ²⁺ , Cd ²⁺

FIGURE 66 : Tableau récapitulant les informations des homologues au domaine N-terminal de TagR.

La majorité de ces homologues sont des FGE, mais certains ont des activités inconnues ou des activités non reliés aux sulfatases ; ceci laisse une ambiguïté concernant l'activité de TagR.

Concernant la protéine TagQ, j'ai pu commencer à travailler avec pendant mon stage de master 2. Cependant, nous n'avons pas pu obtenir de cristaux de cette protéine à l'époque. A la fin du stage nous avons donc décidé de travailler sur TagR, protéine associée à TagQ dans le périplasma. J'ai réalisé le clonage du gène correspondant à partir du génome de la souche PAO1 dans le plasmide d'expression. Ainsi, au démarrage de ma thèse, j'ai pu commencer à purifier la protéine TagR.

II. Résultats :

II.1. Purification de l'échantillon TagR :

Le gène de TagR a été inséré dans un plasmide pMAL-p2x modifié induisant l'expression d'une Maltose binding protein (MBP) taguée histidine. En C-terminal de cette MBP on retrouve un site de clivage à la TEV et ensuite la séquence de TagR (sans son peptide signal). Le tout est envoyé dans le périplasma de la bactérie d'expression grâce à un peptide signal pour *E. coli* placé en amont de la séquence de la MBP.

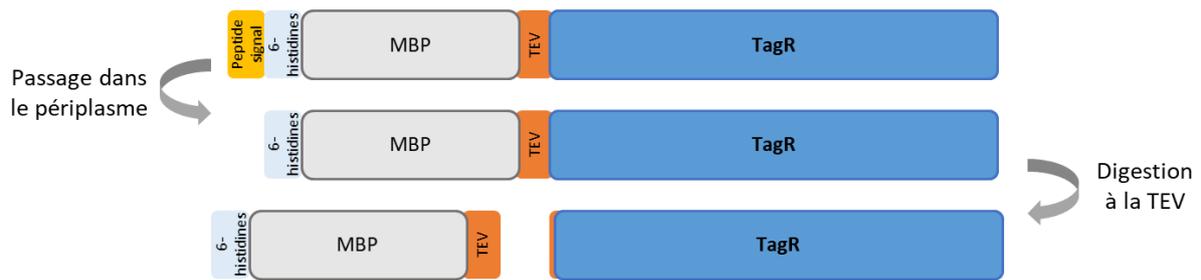


FIGURE 67 : Schéma de la protéine exprimée par notre construction. Le peptide signal permet le passage du polypeptide dans le périplasma ou les ponts disulfures seront plus facilement formés. La protéine 6hMBP-TagR sera digérée à la TEV durant la purification. Ceci permettra la séparation de la 6hMBP de TagR.

Ce plasmide a été utilisé pour transformer des cellules *E. coli* BL21(DE3). Le protocole d'expression était ensuite assez flexible. TagR pouvait être exprimée sur la nuit à 25 °C ou 5 heures à 37 °C. La protéine était stable et disponible en grande quantité après lyse (50 mg/L pour 4 heures d'expression à 37 °C). La lyse se faisait au Cell-disrupter. La partie soluble du lysat est passée sur colonne d'affinité au Nickel. Le profil d'élution de la colonne est visible sur la Figure 68.

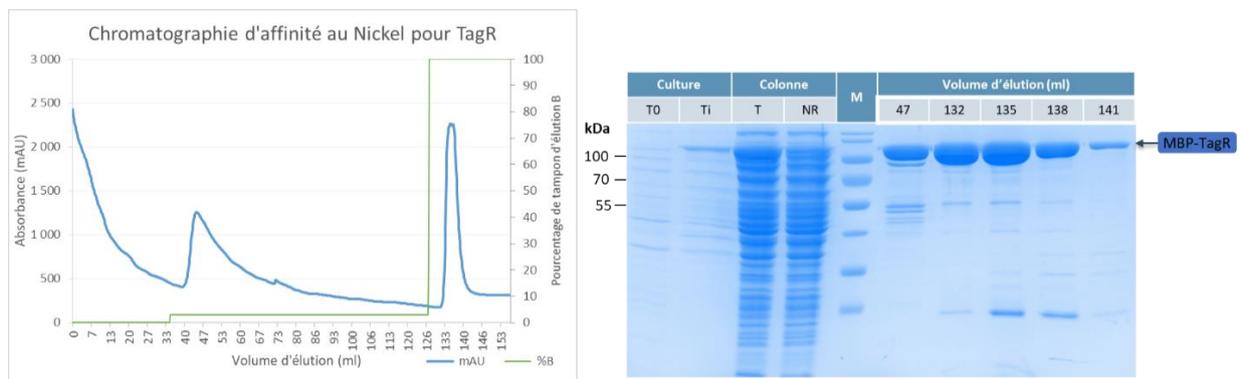


FIGURE 68 : Chromatogramme d'élution de colonne d'affinité au Nickel pour TagR et SDS-PAGE associé. Il est possible de voir sur la culture l'expression de MBP-TagR en faisant la différence entre non-induit (T0) et après induction (Ti). Ensuite, la protéine est soluble (Fractions T : lysat soluble) et bien retenue sur la colonne car absente de la fraction NR (fractions des protéines non-retenues par la colonne). Le gel indique qu'une partie de MBP-TagR est éluee dans le lavage de la colonne (Volume d'élution : 47 ml) mais ceci induit le décrochage de contaminants. La protéine est ensuite la bande majoritaire éluee par la colonne.

La protéine a été éluee de manière homogène, une seule bande était visible sur gel et un seul pic a été observé lors de l'élution. Peu de contaminants étaient présents. TagR est une protéine de 60 kDa, ici elle apparaît à 100 kDa car elle est liée à la MBP qui fait environ 40 kDa. L'étape suivante de la purification était de dissocier TagR de la MBP pour ne récupérer que la protéine d'intérêt. Après différents tests de clivage avec la TEV, les conditions optimales de ratio entre protéine et protease ainsi que temps d'incubation ont été définies (1/30 TEV : MBP-

TagR à température ambiante durant 4 h). Une fois le lien entre la MBP et TagR coupé, l'échantillon a été passé sur colonne d'affinité au Nickel à nouveau. Ceci a permis de retenir la MBP ainsi que la TEV (toutes deux ayant conservées leurs Tag-histidine) sur la colonne alors que TagR a été élué dans le volume mort. Il a été possible de voir sur le chromatogramme et le SDS-PAGE suivant la protéine TagR éluée sans MBP.

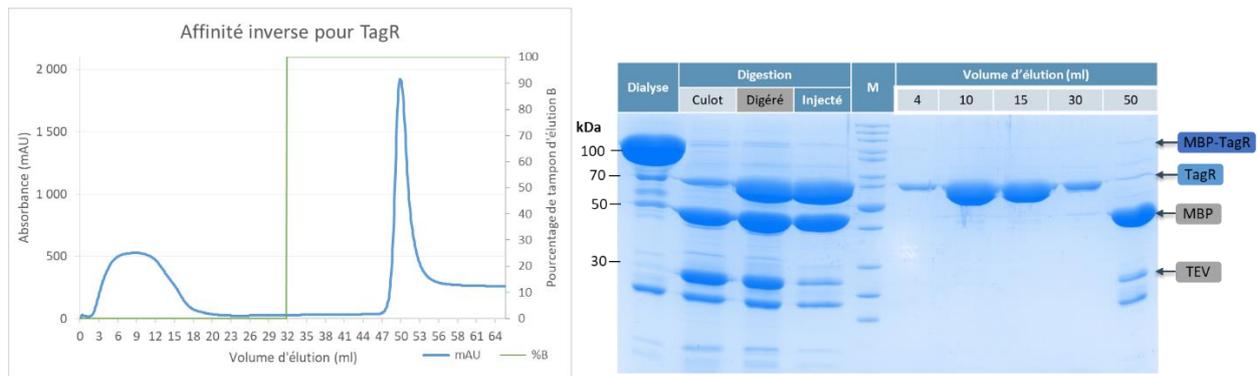


FIGURE 69 : Chromatogramme d'élution de colonne d'affinité au Nickel pour TagR et SDS-PAGE associé. Dialyse : les fractions récupérées de l'élution précédente sont enrichies en MBP-TagR et la protéine reste soluble après être dialysé contre l'imidazole. Lors de la digestion il est possible de voir la disparition de MBP-TagR au profit de la MBP et de TagR séparés (Digéré). La TEV peut précipiter, ce précipité est chargé dans la fraction Culot, et est majoritairement constitué par la MBP et la TEV. L'échantillon soluble injecté contient toujours en majorité TagR et la MBP. Les deux espèces sont séparées, TagR est éluée directement sans être retenue sur la colonne alors que la MBP et la TEV sont éluées avec le tampon d'élution.

A la suite de cette étape de purification, nous avons effectué une chromatographie sur colonne d'exclusion stérique afin de finir la purification avec un échantillon pur et homogène, compatible avec la cristallogénèse.

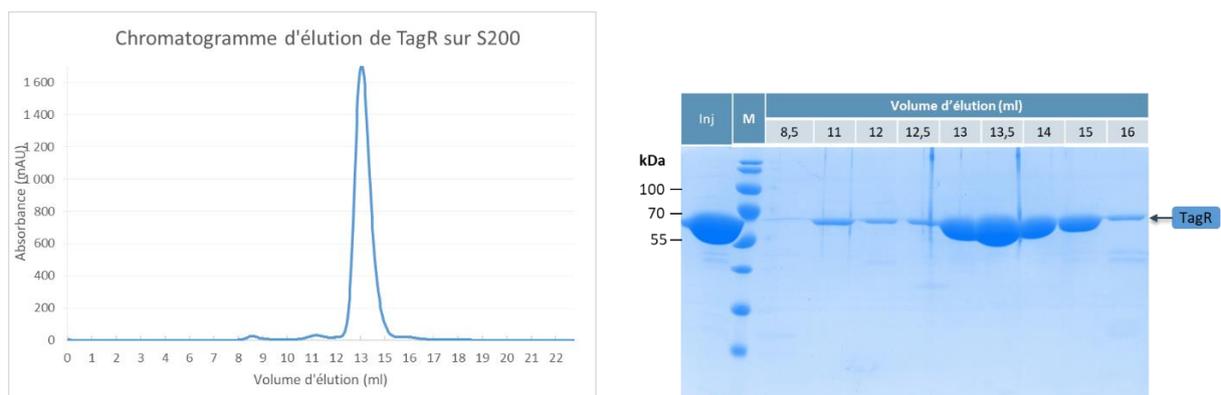


FIGURE 70 : Chromatogramme de l'élution de TagR sur colonne d'exclusion stérique S200 10/300 et SDS-PAGE associé ; TagR est majoritairement dans un pic unique sans contaminant. La protéine semble donc pure et homogène. Il est à noter la présence d'un pic en amont du pic principal pouvant contenir un multimère de TagR.

L'état de notre échantillon était donc compatible avec des techniques de biophysique. Nous avons donc poursuivi notre étude en cherchant à caractériser la protéine TagR *in vitro*.

II.2. Caractérisation *in vitro* de TagR :

Premièrement, il est à noter que la séquence de TagR contient 2 cystéines. Pour vérifier si ces cystéines étaient impliquées dans l'établissement d'un pont disulfures, la masse de deux échantillons de protéine a été mesurée par spectrométrie de masse (avec la plateforme disponible au PSB). Le premier échantillon était natif et le deuxième contenait du β -mercaptoéthanol à 20 mM, un agent réducteur utilisé pour réduire les ponts disulfures des protéines. Entre les deux échantillons, les masses observées avaient une différence de 2 Da correspondant à la perte ou au gain de 2 atomes d'hydrogène. Cette différence était induite par la formation ou destruction d'un pont disulfure (délocalisant deux hydrogènes des cystéines). Ces deux cystéines sont donc impliquées dans la formation d'un pont disulfure chez TagR.

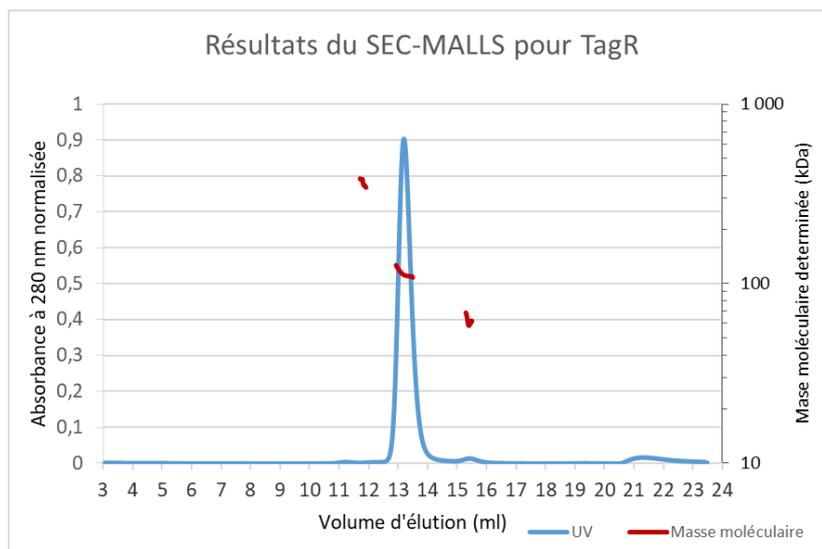
II.2.1. Ultracentrifugation analytique :

Cette expérience a été réalisée par Daniel Maragno Trindade dans l'équipe PATBAC au Brésil (LNBio). L'ultracentrifugation analytique ou AUC, permet de déterminer le coefficient de sédimentation d'une protéine. En fonction de ce coefficient déterminé expérimentalement et de la masse moléculaire théorique, il est possible de savoir si la molécule étudiée est multimérique ou si d'une manière plus générale, des complexes se forment en solution. Pour TagR il a été possible de voir que la protéine migrait comme un dimère.

Pour confirmer cette expérience, nous l'avons reproduite en utilisant le SEC-MALLS.

II.2.2. SEC-MALLS :

Des expériences de SEC-MALLS ont été réalisées avec la protéine TagR sur la plateforme de biophysique du PSB avec l'aide de Caroline Mas. Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous.



Masse moléculaire déterminée	Volume d'éluion	Polydispersité	Echantillon possible	Fraction totale
123 000 (+/- 0,8 %)	13,25 ml	1(+/- 1.15 %)	Dimère TagR (59 712 Da x 2 = 119 424 Da)	99,1 %
58 390(+/- 9,9 %)	15,5 ml	1(+/- 14 %)	Monomère TagR (59 712 Da)	0,7 %
350 000 (+/- 11,4 %)	11,7 ml	1(+/- 17 %)	Tétramère TagR (59 712 Da x 4 = 238 848 Da)	0,2 %

FIGURE 71 : Résultats obtenu avec le SEC-MALLS sur l'échantillon TagR (S200 10/300). Le profil d'éluion est détecté avec les UV (en bleu). La masse moléculaire des espèces déterminée par le MALLS est présenté en rouge. Les résultats du MALLS sont indiqués dans le tableau. Il est possible de voir que TagR se retrouve très majoritairement à l'état de dimère en solution.

Il est possible de voir que le MALLS a été capable de définir trois espèces différentes de TagR. L'espèce majoritaire est composée à 99 % par un dimère, l'erreur sur la masse et la polydispersité de l'échantillon est petite (de l'ordre de 1 %) ce qui indique que les données sont consistantes. TagR est donc majoritairement à l'état dimérique en solution. Ensuite, on observe des espèces peu présentes qui peuvent être des monomères et des tétramères. Cependant, les erreurs associées à la détermination de la masse et à la polydispersité sont élevées (de l'ordre de 10 %) indiquant des données imprécises. Ces espèces sont probablement présentes mais en quantité infimes. Nous avons donc pu confirmer que TagR était bien un homodimère en solution.

II.3. Cristallogenèse et diffraction rayons-X :

II.3.1. Criblage et amélioration des conditions de cristallisation :

L'échantillon purifié de TagR étant compatible avec la cristallogenèse, nous l'avons utilisé à 10 mg/ml et 22 mg/ml pour cribler des conditions de cristallisation. 6 plaques de criblage ont été réalisées avec la plateforme HTX du PSB. Sur ces 6 plaques, seule une condition a donné des cristaux. Cette condition était composée de 0,5 M de Sulfate d'ammonium, de 0,1 M de Tri-sodium citrate à pH 5,6 et de 1 M de sulfate de lithium et d'abord été reproduite manuellement pour vérifier sa reproductibilité. Les cristaux obtenus après reproductions manuelles sont illustrés ci-dessous dans la Figure 72.

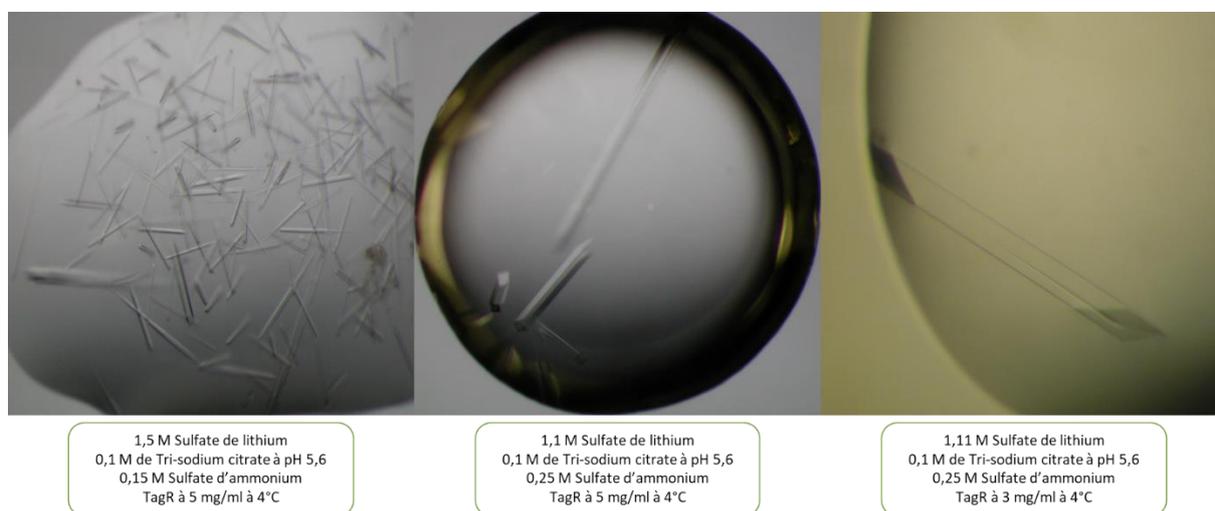


FIGURE 72 : Cristaux de TagR obtenus manuellement avant et après optimisations des conditions de cristallisation. La diminution de la concentration en protéines dans les gouttes ainsi que de la concentration en agent précipitant a permis de diminuer la quantité de cristaux au profit de leurs tailles.

La croissance de ces cristaux était donc reproductible, cependant c'étaient des baguettes fines. Il a donc fallu améliorer les conditions de cristallisation pour augmenter la taille des cristaux obtenus dans cette condition. Il est possible de voir que la diminution de la concentration en protéines dans les gouttes ainsi que la diminution de la quantité d'agent précipitant ont réduit la quantité de nucléation de cristaux. Ceci a entraîné une augmentation de la croissance des cristaux dans la goutte, qui poussaient plus lentement et toujours à 4 °C. Il est possible de voir sur la Figure 72 la différence entre les cristaux obtenus avant et après amélioration des conditions.

II.3.2. Diffraction des cristaux au synchrotron ESRF et analyse des données :

Pour les premiers cristaux amenés au synchrotron, il était possible d'observer de la diffraction jusqu'à une résolution comprise entre 7 Å et 4 Å. Cependant, certains cristaux plus gros ont pu nous permettre d'enregistrer des données de diffraction allant jusqu'à une résolution de 3 Å. J'ai effectué des expériences de collecte et l'analyse des données de diffraction en partenariat avec Carlos Contreras-Martel, membre senior de notre groupe à l'IBS.

Ces jeux de données à 3 Å contiennent des données de diffractions très anisotropique. Le long de l'axe b, il est possible d'observer des réflexions jusqu'à 3 Å qui ne seront observables que jusqu'à 5 Å le long des axes a et c. Le groupe d'espace est un $P4_12_12$, la maille est de $a=192,73$ $b=192,73$ et $c=189,3$ angströms. Le calcul du coefficient de Mathews nous a permis de déterminer qu'il y aurait entre 4 et 8 molécules avec une plus forte probabilité de 6 molécules par unité asymétrique.

II.4. Résolution du problème des phases :

Avec des données à cette résolution, il était possible d'entamer le processus de résolution d'une structure. Par contre, il nous fallait résoudre le problème des phases perdues durant l'expérience de diffraction. L'une des techniques les plus couramment utilisée est le remplacement moléculaire, où un modèle dont la structure est déjà connue sert à reconstituer les phases de l'expérience.

II.4.1. Tentative de phasage par remplacement moléculaire :

Nous avons tenté d'utiliser le remplacement moléculaire avec PHASER de la suite CCP4 pour résoudre la structure. Pour chacun des homologues présentés dans la Figure 66, les boucles mobiles avec un facteur B élevé ont été supprimées. Chacun de ces homologues tronqués du domaine N-terminal a été utilisé seul ou en combinaison avec un homologue tronqué du domaine C-terminal. Chacune de ces combinaisons a été utilisée pour le remplacement moléculaire en essayant de remplir l'unité asymétrique avec 4, 6 ou 8 molécules.

L'efficacité du remplacement moléculaire dépend grandement de la proximité entre le modèle utilisé et l'espèce présente dans la maille cristalline à reconstruire. Il nous faut donc un modèle suffisamment similaire à notre protéine d'intérêt. Or, les serveurs d'analyse de

séquence n'étaient capables de retrouver que des molécules qui sont très éloignés et dont les similarités de séquences étaient faibles (au maximum 26 % sur une partie limitée de la molécule). Ce qui diminue l'efficacité de cette technique de phasage.

II.4.2. Tentative de phasage par diffusion anormale :

Nous avons donc cherché à déterminer les phases de nos jeux de données de manière expérimentale. Pour cela l'une des techniques les plus couramment utilisées et le SAD ou MAD pour Single-wavelength ou Multiple-wavelength Anomalous Diffusion. Pour ces techniques, il faut incorporer dans la protéine des atomes qui sont des diffuseurs anormaux. Ceci se fait de manière générale en remplaçant les méthionines de la protéine par des méthionines sélénées (ou l'atome de soufre sera remplacé par un atome de sélénium)[176]. Sous condition que cette incorporation ne soit pas délétère pour le repliement et la cristallisation de la protéine ainsi que pour la capacité de diffraction du cristal, il est alors possible d'utiliser les propriétés de diffusion anormale du sélénium présent dans le cristal. En effet, lorsque le faisceau incident est à une longueur d'onde spécifique, l'atome diffuseur anormal contribue à la diffraction du cristal de manière différente que lorsque le faisceau est à une longueur d'onde où ce phénomène ne se produit pas. Cette contribution permet de déterminer les phases des ondes diffractées et ainsi de résoudre la structure [177].

II.4.2.1. Par incorporation de Sélénométhionine :

TagR a donc été produite en milieu minimum supplémenté en acides aminés spécifiques pour induire l'incorporation de sélénométhionine dans la protéine. La protéine a pu être purifiée de la même manière que précédemment. Les cristaux ont pu être reproduits et ont été amenés au synchrotron ESRF pour des expériences de diffraction sur les lignes ID 23-2, ID23-1, ID30-A3, ID30-B, BM14 et FIP. La présence de Sélénium dans la protéine a été confirmée par spectrométrie de masse. Cependant le signal anormal obtenu après diffraction des cristaux était trop faible pour permettre de résoudre la structure de TagR.

En vérifiant les données cristallographiques obtenues chez les homologues, il a été possible de voir que les structures contiennent toutes des ions métalliques, tels que le calcium ou le zinc, pouvant être impliqués dans des réactions biologiques. En prenant exemple sur ces homologues, il était donc possible que TagR lie aussi des ions métalliques. Ces métaux pourraient contribuer à l'empilement cristallin et à la stabilité de la protéine, ce qui pourrait nous aider à améliorer la qualité des cristaux, et donc leur diffraction. La présence de ces

métaux pourrait aussi permettre de résoudre le problème de phase. En effet, il serait possible de se servir de ces métaux comme diffuseurs anomaux.

II.4.2.2. Par incorporation de possibles cofacteurs :

Nous avons donc cherché à déterminer si TagR était capable de lier des ions métalliques communs. L'une des premières expériences effectuées a été le Thermal Shift Assay (TSA). La protéine TagR a été mélangée à plusieurs tampons contenant différentes concentrations d'ions calcium, cuivre, magnésium et zinc. Ce sont des métaux présents dans les structures des homologues présentés dans la Figure 66. La température de dépliement (ou T_M pour Melting-Temperature) de TagR, indicateur de sa stabilité, a été enregistrée durant l'expérience TSA. Cette valeur est déterminée par une augmentation de fluorescence, elle-même induite par la fixation de la sonde CYPRO orange sur les régions hydrophobes de TagR, rendues accessible au solvant par dépliement de la protéine. Les résultats sont présentés ci-dessous.

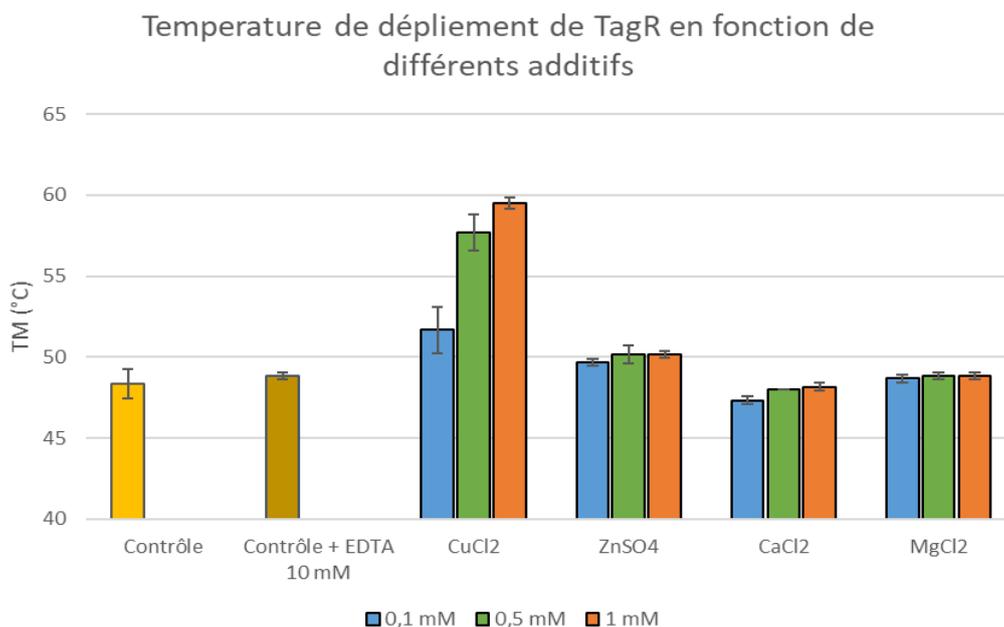


FIGURE 73 : Résultats du TSA obtenus pour TagR mélangée avec plusieurs concentrations de différents additifs. T_M = melting temperature. Les mesures ont été faites en triplicat. La température de dépliement de l'échantillon contrôle (contenant uniquement TagR) est de 48°C. L'ajout d'EDTA ne change pas cette valeur. De même pour le $MgCl_2$ et le $CaCl_2$. Le $ZnSO_4$ semble avoir un léger effet sur la stabilité de TagR alors que l'ajout de $CuCl_2$ semble avoir un fort impact.

La protéine TagR seule a une température de dépliement d'environ 48 °C. L'ajout d'EDTA, un agent chélateur, ne change pas cette température, on peut donc considérer que

TagR ne lie pas d'ions dans l'échantillon contrôle. Ensuite, l'ajout de CaCl_2 et de MgCl_2 ne change pas la valeur de température de dépliement de TagR indiquant que ces molécules n'impactent en rien la stabilité de TagR et donc n'interagissent probablement pas avec. Cependant, l'ajout de ZnSO_4 augmente la température de dépliement de 2 °C (atteignant 50 °C) indiquant une légère stabilisation. Enfin, l'ajout de CuCl_2 et donc de cuivre induit une augmentation de 11 °C de la température de dépliement à une concentration de 1 mM (atteignant 60 °C). Le cuivre aurait donc un fort impact sur la stabilité de TagR. Il est intéressant de noter que le cuivre est aussi un cofacteur nécessaire pour la réaction enzymatique des FGE [174][178][179]. Cependant, la fixation du cuivre requiert deux cystéines libres chez les FGE ; or chez TagR ces cystéines sont impliquées dans la formation d'un pont disulfure [174]. TagR ne doit pas avoir l'activité catalytique d'une FGE mais doit tout de même présenter la même structure que ces molécules.

A partir de cette information nous avons donc reproduit un criblage de conditions de cristallisation de 6 plaques avec TagR concentrée à 7 mg/ml supplémenté de 1 mM de CuCl_2 . Les cristaux obtenus dans notre unique condition de cristallisation (en sulfate de lithium) ont également été reproduits avec ajout de différentes concentrations de CuCl_2 .

L'ITC a aussi été utilisé pour mesurer une constante d'affinité entre TagR et le cuivre. La protéine concentrée à 700 μM a été mélangée à du CuCl_2 à 1 mM. Cependant, le seul signal obtenu a été celui de la dilution du CuCl_2 dans la cuve contenant TagR.

De plus, l'ajout de cuivre dans les conditions de cristallisation manuelles et dans le criblage de condition n'a induit aucun changement des propriétés de diffraction des cristaux et aucune apparition de nouvelles conditions de cristallisation. Ceci remet en question la réelle affinité de TagR pour le cuivre.

II.4.3. Tentative de phasage par remplacement isomorphe :

Afin de résoudre le problème de phase, nous avons donc tenté une autre technique, le remplacement isomorphe, SIR ou MIR pour Single-wavelength ou Multiple-wavelength Isomorphous Replacement. Cette technique requiert l'incorporation d'un métal lourd dans le cristal. Lors de l'expérience de diffraction, ce métal lourd va contribuer plus fortement à la diffraction que les atomes plus légers dont la protéine est constituée (C, H, O, N). Cette forte contribution est facilement détectable et permet de dissocier la contribution de l'atome lourd de celle de la protéine. La position de l'atome lourd est ensuite déterminée et sa contribution à la diffraction du cristal permet de réduire les solutions possibles pour déterminer les phases originaires de la diffraction de la protéine.

Nous avons donc cherché à introduire des métaux lourds dans les cristaux de TagR. Nous avons essayé d'incorporer des atomes d'or, de samarium, de mercure, d'osmium et de gadolinium chacun à des concentrations variantes de 0,1 mM à 1 mM. Des cristaux ont été pêchés et déposés dans la solution mère de leur goutte respective supplémentée par les métaux lourds aux concentrations finales décrites. Les cristaux ont été incubés 2 h, 4 h ou sur la nuit avant d'être pêchés pour être amenés au synchrotron. Malheureusement, les cristaux trempés dans ces métaux lourds n'ont pas diffracté, ceci peut être dû au fait que le métal lourd a interféré avec l'assemblage cristallin, diminuant les propriétés de diffractions des cristaux.

II.5. Optimisation de TagR pour obtenir de nouvelles conditions de cristallisation :

II.5.1. Utilisation du serveur SERp pour obtenir des mutants de surface :

La qualité des cristaux et de leur diffraction a été un problème récurrent qui nous a empêchés d'avoir des données de bonne qualité. Nous avons donc ensuite cherché à trouver d'autres formes cristallines de TagR afin de voir si elles nous permettraient d'obtenir de meilleures données. Jusqu'à ce moment dans la thèse, TagR ne donnait des cristaux qu'avec une seule condition. Nous avons donc décidé de modifier la protéine pour changer ses propriétés de cristallisation. Pour cela, nous avons utilisé le serveur SERp (pour Surface Entropy Reduction Prevision), qui prédit des acides aminés de surface pouvant gêner la cristallisation (avec une haute entropie) et avons muté les résidus ainsi indiqués (pour réduire l'entropie de surface). Ce serveur a déjà été utilisé dans notre équipe et a permis d'obtenir des cristaux et la structure de l' α -macroglobuline de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium [180].

Le serveur SERP a défini deux régions étant localisées aux acides aminés 357, 358 et 359 et aux acides aminés 442 et 443 de la séquence de TagR. La région 357 prédite est constituée de 3 acides aminés glutamine, lysine et acide glutamique. La région 442 prédite est constituée de 2 acides aminés lysines. Le plasmide contenant la séquence de TagR a été muté pour remplacer les acides aminés de ces régions en alanines et ainsi former les mutants TagR357 et TagR442.

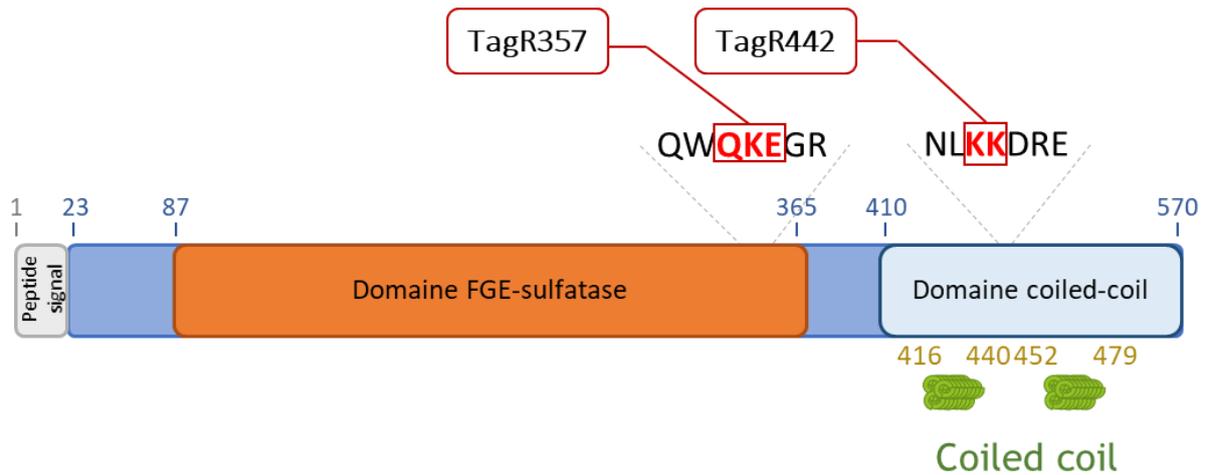


FIGURE 74 : Localisation sur la séquence de TagR des régions prédites comme étant en surface par le serveur SERp. Les acides aminés impliqués dans l'augmentation d'entropie de surface de ces régions sont indiqués en rouge. Les mutants de TagR pour lesquels ces acides aminés ont été mutés pour des alanines sont indiqués cerclés de rouge.

Nous avons ensuite exprimé ces clones et purifié les protéines mutantes sur colonne d'affinité au Nickel.

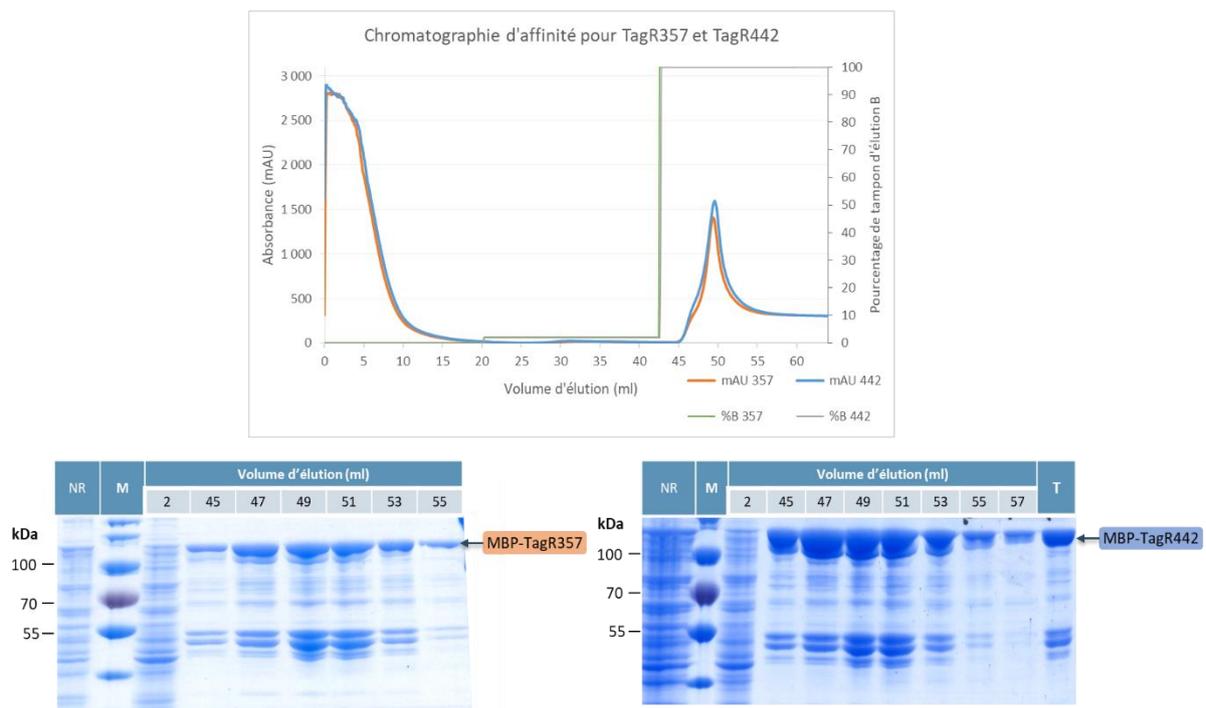


FIGURE 75 : Chromatogramme d'élution des mutants MBP-TagR 357 et MBP-TagR442 sur colonne d'affinité au Nickel et SDS-PAGE associés. Il est possible de voir que les deux mutants sont bien retenus et élués sur la colonne de Nickel. (NR= fractions des protéines non-retenues)

Il en est de même avec la digestion à la TEV et lors de l'affinité inverse présentée ici.

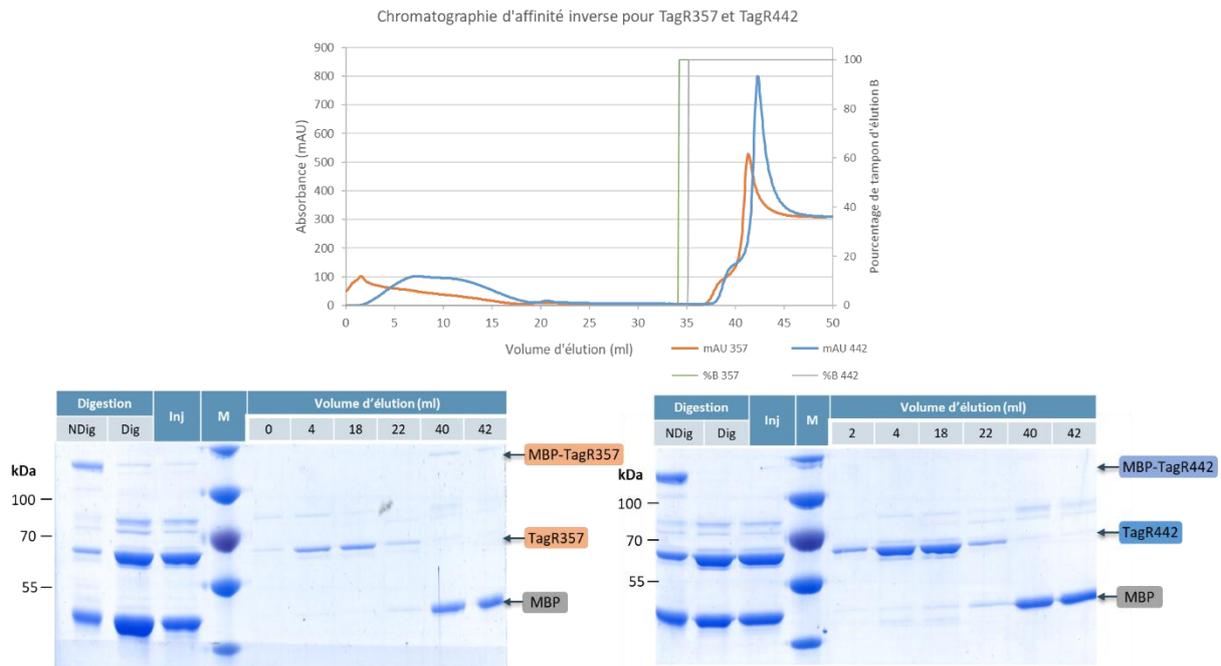


FIGURE 76 : Chromatogramme des mutants TagR357 et TagR442 sur colonne d'affinité au Nickel et SDS-PAGE associés. La fraction non-digérée (NDig) contenant les protéines MBP-TagR357 et MBP-TagR442 sont indiqués. Après digestion à la TEV, (Dig), ces espèces ont bien disparues au profit des espèces MBP et TagR357 et TagR442. Ces protéines étaient solubles puisqu'elles étaient toujours présentes dans la fraction soluble injectée sur colonne (Inj). Ces différentes espèces ont ensuite été séparées, TagR357 et TagR442 ont été éluées directement sans être retenues sur la colonne alors que la MBP a été éluée avec le tampon d'éluion.

La colonne d'exclusion stérique a permis d'obtenir des échantillons homogènes présentés ici.

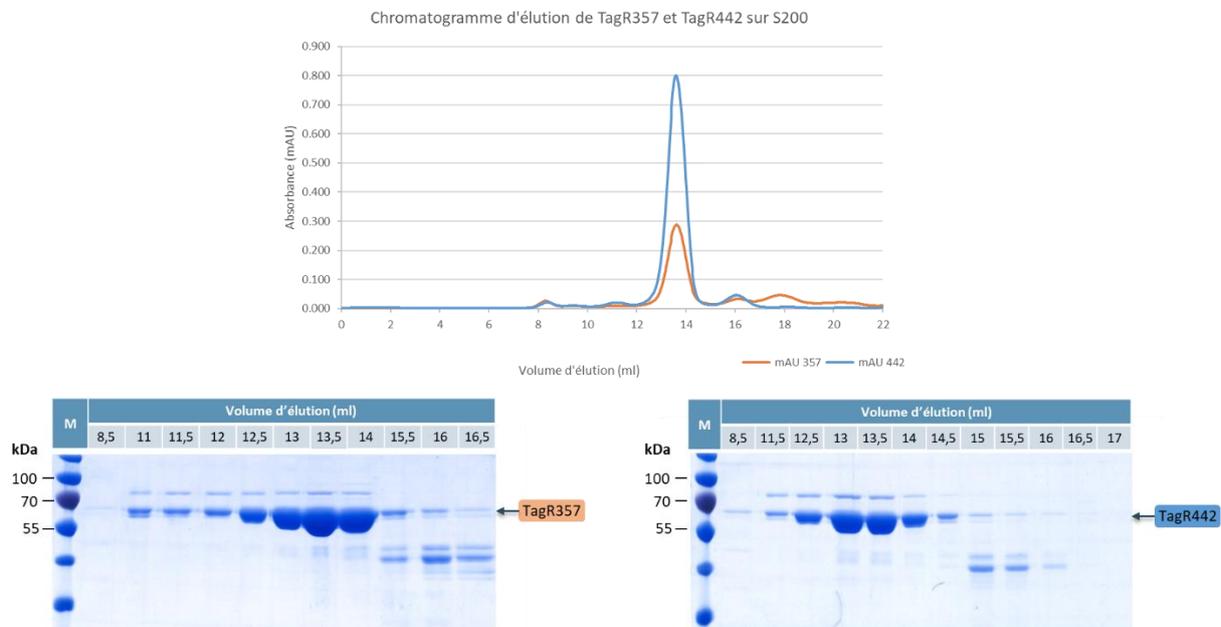


FIGURE 77 : Chromatogramme d'éluion sur colonne d'exclusion stérique des protéines TagR357 et TagR442. Un pic unique contenant les protéines d'intérêt est visible. Dans ce pic, malgré la présence de contaminants, elles sont les espèces majoritaires.

Nous avons donc utilisé ces deux protéines pour des criblages de conditions de cristallogénèse en utilisant 6 plaques à 4.5 mg/ml pour les deux constructions. Cependant aucune goutte n'a produit des cristaux malgré un ratio goutte claire / goutte précipitée d'environ 40 %. Certaines conditions semblaient faire croître des objets cristallins mais ces objets n'ont jamais pu être reproduits manuellement (Voir Figure 77).

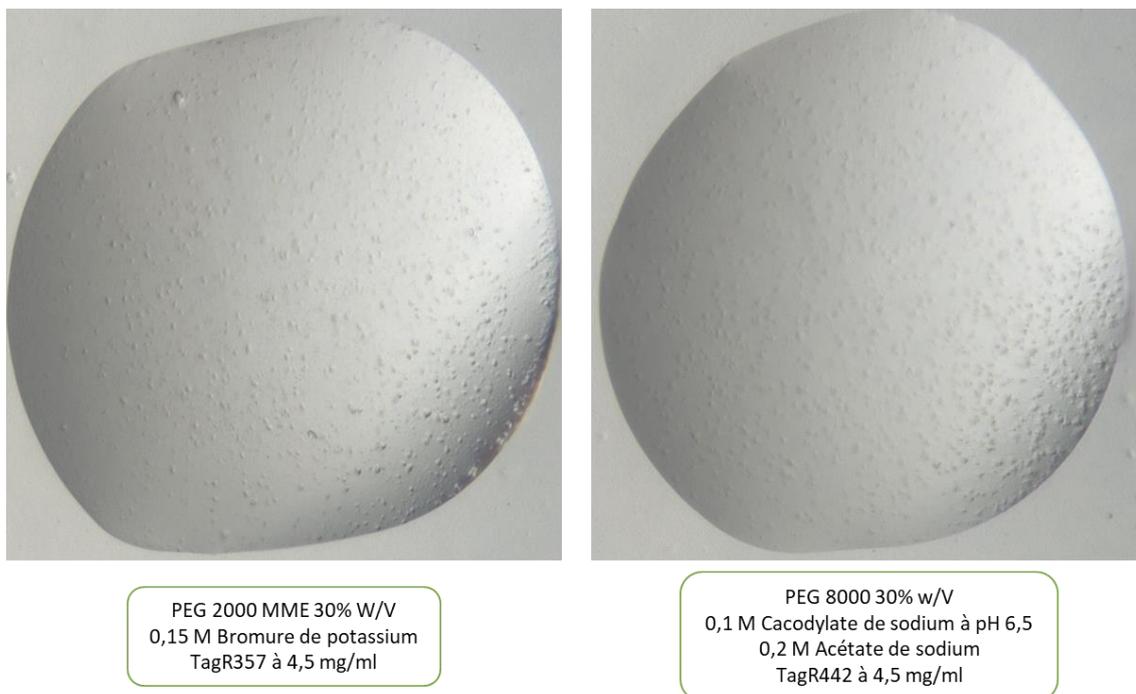


FIGURE 78 : Exemple d'objets obtenus dans les gouttes de cristallisations lors du criblage avec les deux mutants TagR357 et TagR442.

Nous avons donc décidé de changer d'approche pour optimiser l'échantillon TagR à la cristallogénèse. La protéolyse ménagée est une technique couramment utilisée dans ce but.

II.5.2. Utilisation de la protéolyse ménagée pour définir des régions flexibles sur TagR :

La protéolyse ménagée permet, en utilisant des protéases en quantité contrôlée, de digérer les régions flexibles des protéines. Ces régions flexibles sont généralement délétères à la cristallogénèse des protéines car elles gênent la croissance cristalline. TagR a donc été incubée à des durées différentes avec de la trypsine, une protéase coupant après les Lysines et les Arginines. Les résultats de la digestion ont été analysés par SDS-PAGE afin de vérifier la qualité de la protéolyse ménagée.

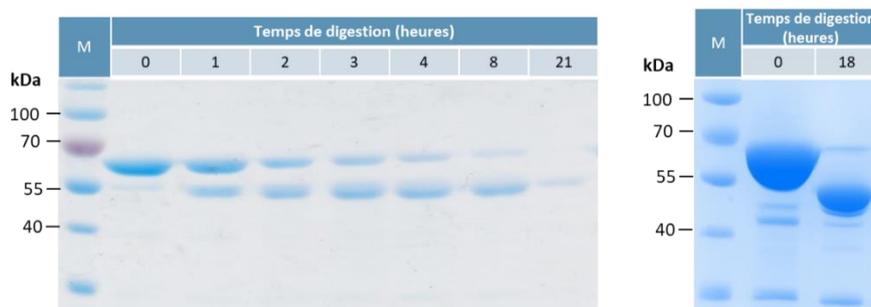


FIGURE 79 : SDS-PAGE montrant les résultats de protéolyse ménagée. Sur la gauche, l’incubation de TagR avec la trypsine à un ratio molaire de 1 pour 500 (Trypsine : TagR) entraîne la dégradation de l’espèce à 60 kDa dont la bande sur gel disparaît au cours du temps. Ceci entraîne l’apparition d’une bande plus basse vers 55 kDa. A droite, optimisation des conditions de digestion, après 18 heures de digestion avec la trypsine à un ratio molaire de 1 pour 500 (Trypsine : TagR) il est possible de voir que l’espèce de 60 kDa à disparu au profit de l’espèce à 55 kDa.

L’incubation de TagR avec la trypsine à un ratio molaire 1 pour 500 (Trypsine : TagR) a entraîné la disparition de la bande de 60 kDa au profit de l’apparition d’une bande à 55 kDa. TagR a donc été digérée et un domaine plus résistant à la protéolyse et donc plus stable est apparu. Les conditions optimales pour obtenir un échantillon homogène de cet espèce protéolyse sont situées entre 8 heures et 21 heures d’incubation. Après optimisation, il est possible de voir qu’au même ratio après 18 heure d’incubation, l’espèce digérée de TagR d’environ 55 kDa était majoritaire. Cet échantillon a été utilisé pour réaliser un criblage de conditions de cristallisation, 6 plaques ont été effectuées avec cet échantillon concentré à 9 mg/ml mais aucune condition n’a permis la croissance de cristaux.

En parallèle à la cristallisation de l’échantillon digéré, nous avons cherché à identifier le domaine résistant à la protéolyse qui était obtenu. Après envoi de l’échantillon digéré à la spectrométrie de masse (plateforme du PSB), il a été possible de déterminer que cet échantillon était constitué de la partie N-terminale de la protéine. Cette partie a été digérée après la Lysine 443. Il est intéressant de noter que cette coupure se situe sur l’un des sites prédits comme étant exposé au solvant par le serveur SERp. Les données sont donc cohérentes entre les expériences et les prédictions, signifiant que cette région est très probablement exposée au solvant.

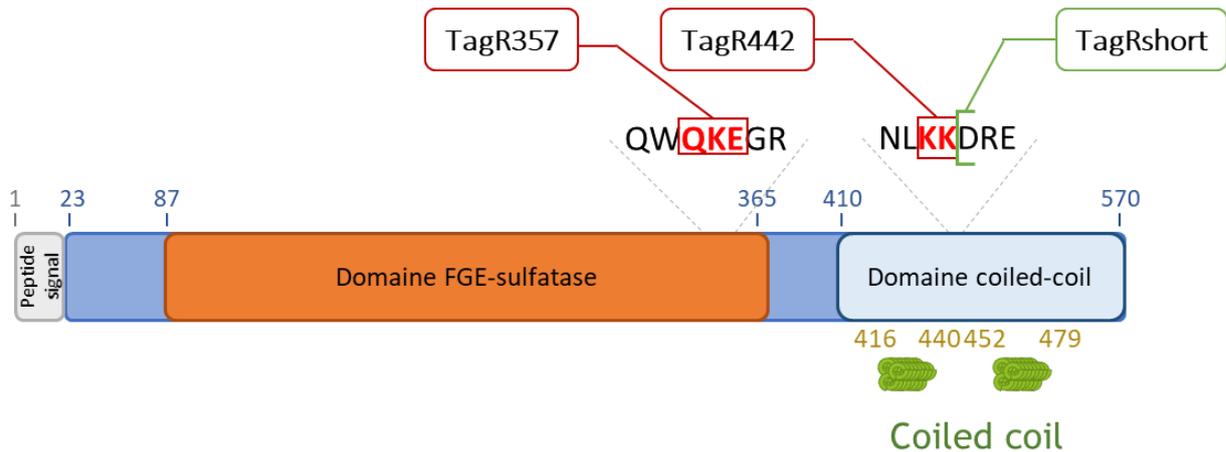


FIGURE 80 : Localisation sur la séquence de TagR des différents mutants construits. Les acides aminés impliqués dans l'augmentation d'entropie de surface prédits par le serveur SERp sont indiqués en rouge et les mutants de TagR issus des mutations sont indiqués cerclés de rouge. Le domaine isolé après protéolyse ménagée provient d'une coupure de la séquence peptidique après la lysine 443. Le clone TagRShort est issu d'une mutation de l'acide aminé 444 en codon stop.

Nous avons donc reclone le vecteur codant pour la protéine TagR pour y muter l'acide aminé 444 en codon stop, donnant ainsi le clone TagRShort. Ce clone correspondrait à la version plus courte de TagR obtenue par protéolyse ménagée et déterminée par spectrométrie de masse.

Ce clone a été exprimé et purifié par colonne d'affinité au Nickel. Cependant, le clivage avec la protease TEV du site de coupure entre la MBP et TagRShort a entraîné la précipitation de la protéine TagRShort. La digestion étant impossible, nous en avons conclu que la MBP était capable de solubiliser la protéine alors agrégée. Il est possible que ce clone manque une partie de la structure qui est conservée lors de la protéolyse mais n'est pas présente chez ce nouveau clone, entraînant son agrégation.

II.6. Amélioration de la diffraction des cristaux par ensemencement :

Suite à l'échec de la modification de la protéine pour améliorer les cristaux et leur diffraction, nous avons continué nos tentatives par des approches centrées sur la cristallogénèse pour utiliser des techniques d'ensemencement. Ces techniques sont divisées en deux catégories appelées micro et macro-ensemencement. Le principe est le même pour les deux techniques : utiliser un cristal déjà existant comme matrice pour la croissance d'un nouveau cristal. La différence vient de la taille du cristal utilisé à l'origine. Pour le macro-ensemencement, un cristal simple est utilisé et placé dans la même condition de cristallisation ayant permis sa croissance à l'exception du fait que la quantité en protéine sera réduite. Le

but est de ne pas entraîner l'apparition de nouveaux cristaux mais d'uniquement faire croître le cristal introduit dans cette nouvelle goutte [181].

Le micro-ensemencement est aussi réalisé à partir d'un cristal, mais celui-ci est broyé pour n'être utilisé plus qu'à l'état de noyaux de cristal. Ces noyaux sont bien plus petits que les cristaux originaux et ne sont composés que de quelques mailles cristallines. De la même manière que précédemment, ces noyaux seront utilisés pour éviter l'étape de nucléation nécessaire à la croissance spontanée du cristal [182].

Cette technique de micro-ensemencement est capable de modifier le groupe d'espace et la maille du cristal ainsi formé [183]. Le fait de recourir à des noyaux permet d'homogénéiser la croissance des cristaux pour n'en obtenir qu'un seul type [184].

Dans le cas de TagR, où nous avons cherché à obtenir un signal de diffraction à plus haute résolution, le macro-ensemencement aurait pu être intéressant pour obtenir des cristaux plus gros. De manière générale, les cristaux plus gros contiennent plus de volume cristallin et donc plus de répétitions de la maille cristalline, ce qui pourrait générer un meilleur signal de diffraction. Cependant, cette technique a tendance à créer des anomalies de croissance telles que des macles. Or certains des cristaux déjà obtenus précédemment étaient des macles. L'assemblage cristallin de nos cristaux était donc susceptible aux erreurs et utiliser cette technique pourrait entraîner un aggravement de ce phénomène [181][185].

En revanche le micro-ensemencement nous permettrait d'isoler des formes cristallines pouvant croître sous d'autres formes que des baguettes [184]. Cette technique a donc été utilisée à partir des cristaux précédemment obtenus. Deux des façons les plus communes d'utiliser cette technique requièrent l'utilisation soit d'une moustache de chat soit de microbilles.

La première technique nécessite d'utiliser une vraie moustache de chat (ou un crin de cheval). Ce sont des fibres qui sont suffisamment écailleuses pour décrocher et retenir des morceaux infimes de cristaux [186]. Ces poils sont donc frottés contre des cristaux avant d'être lavés dans des gouttes contenant de la solution de cristallisation et la protéine en concentration saturante mais ne permettant pas la nucléation de cristaux. Ceci est important car les noyaux seront apportés par le passage de la moustache de chat. Ces passages sont réitérés afin de créer un gradient d'ensemencement avec les noyaux (de moins en moins de cristaux seront présents et apportés par la moustache). Ceci entraîne la croissance de moins en moins de cristaux le long du gradient, les cristaux seront donc potentiellement de plus en plus gros [187].

Cependant, après utilisation de cette technique, seuls des baguettes fines sont apparues. Ceci rappelait les baguettes déjà obtenues précédemment, qui diffractaient à faible résolution ; ce qui a limité l'intérêt de cette technique ici.

La deuxième technique courante en micro-ensemencement requiert l'utilisation de billes métalliques [186]. Des cristaux déjà formés sont broyées dans leur gouttes puis pipetés et dilués. Une ou plusieurs billes seront ajoutées à l'échantillon qui est alors vivement agité. Les billes réduisent les cristaux à l'état de noyaux homogènes. Ces noyaux sont utilisés de la même manière que pour la moustache de chat, pour ensemercer des gouttes contenant déjà la protéine et la condition de cristallisation. Les noyaux sont ajoutés en quantité décroissantes pour créer un gradient de nucléation. Ceci permet comme pour la moustache de chat, d'obtenir des petits cristaux au début puis des grands cristaux à la fin du gradient [188].

Cette technique a été utilisée avec les cristaux de TagR mais, à nouveau, seulement des baguettes ont pu être obtenues.

Nous avons donc fait un dernier essai avec les noyaux obtenus. En effet, il est possible d'utiliser les noyaux cristallins pour faire du MMS (Micro-seeds Matrix Screening). Ceci consiste à cribler des conditions de cristallisation en utilisant cette fois la protéine supplémentée avec les noyaux cristallins obtenus. Ceci permet d'obtenir des cristaux dans plus de conditions, voir même des cristaux aux caractéristiques différentes [187][189]. Dans notre cas, l'unique condition permettant d'obtenir des cristaux ne nous a pas permis d'obtenir des cristaux de qualité suffisante. Une nouvelle condition où les cristaux auraient des meilleures propriétés de diffraction serait plus intéressante. Nous avons donc utilisé cette technique mais malheureusement, sur la plaque de criblage réalisée avec des noyaux ajoutés à TagR concentrée à 10 mg/ml, nous n'avons obtenu aucune condition entraînant la croissance de cristaux.

Après ces multiples échecs, nous avons décidé de chercher à modifier l'échantillon de TagR en cherchant à cristalliser le complexe TagQ-TagR. En partant du principe que si ces deux protéines ne cristallisent pas individuellement, elles pourraient peut-être le faire en formant un complexe.

II.7. Caractérisation du complexe TagQ-TagR :

Pour éviter de mélanger les deux protéines de manières aléatoires en attendant qu'elles cristallisent, nous avons donc cherché à mieux caractériser ce complexe, notamment en déterminant sa stœchiométrie et sa constante de dissociation. Il est intéressant de noter que le pI de TagR est de 5,6 alors que le pI de TagQ est de 9,0 ce qui signifie qu'à pH 7,0, ces

deux molécules ont des charges globalement opposées, ce qui indiquerait une possible interaction médiée par des charges de surface.

II.7.1. Purification et caractérisation de TagQ :

Pour cette partie de l'étude, il a fallu purifier la protéine TagQ. C'est une protéine de 32 kDa dont la séquence génique correspondante au peptide signal et de la lipobox ont été supprimées pour donner une protéine de 28 578 Da (voir annexes) dont le clone a été réalisé dans le plasmide pMAL-p2x identique à celui de TagR. Cette protéine a donc été purifiée de la même façon que TagR, c'est-à-dire par colonne d'affinité au Nickel. Sur le SDS-PAGE associé, la protéine TagQ est encore présente avec la MBP et migre donc aux alentours de 70 kDa.

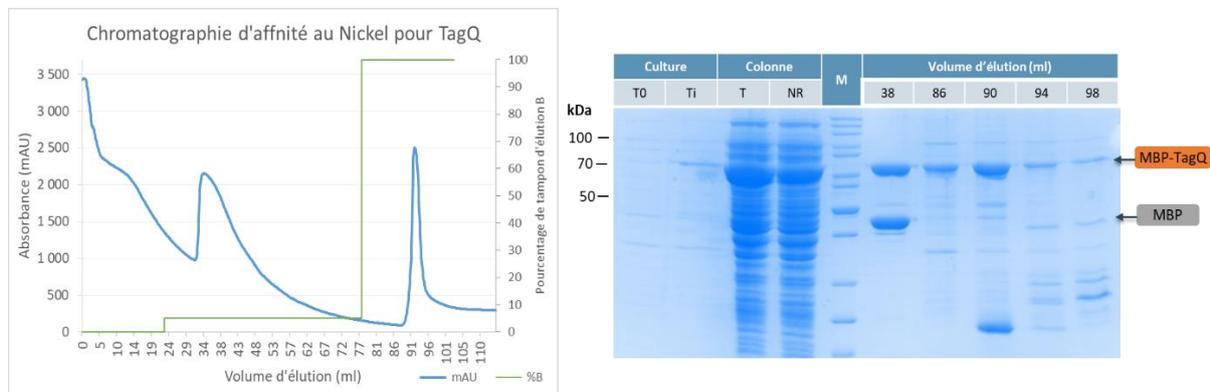


FIGURE 81 : Chromatogramme d'élution de colonne d'affinité au Nickel pour MBP-TagQ et SDS-PAGE associé. La comparaison entre les fractions non-induites (T0) et après induction (Ti) indique que la protéine est bien exprimée par les cellules. La protéine MBP-TagQ est présente parmi les protéines solubles du lysat (T). Une partie est non-retenue sur la colonne (NR). Une partie est aussi éluée dans le lavage (Volume d'élution : 38 ml). Lors de l'élution, on retrouve bien une majorité de protéine MBP-TagQ.

L'étape suivante consiste en la coupure de la MBP de la séquence de TagQ. Ceci a été fait avec une protéolyse avec la protéase TEV à un ratio 1 : 30 de TEV / MBP-TagQ durant 3 heures à température ambiante. La protéine TagQ a alors été séparée de la TEV et de la MBP par chromatographie d'affinité inverse comme pour TagR. La Figure 82 indique que TagQ a été éluée dans le volume non retenu par la colonne.

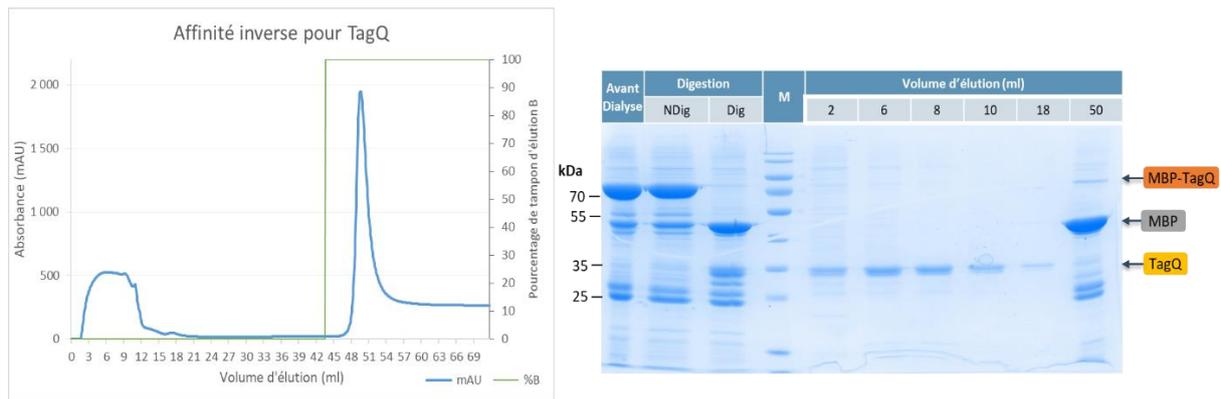


FIGURE 82 : Chromatogramme d'élution de colonne d'affinité au Nickel pour TagQ et SDS-PAGE associé. L'échantillon avant dialyse (contre l'imidazole) contient une majorité de MBP-TagQ. La dialyse ne fait pas précipiter la protéine puisqu'elle est toujours présente après (NDig). Après digestion à la TEV (Dig), l'espèce MBP-TagQ disparaît au profit des espèces MBP et TagQ séparées. TagQ est alors non retenue par la colonne de Nickel alors que la MBP et MBP-TagQ sont retenues sur la colonne et élués avec le tampon d'élution.

Après cette étape la protéine a subi une dernière étape de purification par colonne d'exclusion stérique. Il est possible de voir le profil d'élution sur la Figure 83.

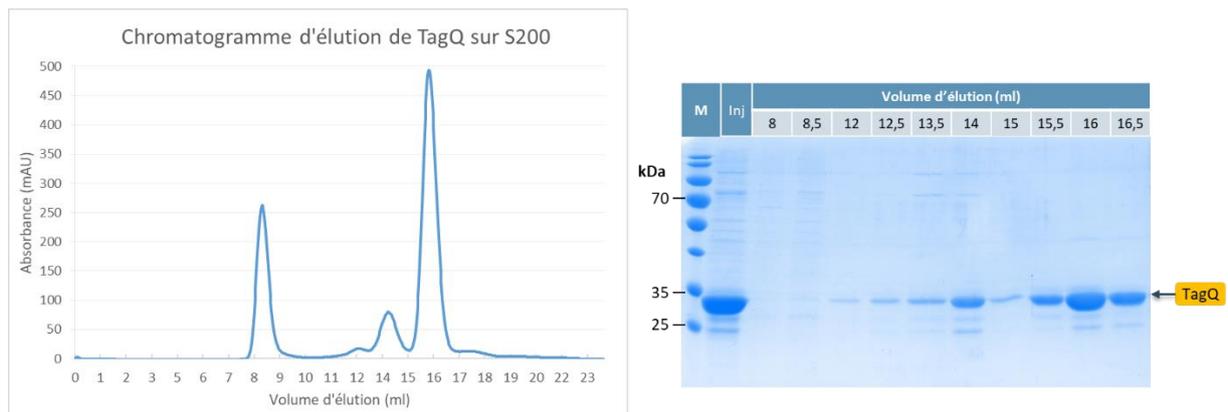
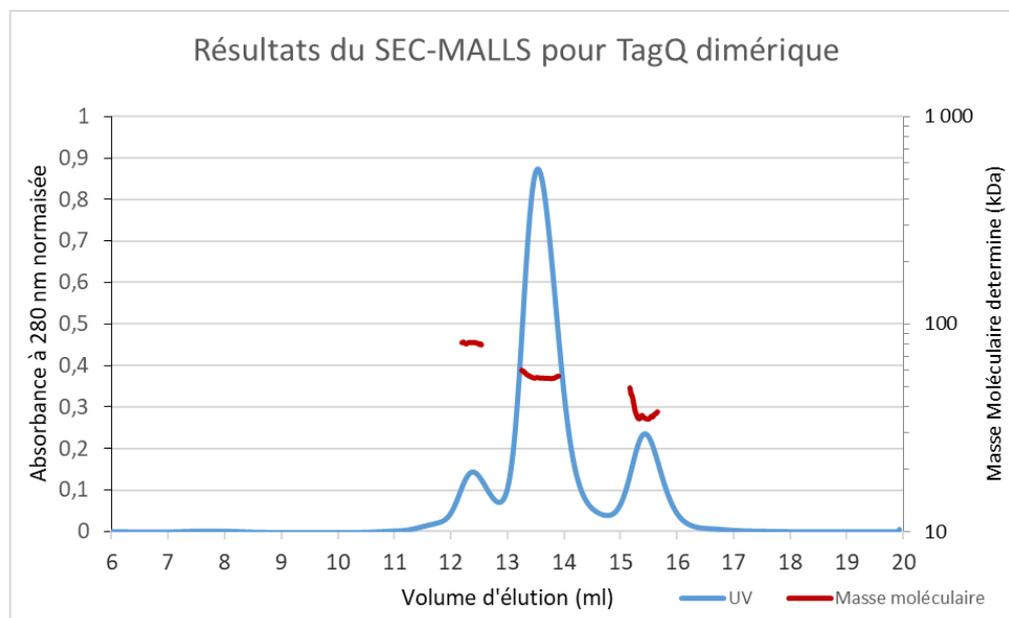


FIGURE 83 : Chromatogramme de l'élution de TagQ sur colonne d'exclusion stérique S200 10/300 et SDS-PAGE associé. Il semblerait qu'une partie de la protéine TagQ se soit agrégée car on observe un pic dans le volume mort de la colonne. Cependant sur gel, TagQ n'apparaît pas, c'est donc probablement une précipitation de contaminant. Ensuite, plusieurs pics sont observés et chacun contient TagQ uniquement. TagQ se comporterait donc comme un monomère ou un dimère.

Il semblerait que la protéine se soit légèrement agrégée durant la concentration car un pic est obtenu au niveau du volume mort. Cependant, sur gel il est possible de voir que ces fractions ne contiennent pas TagQ, il peut alors s'agir de contaminant ayant précipité. Il est aussi possible de voir que TagQ forme des multimères, puisque des pics contenant uniquement TagQ ont été élués avant le pic final. En séparant ces espèces, nous avons pu purifier un monomère et un dimère de TagQ. En fin de purification un échantillon pur et homogène est obtenu.

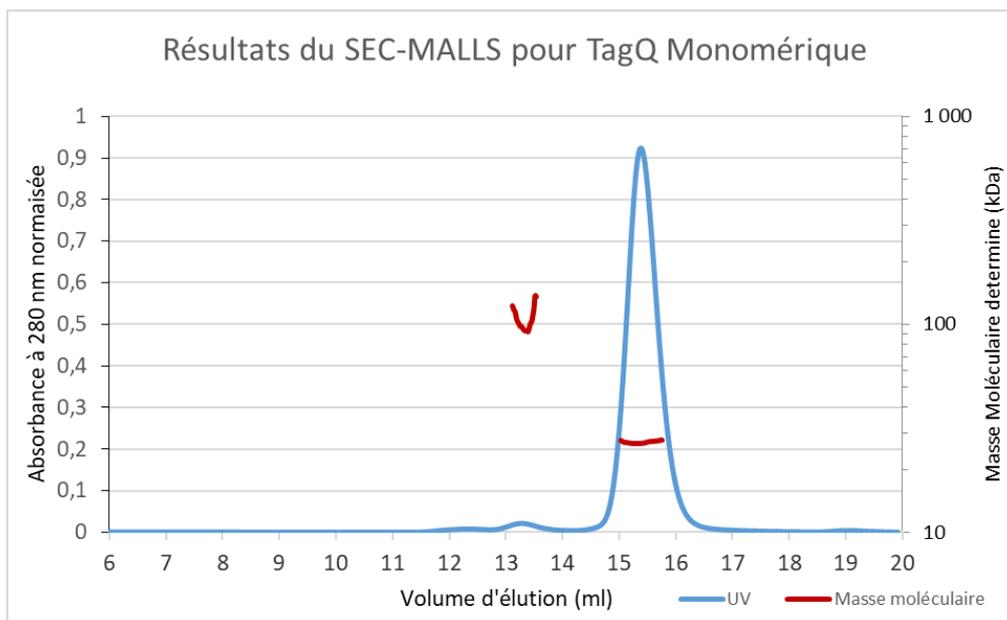
Les deux échantillons séparés de TagQ sous forme monomérique et multimérique ont été contrôlés au SEC-MALLS (disponible en tant que plateforme du PSB) pour bien définir la composition en protéine des différentes espèces séparées.



Masse moléculaire déterminée	Volume d'élution	Polydispersité	Echantillon possible	Fraction totale
55 570 (+/- 1,0 %)	13,7 ml	1(+/- 1,6 %)	Dimère TagQ (28 578 Da x 2 = 57 156 Da)	75,4 %
36 800 (+/- 6,9 %)	16,1 ml	1(+/- 10 %)	Monomère TagQ (28 578 Da)	17,2 %
81 170 (+/- 2,3 %)	12,7 ml	1(+/- 3,8 %)	Trimère TagQ (28 578 Da x 3 = 85 734 Da)	7,4 %

FIGURE 84 : Résultats obtenus avec le SEC-MALLS sur l'échantillon TagQ multimérique (S200 10/300). Le profil d'élution est détecté avec les UV (en bleu). La masse moléculaire des espèces déterminée par le MALLS est présentée en rouge. Les résultats du MALLS sont indiqués dans le tableau. Il est possible de voir que TagQ peut former différentes espèces en solution allant du monomère au trimère.

Le pic majoritaire (75 % de la fraction totale) est formé par une espèce dont la masse correspond à un dimère de TagQ. Un monomère et un trimère sont aussi observables mais les statistiques d'erreurs de polydispersité et de masse moléculaire sont de qualité inférieure que pour le dimère. Nous avons ensuite analysé l'échantillon contenant la forme isolée monomérique de TagQ.



Masse moléculaire déterminée	Volume d'élution	Polydispersité	Echantillon possible	Fraction totale
26 820 (+/- 1,28 %)	15,5 ml	1(+/- 2 %)	Monomère TagQ (28 578 Da)	98,8 %
97 360 (+/- 6,9 %)	13,3 ml	1(+/- 15 %)	Trimère TagQ (28578 Da x 3 = 85 734 Da)	1,2 %

FIGURE 85 : Résultats obtenus avec le SEC-MALLS sur l'échantillon TagQ monomérique (S200 10/300). Le profil d'élution est détecté avec les UV (en bleu). La masse moléculaire des espèces déterminées par le MALLS est présentée en rouge. Les résultats du MALLS sont indiqués dans le tableau. D'après les masses déterminées, il est possible de voir que TagQ sous forme monomérique semble être la forme majoritaire de cet échantillon.

Pour cet échantillon, il est possible d'observer que la majorité des espèces observées (98%) sont composées par une protéine dont la masse correspond à un monomère de TagQ. Une espèce dont la masse correspondrait à un trimère de TagQ est aussi observable mais les statistiques d'erreurs sont élevées ce qui rend cette observation discutable.

TagQ sous forme monomérique a donc bien été séparée de la forme dimérique par colonne d'exclusion stérique. Il est intéressant de noter que l'on n'observe pas de reformation du dimère de TagQ après re-concentration de la fraction contenant les monomères. Ceci semble indiquer que cette formation de complexe ne semble pas être médiée par la concentration de la protéine et que ce complexe n'est pas dû à un équilibre entre différentes espèces. Lors d'un complexe formant un équilibre, la purification de l'une des espèces entraîne la reformation des autres. Des profils d'élution sur colonne SEC sont alors identiques malgré la purification de chaque espèce. Ce n'est pas le cas ici.

II.7.2. Caractérisation du complexe TagQ-TagR :

Pour caractériser ce complexe, nous avons utilisé différentes techniques.

Premièrement, nous avons mélangé les échantillons de TagQ sous forme monomérique et de TagR ensemble avant de faire migrer l'échantillon mélangé sur colonne SEC. Si un complexe se forme entre les deux protéines, un nouveau pic d'éluion ne correspondant à aucune autre protéine devrait apparaître. Il est possible de voir le résultat dans la Figure 86 suivante.

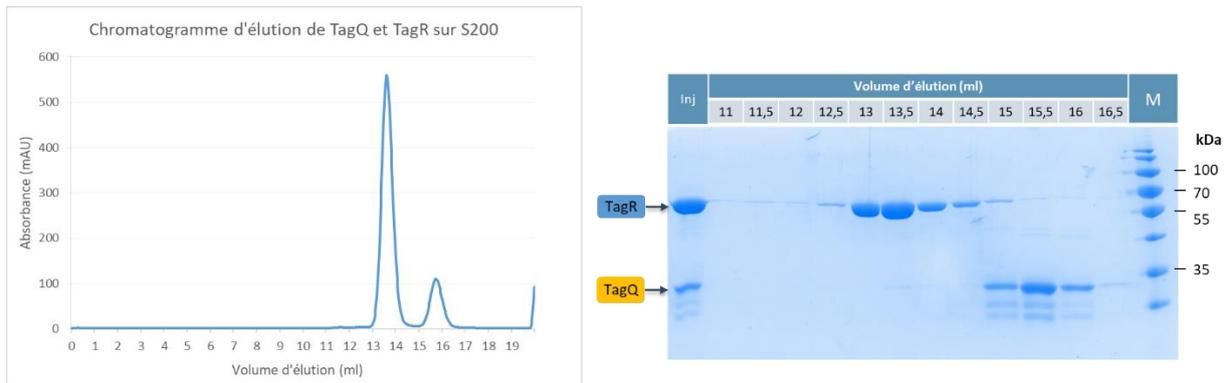
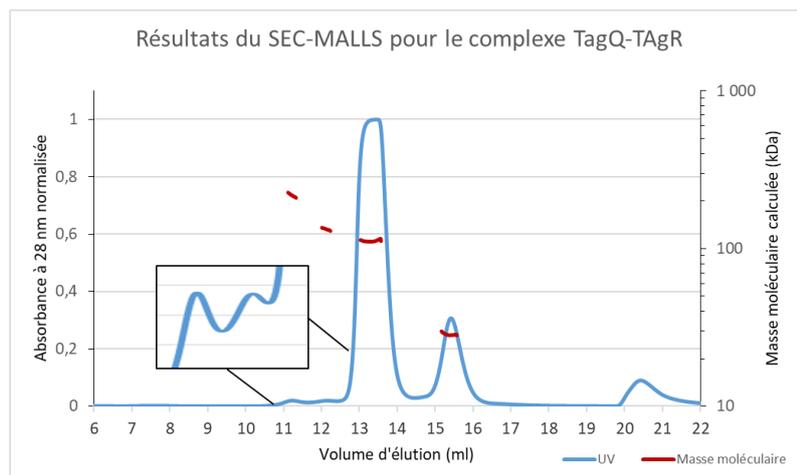


FIGURE 86 : Chromatogramme d'éluion de TagQ et TagR sur colonne S200 et SDS-PAGE associé. Il est possible de voir que les deux protéines sont bien dans l'échantillon injecté sur colonne (Inj). Cependant, deux pics sont observés, chacun contenant l'une des protéines. Aucun nouveau pic n'apparaît, ou aucun pic ne semble contenir les deux protéines. Il ne semblerait pas qu'il y a formation de complexe avec cette technique.

L'incubation des protéines TagQ et TagR ensemble ne permet pas de former un complexe, aucun pic supplémentaire n'apparaît sur le profil d'éluion.

II.7.3. Caractérisation du complexe par SEC-MALLS :

Une dernière expérience a été tentée. En hypothésisant que le complexe nécessite un temps long pour pouvoir être formé, les deux protéines ont été incubées longtemps (une semaine) en chambre froide. L'échantillon a ensuite été utilisé en SEC-MALLS dans le but de détecter une quantité minimale de complexe possible s'il y a et y définir sa stœchiométrie. Deux échantillons concentrés de TagQ et de TagR ont donc été mélangés ensemble et laissés incuber à 4 °C sur 3 jours avant d'être analysées avec le SEC-MALLS. Les résultats sont présentés ici.



Masse moléculaire déterminée	Volume d'éluat	Polydispersité	Echantillon possible	Fraction totale
111 900 (+/- 0,8 %)	13,25 ml	1(+/- 1,3 %)	Dimère TagR (59 712 Da x2 = 119 424 Da)	89,1 %
28 520 (+/- 0,9 %)	15,25 ml	1(+/- 1,3 %)	Monomère TagQ (28 578 Da)	9,5 %
133 100 (+/- 1,8 %)	12,15 ml	1(+/- 2,6 %)	Dimère TagR + Monomère TagQ (59 712 Da x2 + 28 578 Da = 148 002 Da)	0,3 %
218 400 (+/- 0,8 %)	11,15 ml	1(+/- 1,25 %)	Tétramère TagR (59 712 Da x 4 = 238 848 Da)	0,3 %

FIGURE 87 : Résultats obtenus avec le SEC-MALLS sur l'échantillon TagQ et TagR mélangé (S200 10/300). Le profil d'éluat est détecté avec les UV (en bleu). La masse moléculaire des espèces déterminées par le MALLS est présentée en rouge. Les résultats du MALLS sont indiqués dans le tableau. Il est possible de voir que les espèces déjà caractérisées pour chacun des échantillons sont présentes, TagR dimérique et tétramérique, TagQ monomérique. Il est possible de voir l'apparition d'un nouveau pic dont la masse coïncide avec la masse d'un complexe TagQ-TagR.

La protéine TagR étant présente en excès, son pic correspondant (dimère de TagR) rend les autres pics d'éluat plus petits après normalisation. Cependant, on observe les espèces déjà caractérisées précédemment à savoir le dimère et tétramère de TagR. Le monomère de TagQ est aussi présent. En plus de ces espèces, il est possible de voir apparaître un nouveau pic, en amont des pics de TagR et de TagQ. Ce petit pic représente en réalité uniquement 0,3 % des espèces présentes car l'échantillon était saturé en TagR, mais cette quantité a été suffisante pour générer des statistiques fiables quant au calcul de la masse moléculaire et de la polydispersité. La taille de ce complexe est de 133 100 Da ce qui correspondrait à un complexe entre 1 molécule de TagQ et 2 molécules de TagR.

Des criblages ont été tentés avec ce ratio entre TagQ et TagR. 6 plaques de criblage de conditions de cristallisation ont été réalisées à 4 °C et à 20 °C avec un ratio TagQ/TagR de 1 pour 2. (TagQ à 3,5 mg/ml et TagR à 15 mg/ml) Certaines conditions ont généré des semblants de cristaux (voir ci-dessous), et ces résultats continueront à être explorés par d'autres membres du laboratoire.



FIGURE 88 : Potentiels cristaux obtenus lors du criblage de conditions de cristallisation du complexe TagQ/TagR. Les deux protéines ont été utilisées à 3,75 mg/ml et 15 mg/ml. La condition est très similaire à la condition donnant les cristaux de TagR, cependant, lors de la même expérience, ni TagR, ni TagQ ne sont capables de former les mêmes cristaux seuls.

III. Conclusion :

A la fin de ma thèse, nous avons pu déterminer grâce aux techniques d'AUC et de SEC-MALLS que la protéine TagR formait un homodimère *in vitro*. Malgré les ressemblances avec les protéines FGE, TagR semble différer suffisamment pour ne pas partager la même activité.

Concernant l'objectif de résoudre la structure de TagR, la purification de la protéine n'a pas été un problème. La difficulté de ce projet est venue d'une part du fait que cette protéine n'a cristallisé que dans une unique condition, mais aussi du fait que les cristaux obtenus n'ont pas diffracté à une résolution assez haute. En outre, les tentatives pour améliorer ces cristaux par ensemencement et ajout d'additifs n'ont rien changé à leur capacité de diffraction. La structure de TagR n'a donc pas été résolue. Cependant, l'expérience accumulée en travaillant avec TagR m'a permis de développer mes compétences en cristallogénèse et en cristallographie rayons-X pour travailler efficacement à la résolution de la structure d'EpsS (décrite dans la partie suivante de cette thèse).

En ce qui concerne TagQ, nous avons pu définir que TagQ était aussi capable de former des dimères.

Ensuite, concernant le complexe TagQ-TagR, en utilisant le SEC-MALLS nous avons pu avoir des résultats préliminaires indiquant qu'il pourrait être purifié, malgré la faible quantité

qui semble être disponible. Ces résultats ouvrent les portes pour qu'un nouvel étudiant puisse reprendre le projet et éventuellement isoler et caractériser ce complexe important pour l'activation du HSI-I SST6.

IV. Annexes :

Nom de la construction	Nombre d'acides aminés	Masse (Da)	pI	Epsilon (M^{-1}/cm^{-1})	Cystéines	Tryptophanes
TagR (-PS)	570 (548)	61 924 (59 637)	5,8 (5,8)	55 935	3(2)	6(5)
6hMBP-TagR	977	106 801	5,7	123 775	2	13
TagR357	549	59 522	5,8	55 935	2	5
TagR442	549	59 580	5,58	55 935	2	5
6hMBP-TagRShort	870	95 071	5,4	117 815	2	13
TagRShort	442	47 964	5,2	49 975	2	5
TagQ (-PS-LB)	304 (274)	31 716 (28 578)	8,94 (8,94)	22 265(20 650)	6(4)	1
6hMBP-TagQ	703	75 743	6,29	88 490	4	9
6hMBP-	428	47 125	5,6	67 840	0	8

TABLEAU 1 : Tableau récapitulant les différentes caractéristiques biochimiques des protéines et clones de TagR et TagQ. (-SP) = Valeurs après retrait du peptide signal. (-LB) = Valeurs après retrait de la lipobox.



FIGURE 89 : Plaques de cristallisation 24 puits réalisées en chambre froide pour cristalliser la protéine TagR. Chaque puit contient 3 gouttes où TagR a été déposée à des concentrations différentes. Certaines plaques ont un reflet bleuté dû à l'ajout de cuivre dans la solution de cristallisation des puits.

Partie 3 :

EpsS

I. Introduction

I.1. Le système de sécrétion de type 2 :

Le système de sécrétion de type II (SST2) est un système couramment utilisé par des bactéries pathogènes à Gram négatif. Il a pour fonction principale la sécrétion de protéines dans le milieu extérieur, et certaines de ces protéines sont des facteurs de virulences [190]. Parmi les bactéries exprimant le SST2, il est possible de retrouver des bactéries comme *Vibrio vulnificus*, un pathogène d'origine alimentaire responsable de septicémies fréquemment mortelles [191], et *Aeromonas hydrophila*, un pathogène opportuniste infectant peaux, tissus mous et tractus digestif [192]. Tous deux utilisent le SST2 pour sécréter des protéines comme des protéases, lipases et toxines formant des pores comme l'aerolysine [193]. Le SST2 est donc un système ayant un rôle majeur dans le développement de maladies infectieuses et l'étude de sa fonction et, plus en détails, de sa structure sont importants pour enrayer la propagation de ces maladies.

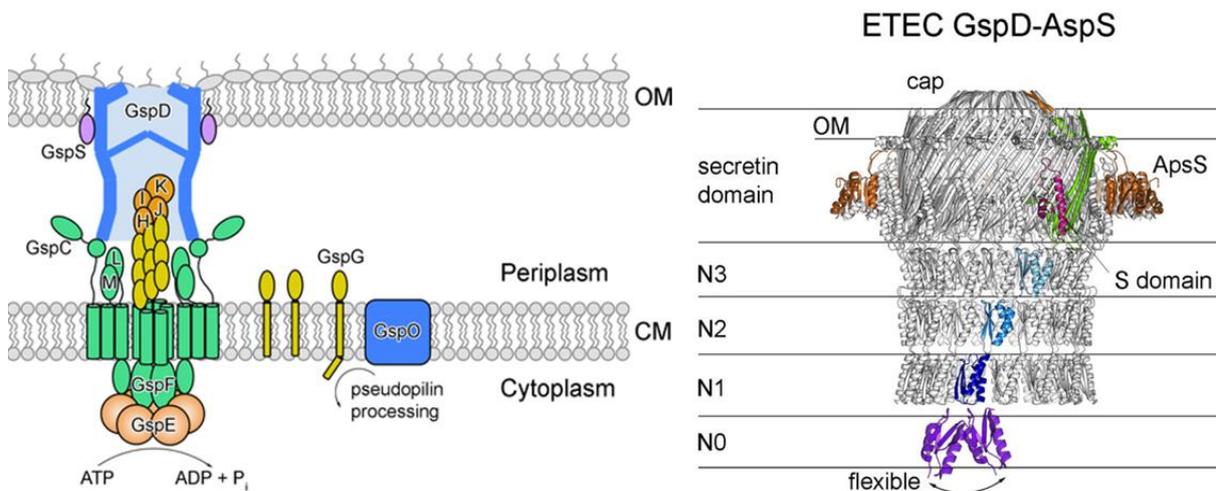


FIGURE 90 : Tiré de [194]. Représentation des protéines composant le système de sécrétion de type II. A gauche, Schéma des protéines composant le système de sécrétion de type II. Les protéines composant la base du système dans la membrane interne sont représentées en vert. Les protéines du pseudo-pilus sont représentées en jaune. La sécrétine est représentée en bleu et sa pilotine en rose. A droite, structure en ruban de la sécrétine et pilotine d'*E. coli* présentée dans l'article [195], le monomère GspD est présenté en couleur, le domaine S, site d'interaction entre pilotine et sécrétine, est indiqué en rouge et la pilotine est représenté en orange.

Le SST2 est un complexe macromoléculaire qui se situe dans la membrane interne bactérienne et s'étend dans le périplasm jusqu'à la membrane externe bactérienne dans laquelle il s'enfonce pour créer un canal. Le cœur fonctionnel du système est constitué de trois

assemblages macromoléculaires qui fonctionnent ensemble : la plateforme du pseudo-pilus, le pseudo-pilus et la sécrétine [196]. Plus précisément, la plateforme, qui est présente dans la membrane interne, est composée par les protéines GspC-E-F-L et M. Cette plateforme supporte un pseudo-pilus qui est composé des protéines GspG-H-I-J et K et dont la croissance dans le périplasma consomme de l'ATP. Cette croissance pousse les protéines secrétées à travers un canal de sécrétion associé à la membrane externe appelé GspD (ou sécrétine). Le système peut utiliser les protéines GspA-B et S qui sont dites accessoires et dont la présence dans le génome bactérien est variable. (Figure 90)

1.2. L'assemblage des sécrétines :

La sécrétine s'étend dans le périplasma jusqu'à la membrane externe ou elle est enchâssée. Elle est formée par multimérisations des protéines GspD, qui s'assemblent seules *in vitro* [197]. Cependant, chez de nombreuses espèces bactériennes, l'assemblage fonctionnel de la sécrétine dans la membrane externe dépend de la présence d'une petite lipoprotéine qui vient se lier au domaine C-terminal de la sécrétine. Celle-ci « pilote » l'assemblage des monomères de sécrétine à travers le périplasma grâce au système LOL (pour Localization Of Lipoprotein) [198]. L'absence de ces protéines « pilotes » ou pilotines chez *Klebsiella oxytoca* et *Dickeya dadantii* a été prouvée comme étant responsable de la localisation du SST2 dans la membrane interne [199]. De plus, l'interaction entre la pilotine et le domaine-S des sécrétines a été montrée par différentes techniques de biophysique et de biochimie. Récemment, de nouveaux types de pilotines, dont les séquences diffèrent totalement des séquences des pilotines précédemment connues, ont été découvertes chez les souches entéropathogéniques et entérotoxigéniques de *E. coli* [200]. Ceci a permis de classer les mécanismes d'assemblage des sécrétines du SST2 en deux types. Les pilotines PulS/OutS qui interagissent avec les sécrétines Gsp α ou de type *Klebsiella* et les pilotines GspS β /AspS qui reconnaissent les sécrétines de types Gsp β ou de type *Vibrio* [201].

En revanche chez certaines bactéries comme chez *Aeromonas hydrophila* par exemple, aucun homologue de pilotine n'a été trouvé dans le génome. Il semblerait que l'assemblage final de la sécrétine soit médié par le complexe ExeAB présent dans la membrane interne [202]. Ce complexe semble interagir avec le peptidoglycane du périplasma bactérien [203] et avec les domaines N0 et N1 de la sécrétine ExeD [204]. Ceci laisse penser que ExeAB pourrait organiser l'assemblage de ExeD directement depuis la membrane interne tout en réorganisant le peptidoglycane pour y permettre son insertion.

Il semblerait donc qu'il y ait différents mécanismes bactériens qui permettent l'assemblage des sécrétines à travers le périplasma : un premier mécanisme qui utiliserait le

système LOL et les pilotines pour un assemblage localisé vers la membrane externe et un second mécanisme qui utiliserait le complexe ExeAB et un assemblage plutôt localisé vers la membrane interne. Il est aussi possible que, chez certaines bactéries, ces mécanismes fonctionnent ensemble pour permettre l'assemblage correct des sécrétines.

1.3. Intérêt du projet et implication

Le but du projet était donc de donner une meilleure compréhension des différents mécanismes d'assemblage des sécrétines, qu'ils soient dépendants ou non des pilotines. Considérant la taille des sécrétines (1 MDa), la microscopie électronique a été la technique envisagée en premier. Cette technique pourrait nous permettre de comparer les différences de structures et donc de mécanismes d'assemblage de 2 sécrétines différentes, une assemblée grâce à la pilotine et l'autre grâce au complexe ExeAB. Le choix s'est porté sur deux organismes présentés précédemment : *V. vulnificus* et *A. hydrophila*, deux pathogènes dont les séquences génétiques des SST2 diffèrent par la présence ou l'absence d'une pilotine, indiquant des mécanismes d'assemblage potentiellement différents.

Peter Howard, de l'université de Saskatchewan, est venu dans notre équipe apportant son expertise sur les sécrétines. Il a été capable d'exprimer les sécrétines de *V. vulnificus* et de *A. hydrophila* en cell-free avec l'aide de Lionel Imbert. Les échantillons de sécrétines purifiées étaient compatibles avec les techniques de cryo-microscopie électronique. Guy Schoehn et Leandro Estrozi de l'équipe de Microscopie électronique de l'IBS ont pu obtenir suffisamment d'images des deux sécrétines pour déterminer leurs structures. Les données ont ensuite été affinées par Leandro Estrozi et Carlos Contreras-Martel pour obtenir les modèles finaux présentés dans l'article [205].

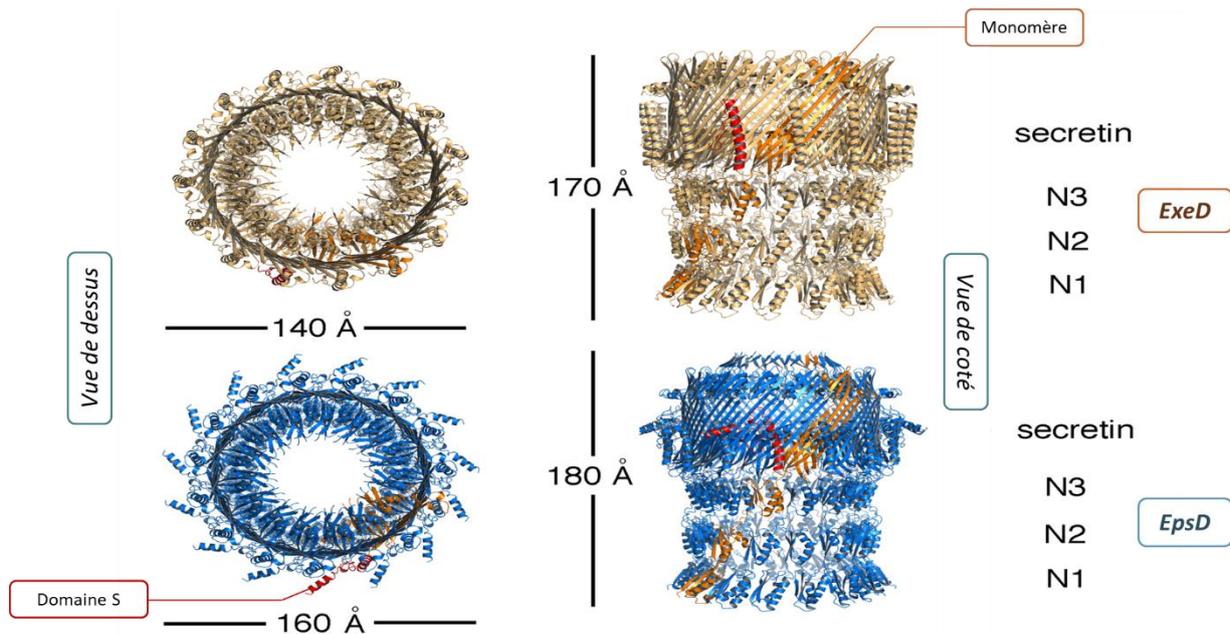


FIGURE 91 : Structure des Sécétines obtenues dans l'article [205]. La sécrétine de *A. hydrophila* est présentée en haut en jaune, la sécrétine de *V. vulnificus* en bas en bleu. Les domaines de chaque monomères (représentés en orange) sont indiqués à droite.

Pour compléter cette étude, il a été décidé de travailler aussi sur la pilotine de *V. vulnificus* dont la structure était inconnue. La cristallographie aux rayons X a été utilisée pour résoudre la structure de la pilotine de taille plus modeste que la sécrétine (14 kDa contre 1 MDa).

Pour ce papier, j'ai donc purifié et cristallisé la protéine EpsS, pilotine de *V. vulnificus*. J'ai ensuite résolu et affiné sa structure. Une équipe a publié, pendant la résolution de la structure d'EpsS, une structure de microscopie électronique à haute résolution d'un complexe pilotine-sécétine homologue [195][205][206]. Par conséquent, nous avons utilisé leurs structures pour modéliser notre complexe et mieux comprendre les interactions potentielles entre pilotine et sécrétine de *V. vulnificus*.

II. Matériels et méthodes :

II.1. Purification d'EpsS :

La construction utilisée a permis l'expression dans le périplasme bactérien (grâce à un peptide signal d'adressage) d'une Maltose Binding Protein (MBP) portant une étiquette 6-histidines en Nter (qui sert d'amorce de repliement et d'aide à la solubilisation). Cette

étiquette est suivie par la séquence d'EpsS séparée de la MBP par quelques acides aminés et un site de clivage spécifique à la protéase TEV (Tobacco etch virus).

Des cellules *E. coli* BL21 contenant le plasmide exprimant cette construction ont été cultivées à 30 °C dans un milieu nutritif LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Lorsque la culture a atteint une OD₆₀₀ de 0,8 l'expression de la protéine a été induite avec 0,4 mM d'IPTG pendant 4 h. Les cellules ont été centrifugées à 12000 g pendant 10 minutes et reprises dans un tampon contenant 10 mM NaPO₄, et 400mM NaCl à pH 7,5 et sont lysées au cell-disruptor avec 3 passages à 10 000 PSI. Le lysat cellulaire a été ensuite centrifugé à 50000 g pendant 30 minutes et le surnageant a été chargé sur une colonne MBP-trap (GE) de 5 ml préalablement équilibrée avec le même tampon. Après un lavage avec 10 volumes de colonne, MBP-EpsS a été élué avec un gradient de 1 mM de Maltose. Les fractions du pic d'éluion ont été rassemblées et digérées pendant 4h à température ambiante suivant un ratio 1 : 50 entre la MBP-EpsS et la TEV. La TEV et la MBP ont été ensuite séparées d'EpsS avec une colonne Ni-NTA équilibrée dans du PBS. La fraction de MBP résiduelle a été finalement séparée avec une dernière colonne MBP-trap. Le volume non retenu par la colonne a été ensuite rassemblé et concentré pour être injecté sur une colonne Superdex S 75 (GE) équilibrée dans un tampon 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7,5. Les fractions contenant EpsS ont ensuite été rassemblées, concentrées et utilisées dans des criblages de conditions de cristallisation.

II.2. Cristallisation d'EpsS :

Les premières conditions de cristallisation en goutte suspendues ont été obtenues en utilisant la plateforme de cristallisation HTX (ISBG, Grenoble). Parmi les différentes conditions qui permettaient la croissance de cristaux, la condition contenant 100 mM HEPES à pH 7,5, 2% PEG 400 et 2 M d'ammonium sulfate a été reproduite manuellement. Les gouttes manuelles suspendues ont été faites par mélange à un ratio 1 :1 de la protéine dans son tampon (25 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl) et de la solution de cristallogénèse pour un volume de 2 µl final. Après différentes tentatives d'améliorations, les oursins obtenus à l'origine sont devenus des petits groupes d'aiguilles puis des plaques plus épaisses. Ces plaques plus épaisses ont été produites dans une condition contenant 0,1 M Tris-HCl pH à 7,5, 1,9 M d'ammonium sulfate et 2,5 % (v/v) de PEG 400 et ont pu être pêchées en séparant les plaques les unes des autres. Ces plaques ont ensuite été trempées dans une solution composée de la précédente condition de cristallisation supplémentée de 25 % (v/v) d'éthylène glycol et ensuite congelées dans de l'azote liquide.

II.3. Collectes de données et résolution de la structure :

La collecte de données s'est déroulée à l'ESRF sur la ligne de lumière ID30A-3 sous un flux d'azote à 100 K. Les données ont été enregistrées sur un détecteur EIGER X 4 M placé à une distance permettant la collecte de données jusqu'à 1,6 Å.

Les données ont été analysées, indexées et mises à l'échelle avec XDS [207] puis importées dans la suite CCP4 [208]. Les cristaux appartenant au groupe d'espace I222 ; grâce à la haute résolution du jeu de données, il a été possible d'utiliser Arcimboldo Schredder [209] pour résoudre la structure en utilisant la structure d'un homologue proche AspS de *V. cholerae* (PDB : 4FTF) comme modèle initial (49 % d'identité de séquence). ARP/wARP [210] a ensuite été utilisé pour reconstruire le modèle à partir de la carte résolue en réduisant les biais du modèle caractéristique du phasage par remplacement moléculaire. Les programmes COOT [211] et REFMAC5 [212] ont ensuite été utilisés pour construire et affiner la structure d'EpsS. Les valeurs de TLS, obtenues à partir du serveur TLSMD [213], ont ensuite été introduites dans les dernières étapes d'affinement pour améliorer la qualité du modèle [214]. Cette qualité du modèle a été vérifiée au long de l'affinement avec MOLPROBITY [215] et PROCHECK [216]. Toutes les figures d'alignement ont été réalisées avec PYMOL.

III. Résultats :

Peter Howard, de l'université de Saskatchewan, a réalisé différentes constructions d'EpsS qui ont toutes été exprimées et cristallisées, mais une seule d'entre elles a permis d'avoir des cristaux de taille suffisante pour être utilisés au synchrotron ; ce sera donc la seule construction qui sera mentionnée ici. Il s'agit d'une construction adressée au périplasma de *E. coli* et dont la MBP (présente dans la construction) a été retirée durant la purification.

Des premiers cristaux ont été observés après criblage de conditions de cristallogénèse avec la plateforme HTX du PSB. J'ai donc tenté d'améliorer manuellement la qualité des cristaux, en testant différentes conditions. Parmi toutes les combinaisons, plusieurs ont permis la croissance de cristaux. Cependant, ces cristaux poussaient en bouquets d'aiguilles, une forme cristalline qui rend difficile la collecte de données de diffraction correctes. L'optimisation des conditions de cristallisation, en augmentant la concentration d'additif (PEG) et en diminuant la concentration de sulfate d'ammonium et de protéine dans les gouttes, a permis la croissance de cristaux plus grands et plus isolés (Voir Figure 92). Cette forme cristalline a été bien plus compatible avec l'utilisation d'une source rayon X synchrotron que les bouquets d'aiguille.

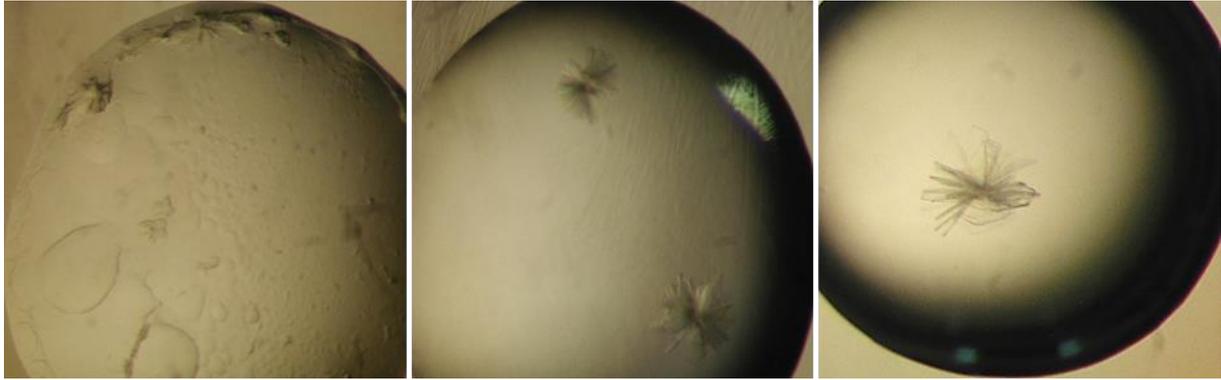


FIGURE 92 : Comparatifs des cristaux obtenus après optimisation des conditions de cristallogenèse. De gauche à droite : Amélioration de la taille et séparation des cristaux d'EpsS au cours des étapes d'optimisation de cristallogenèse. A gauche : conditions originales reproduites manuellement. A droite : types de cristaux qui ont permis l'obtention de la structure. (A gauche : 100 mM Tris pH 7,5 ; 2,2 M de sulfate d'ammonium et 3 % de PEG 400 avec EpsS à 7,7 mg/ml. Au centre : 100mM Tris pH 7,5 ; 2,2 M de sulfate d'ammonium et 2% de PEG 400 avec EpsS à 6 mg/ml. A droite : 100mM Tris pH 7,5 ; 2 M de sulfate d'ammonium et 4 % de PEG 400 avec EpsS à 3 mg/ml.)

Finalement, la structure d'EpsS a été obtenue à partir de l'une des plaques cristallines qui était plus épaisse que les autres et qui a pu être pêchée et a diffracté à une résolution de 1.6 Å.

Lors de l'indexation des données avec XDS le groupe d'espace I222 a été défini pour nos données, ce qui semble cohérent d'après le coefficient de Matthews et la qualité des données de symétrie. L'absence d'extinctions systématiques a indiqué que le de groupe d'espace I212121 n'était pas possible. J'ai coupé la résolution du jeu de données que j'ai traité à 1.75 Å. Avec l'aide de Carlos Contreras-Martel, Arcimboldo a été utilisé pour effectuer le remplacement moléculaire et après reconstruction de la molécule avec le logiciel Arp/Warp, la structure était résolue.

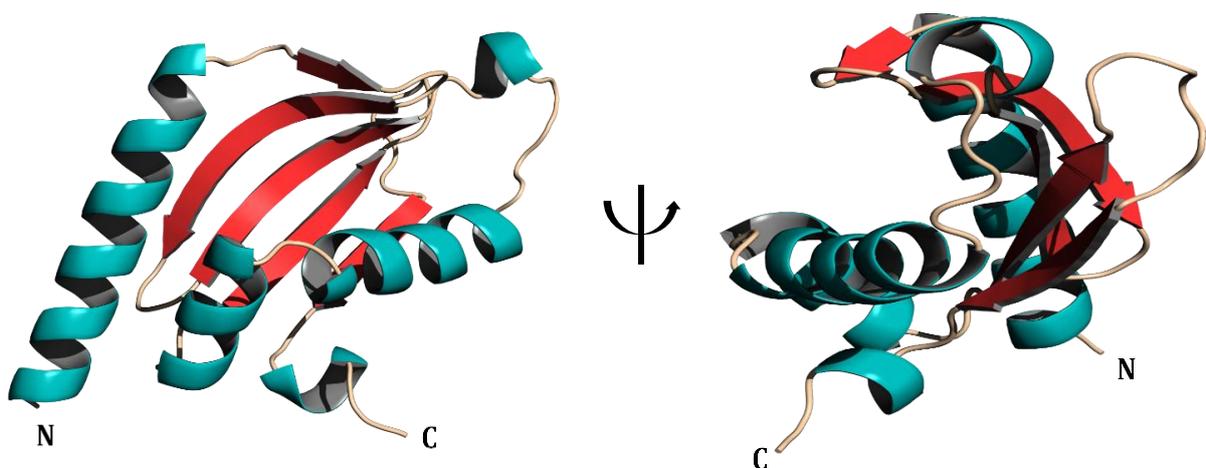


FIGURE 93 : Présentation de la structure d'EpsS. Les feuillets β sont présentés en rouge et les hélices α en bleu. N et C correspondent respectivement aux extrémités N-terminale et C-terminale d'EpsS [205].

Il est intéressant de noter que certaines des densités électroniques ne provenant pas de la protéine semblaient être dues à des atomes de sulfates et des molécules de PEG qui étaient toutes deux présentes dans la condition de cristallisation. EpsS est formé d'un feuillet β antiparallèle à 5 brins qui sont entourés par 4 hélices α . L'ensemble forme une cavité tapissée de résidus hydrophobes dont l'implication dans l'interaction avec EpsD est fortement présumée. (Figure 94)

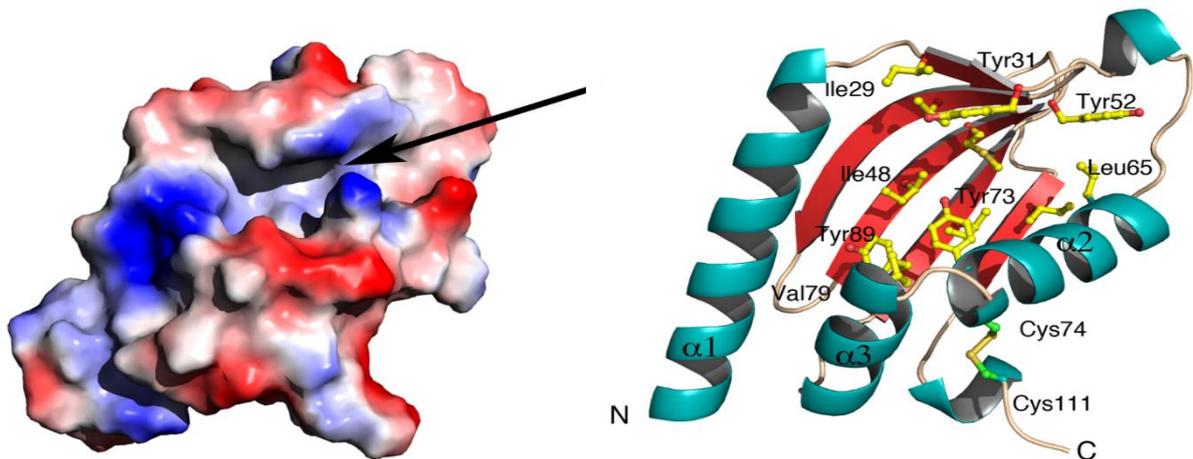


FIGURE 94 Représentation des charges de surface d'EpsS et des résidus hydrophobes présent dans la cavité. Sur la gauche : Représentation des charges de surface D'EpsS. Les charges négatives sont représentées en rouges, les charges positives en bleu et les charges neutres en blanc. La flèche indique la localisation de la cavité indiquée dans le texte. Sur la droite : Structure d'EpsS où les résidus hydrophobes présent dans la cavité précédente sont affichés. Il est à noter la présence d'un pont disulfure en C-terminal stabilisant la structure en liant les hélices précédant et terminant le feuillet β [205].

La comparaison avec la structure par cryo-microscopie électronique du complexe sécrétine-pilotine de *E. coli* ETEC nous a alors servi de modèle pour modéliser une interaction entre notre pilotine et notre sécrétine. EpsD était en position fermée, comme on peut le voir sur la Figure 95 ; il a donc fallu déplacer le domaine-S en position ouverte en le superposant avec le domaine-S de la sécrétine d'ETEC. Une fois ceci fait, j'ai superposé à son tour la structure cristallographique d'EpsS sur la structure résolue par microscopie électronique de la pilotine d'ETEC (Figure 95A).

Le premier fait notable est qu'il manque la partie supérieure de la pilotine d'ETEC (composé du β -1) indiquant la flexibilité de cette région ; alors qu'elle est bien résolue chez EpsS. La cavité étant aussi légèrement plus ouverte chez ETEC, il est possible de penser que la pilotine est capable d'avoir deux conformations différentes ; une ouverte (liée à la sécrétine) et une fermée (non liée) (Figure 95B).

On peut ensuite observer que l'interaction sécrétine-pilotine se fait bien grâce à la cavité d'EpsS et l'hélice α -12 du domaine-S et serait une interaction principalement hydrophobe. Chez EpsD, l'interaction se fait grâce au résidu Ile639, Ala641 et Phe642 de l'hélice α 12 qui sont des résidus strictement conservés entre les sécrétines nécessitant une pilotine pour leur assemblage. Pour les sécrétines de ETEC et EPEC, le résidu Ile639 est remplacé par une Val ce qui reste une mutation conservatrice. Ceci confirme la nécessité du motif Hyd-X-Ala-Phe (ou Hyd est un résidu hydrophobe) chez les sécrétines à assemblage avec pilotine (Figure 95C). (Une mutation sur l'Ala641 pour un acide aminé à chaîne plus longue repousserait l'hélice alpha hors de la cavité ; rompant ainsi l'interaction.)

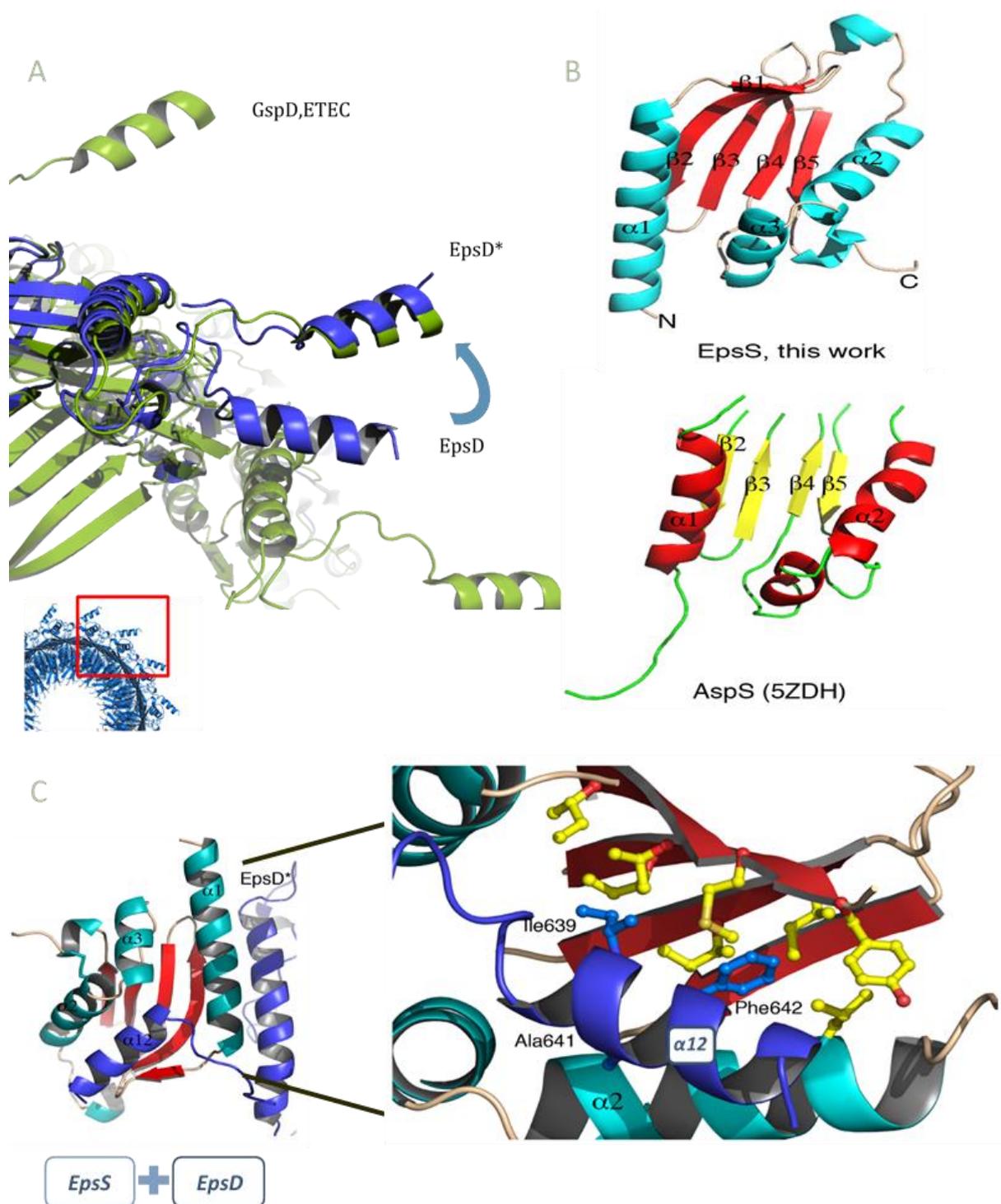


FIGURE 95 : Représentations des différentes étapes de la superposition des pilotines et sécrétines de *E. coli* ETEC et *V.vulinificus* A : Superposition des structures de cryo-microscopie électronique de GspD en vert et EpsD en bleu. La flèche indique le déplacement de l'hélice $\alpha12$ du domaine S d'EpsS lors de l'alignement. Cette nouvelle structure est appelée EpsD*. B : Vue des deux pilotines EpsS (*V. vulnificus*) et AspS (*E. coli* ETEC) selon le même angle. L'absence du feuillet $\beta1$ chez AspS est clairement visible. C : Représentation de la surface d'interaction entre EpsS et l'hélice $\alpha12$ du domaine S d'EpsS après alignement des différentes structures. Les acides aminés nécessaires à l'interaction chez notre sécrétine sont indiqués sur la figure.

IV. Conclusions :

Durant cette étude, nous avons pu, dans un premier, déterminer les structures à haute résolution de deux sécrétines pour les pathogènes *V. vulnificus* et *A. hydrophila* par microscopie électronique. J'ai pu ensuite résoudre la structure de la pilotine de EpsS de *V. vulnificus*. La modélisation de l'interaction entre l'hélice α 12 de EpsD et EpsS a permis, d'une part, de définir que l'interaction entre les deux protéines était hydrophobique. Mais ceci a aussi permis, d'autre part, de caractériser un motif structural sur l'hélice α 12 des sécrétines semblant indiquer l'interaction de ces sécrétines avec une pilotine, impliquant que les mécanismes d'assemblage des sécrétines contenant ledit motif structural se feraient en partie grâce à une pilotine.

D'un point de vue personnel, ce projet a tout simplement été capital pour moi. Il m'a permis de passer enfin des données de diffraction aux rayons X à la résolution d'une structure. En effet, après avoir passé beaucoup de temps à essayer de résoudre la structure de TagR sans résultats ; être, cette fois, capable d'avoir un jeu de données et de résoudre une structure a été d'un grand intérêt pour moi.

J'ai pu être autonome depuis la purification de la protéine jusqu'à la résolution de la structure, en passant par la production des cristaux, la collecte des données de diffraction aux rayons X et l'analyse des données de diffraction. Ceci, je l'espère, fait de moi un biologiste structural plus compétent qu'au début de ma thèse, capable de résoudre une structure par cristallographie aux rayons X. Cependant, il ne faut pas oublier l'aide de Carlos Contreras Martel (groupe Pathogénie Bactérienne) qui m'a guidé à travers toutes les étapes de la cristallogénèse jusqu'au dépôt de la structure.

Structure and assembly of pilotin-dependent and -independent secretins of the Type II Secretion System [205]:

Howard et al. (2019)

RESEARCH ARTICLE

Structure and assembly of pilotin-dependent and -independent secretins of the type II secretion system

S. Peter Howard^{1*}, Leandro F. Estrozi², Quentin Bertrand², Carlos Contreras-Martel², Timothy Strozen¹, Viviana Job², Alexandre Martins², Daphna Fenel², Guy Schoehn^{2*}, Andréa Dessen^{2,3*}

1 Dept. Biochemistry, Microbiology and Immunology, College of Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada, **2** Univ Grenoble Alpes, CNRS, CEA, Institut de Biologie Structurale (IBS), Grenoble, France, **3** Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), CNPEM, Campinas, São Paulo, Brazil

* peter.howard@usask.ca (SPH); guy.schoehn@ibs.fr (GS); andrea.dessen@ibs.fr (AD)



OPEN ACCESS

Citation: Howard SP, Estrozi LF, Bertrand Q, Contreras-Martel C, Strozen T, Job V, et al. (2019) Structure and assembly of pilotin-dependent and -independent secretins of the type II secretion system. *PLoS Pathog* 15(5): e1007731. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007731>

Editor: Tomoko Kubori, Gifu University, JAPAN

Received: November 9, 2018

Accepted: March 26, 2019

Published: May 13, 2019

Copyright: © 2019 Howard et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The atomic coordinates and the cryo-EM maps were deposited in the PDB and EMD, respectively, under the accession codes 6I1X and EMD-0326 (ExeD) and 6I1Y and EMD-0327 (EpsD). The final refined model coordinates and structure factors for EpsS were deposited in the Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org>, PDB code 6I2V).

Funding: SPH was supported by a Discovery grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, and QB was supported by a graduate fellowship within a grant

Abstract

The type II secretion system (T2SS) is a cell envelope-spanning macromolecular complex that is prevalent in Gram-negative bacterial species. It serves as the predominant virulence mechanism of many bacteria including those of the emerging human pathogens *Vibrio vulnificus* and *Aeromonas hydrophila*. The system is composed of a core set of highly conserved proteins that assemble an inner membrane platform, a periplasmic pseudopilus and an outer membrane complex termed the secretin. Localization and assembly of secretins in the outer membrane requires recognition of secretin monomers by two different partner systems: an inner membrane accessory complex or a highly sequence-diverse outer membrane lipoprotein, termed the pilotin. In this study, we addressed the question of differential secretin assembly mechanisms by using cryo-electron microscopy to determine the structures of the secretins from *A. hydrophila* (pilotin-independent ExeD) and *V. vulnificus* (pilotin-dependent EpsD). These structures, at approximately 3.5 Å resolution, reveal pentadecameric stoichiometries and C-terminal regions that carry a signature motif in the case of a pilotin-dependent assembly mechanism. We solved the crystal structure of the *V. vulnificus* EpsS pilotin and confirmed the importance of the signature motif for pilotin-dependent secretin assembly by performing modelling with the C-terminus of EpsD. We also show that secretin assembly is essential for membrane integrity and toxin secretion in *V. vulnificus* and establish that EpsD requires the coordinated activity of both the accessory complex EpsAB and the pilotin EpsS for full assembly and T2SS function. In contrast, mutation of the region of the S-domain that is normally the site of pilotin interactions has little effect on assembly or function of the ExeD secretin. Since secretins are essential outer membrane channels present in a variety of secretion systems, these results provide a structural and functional basis for understanding the key assembly steps for different members of this vast pore-forming family of proteins.

Matériels et Méthodes :

La partie matériels et méthodes est divisée en deux parties principales. La première traitera de la problématique de comment obtenir une protéine pure à partir d'un gène. Cette partie comprend donc les explications concernant toutes les expériences de bio-informatique, biologie moléculaire et de biochimie qui sont utilisées au long de cette thèse. La deuxième partie explique plus en détails les expériences de biophysique qu'il est possible de faire une fois l'échantillon purifié. Dans cette partie se trouve le détail, entre autres, des expériences d'AFM, SEC-MALLS, Cristallographie rayons X et RMN.

I. Du gène à la protéine purifiée :

I.1. Bio-informatique :

Avant le clonage d'un gène, il convient de vérifier la teneur de la séquence en acides aminés pour noter la présence de différents motifs importants. Les vérifications les plus simples se font directement à partir de la séquence en acides aminés et sont faisables à partir du serveur en ligne Protparam [217]. La présence de cystéines ainsi que leur nombre doit être vérifiée afin d'envisager ou non la possibilité de la présence de ponts disulfures (Intra et/ou inter moléculaire) afin d'adapter le protocole de purification en conséquence. Ensuite, dans une optique de possibles expériences de cristallographie rayons X et si aucun homologue n'est disponible, il faut vérifier la présence de méthionines. Celles-ci permettront l'incorporation de méthionines sélénées qui seront utiles pour résoudre la structure de la protéine en question. Protparam indique aussi le point isoélectrique de la protéine étudiée, donnée utile concernant la purification (où il faut chercher à s'en éloigner pour gagner en solubilité) et la cristallisation des protéines (où il faut chercher à s'en rapprocher pour diminuer la solubilité).

D'autres observations peuvent être menées avec des outils de bio-informatiques plus poussés. De manière plus spécifique, la présence d'un peptide signal peut aussi être vérifiée et enlevée afin d'éviter de possibles agrégations (Vérifié grâce à SignalP [218] ou XtalPred [219]). La présence de structures secondaires peut être estimée avec le serveur Jpred4 [220].

La présence d'homologues peut être vérifiée à partir de la séquence grâce à de nombreux serveurs comme HHpred [221] ou Blast [222]. Les homologues peuvent permettre de mieux comprendre la fonction de la protéine mais aussi donner des informations concernant la purification de la protéine.

D'autres serveur comme Phyre² [223], Robetta [224], ou Swiss-model [225], sont capables de proposer des modèles de la structure de la protéine étudiée en se basant sur la structure des homologues lorsque celle-ci est disponible. Plus les homologues seront proches

de la séquence de la protéine soumise au serveur, plus les modèles fournis seront robustes et crédibles.

Certains serveurs, comme le serveur SERp [226], peuvent aussi prédire les portions de la séquence en acides aminés qui seraient exposées à la surface de la protéine. Certains des acides aminés de surface peuvent être flexibles et dynamiques (tels que la lysine ou l'arginine) et augmentent alors localement l'entropie, ce qui peut être délétère à la cristallogénèse de la protéine. Le serveur indique donc les différents résidus flexibles prédits comme étant à la surface pouvant être mutés pour réduire cette entropie locale, augmentant ainsi les chances de cristallisation.

I.2. Biologie moléculaire :

Toutes les expériences de biologie moléculaire ont été faites en respectant les protocoles commerciaux fournis avec les enzymes utilisés. Les principales techniques utilisées sont le clonage classique avec enzyme de restriction puis le clonage In-Fusion.

Les plasmides utilisés ont été fournis par la plateforme Cell-free du PSB avec la courtoisie de Lionel Imbert ou étaient déjà présent dans le stock de l'équipe PATBAC.

Concernant le projet TagR, le gène codant pour la protéine a été amplifié à partir du génome de PAO1 par PCR. Le gène de TagR a ensuite été inséré dans un plasmide pMAL-p2x permettant l'expression d'un peptide signal, d'une étiquette 6 histidines, d'une MBP (pour Maltose Binding Protein), d'un site de clivage à la thrombine et finalement d'un site de clonage multiple. La séquence de TagR a été introduite dans ce site et la séquence du peptide signal de TagR a été enlevé (un peptide signal étant déjà présent en amont de la séquence). Le site de clivage Thrombine a aussi été remplacé pour un site de clivage à la protéase TEV. Ce même plasmide a ensuite été muté à trois reprises pour obtenir trois constructions différentes à partir la construction originale.

Concernant ExlA, les clones ExlACTer, ExlA-FL et ExlA- Δ Cter étaient déjà présents lors de mon arrivée. Ces clones ont été obtenus depuis l'opéron natif ExlAB de CLJ1 puis optimisés pour l'expression en *E.coli*. Ils ont ensuite été clonés dans des vecteur pET-28.

Les plasmides pIVEX-24 et pIVEX-23 ont été fournis par la plateforme Cell-Free du PSB. Ces plasmides ont été spécialement construits pour améliorer l'expression de protéines en

milieu cell-free [227] [228]. La séquence d'ExIA-FL a aussi été insérée dans les deux plasmides pIVEX.

La validité des plasmides a été vérifiée par séquençage sanger avec la société GATC puis Eurofins Genomics.

I.3. Biochimie concernant l'expression des protéines :

La plupart des techniques de biophysiques nécessitent un échantillon protéique pur et concentré. L'étape de purification est donc cruciale pour permettre la collecte de données correctes avec les techniques de biophysique. Cette purification se fait donc selon le critère de pureté et de quantité. Le choix et la qualité des techniques de purification utilisées dépendra de leur impact sur ces deux variables.

I.3.1. Tests d'expression et expression des protéines étudiées :

Les différentes souches sont cultivées un premier temps en pré-culture, 4 ml de milieu LB ou TB incubés à 37 °C, sous agitation à 200 RPM sur la nuit, puis en culture de 40 ml (LB ou TB)ensemencées au quarantième à partir de la pré-culture. Les cultures sont incubées à 37 °C à 200 RPM jusqu'à une densité optique (OD) à 600 nm d'environ 0,6~0,8. A cette OD₆₀₀ là, l'expression de la protéine est induite avec de l'IPTG ou de l'arabinose, en fonction de l'inducteur du plasmide d'expression. Les 40 ml de milieu de culture sont alors divisés pour que le même volume de culture soit incubé dans différents incubateurs préalablement équilibrés à différentes températures. Les températures d'expression de 16 °C, 25 °C et 37 °C seront testées.

Un échantillon de culture est prélevé avant induction et l'OD est noté. Après induction, des échantillons sont prélevés après 2 h, 4 h et 6 h d'induction ainsi qu'au lendemain. À chaque échantillon prélevé, l'OD₆₀₀ de la culture est noté. Ceci permettra de normaliser la quantité d'échantillon de culture à déposer sur SDS-PAGE afin de comparer la quantité de protéine produite dans chacune des conditions. La meilleure condition de temps et de température d'expression ainsi que de milieu d'induction sera alors définie. Pour les protéines étudiées, ces conditions sont présentées ci-dessous.

Protéine	Température d'expression	Durée d'expression	OD ₆₀₀ d'induction
MBP-TagR*	25 °C	Sur la nuit	0,6 ~ 0,8
MBP-TagQ	25 °C	Sur la nuit	0,6 ~ 0,8
ExIACter*	37 °C	2 heures	~ 1
ExIACter-CF	22 °C	Sur la nuit	X
ExIΔCter*	37 °C	1 heure	~ 1,2
ExIA-FL	22 °C	Sur la nuit	X
ExIB (-PS)	25 °C	Sur la nuit	0,6 ~ 0,8
ExIB-CF	22 °C	Sur la nuit	X

FIGURE 96 : Tableau récapitulant les conditions d'expressions des différentes protéines étudiées ici. L'astérisque indique que l'expression des mutants issus de la protéine en question suit le même protocole.

I.3.2. Lyse des cellules après expression :

La majorité des protéines étudiées dans cette thèse sont solubles, le protocole expliqué ici est donc valable pour les protéines solubles, il diffèrera pour les protéines membranaires.

Après le test d'expression, il est convenu du temps de récolte des cellules approprié après induction. Au temps prévu, les cultures sont donc récupérées et centrifugées dans des pots de 1 L à 9000 g pendant 20 min à 4 °C pour culoter les bactéries et les séparer de leur milieu de culture. Les cellules sont alors reprises dans du tampon de lyse supplémenté par des anti-protéases leupeptine, pepstatine et aprotinine ou de Complete (EDTA-free) en fonction de la sensibilité aux protéases des protéines étudiées.

De la Dnase I, ainsi que 10 mM de MgCl₂ (pour potentialiser l'effet de la DNase) sont ajoutés à l'échantillon qui est alors prêt à être lysé. La lyse se fait par cell-disruptor en passant l'échantillon 4 fois à 18 K PSI.

Le lysat est récupéré et centrifugé à 39000 g pendant 45 min à 4°C. Le surnageant est récupéré et prêt à être chargé sur colonne. Des échantillons du lysat, surnageant et culot sont prélevés afin de vérifier si la protéine est soluble.

1.3.3. Expression pour marquage sélénométhionine :

Lors de la production de protéines marquées par des sélénométhionines, le protocole de production change pour une production en milieu minimum supplémenté. Tous les milieux contiendront l'antibiotique associé à la résistance du plasmide utilisé pour l'expression de la protéine d'intérêt.

Le protocole débute avec une pré-culture dans du milieu LB des cellules exprimant le gène d'intérêt à 37 °C, agité à 200 RPM durant la nuit. La pré-culture est ensuite centrifugée 10 min à 2000 RPM à 4°C et les cellules alors rassemblées dans le culot sont reprises avec du milieu M9. Le milieu est constitué pour 1 L de 750 ml d'eau stérile, de 200 ml de M9 5X, de 2 ml de MgSO₄ à 1 M, de 20 ml de glucose 20 %, de 0,1 ml de CaCl₂ 1 M et de thymine à 200 mg/L. Le M9 5X est composé pour un litre de 42 g de Na₂HPO₄.2H₂O, de 15 g de KH₂PO₄ de 2.5 g de NaCl et de 5 g de NH₄Cl. Les cellules ainsi reprises sont centrifugées comme précédemment et reprises à nouveaux avec du milieu M9, pour éliminer toutes traces de LB. Les cellules sont conservées à 4 °C avant d'être utilisées pour lancer une autre pré-culture dans du M9 sur la nuit, à 37 °C, agité à 200 RPM. Le lendemain, du milieu M9 estensemencé au 40^{ème} avec la pré-culture de la veille et est laissé incubé à 37 °C 200RPM. L'induction se fait à OD_{600nm} = 0,6 avec de l'IPTG à concentration finale 1 mM. 30 minutes avant induction, le milieu est supplémenté avec les acides aminés Lys, Phe, Thr à 100 mg/ml ; les acides amidés Iso, Leu, Val à 50 mg/ml et finalement la sélénométhionine à 60 mg/ml. Après une nuit d'incubation, les cellules sont récoltées et lysées comme indiqué dans le chapitre sur la lyse. Les tampons seront supplémentés avec 5 mM de β-mercaptoéthanol pour éviter l'oxydation des sélénométhionines.

1.3.4. Expression de protéines avec la technique Cell-free :

L'expression de protéines *in vitro* ou Cell-Free est un système d'expression qui permet l'expression de protéines en système acellulaire. Il est couramment utilisé en RMN puisqu'il permet le marquage spécifique d'acides aminés avec des isotopes ¹⁵N, ¹³C ou encore deutérés à moindre coût qu'en culture bactérienne classique. Ce système est aussi très utile pour l'expression de protéines membranaires, car la production peut se faire directement en micelles de détergents ou en liposomes ce qui évite les étapes d'extraction membranaires depuis la bactérie et simplifie les étapes de purification. La protéine ExlACter obtenue par expression cell-free est entière et stable contrairement à celle obtenue par expression bactérienne.

Cette technique utilise la machinerie bactérienne de transcription et de traduction sous la forme d'un extrait bactérien appelé S30. Pour son fonctionnement correct, la réaction est

supplémentée par de nombreux additifs. La dégradation des ressources utilisées par la synthèse protéique est aussi prise en compte. Des enzymes permettant les réactions en charge du réapprovisionnement en réactifs sont aussi incluses dans le Cell-free notamment la régénération de l'énergie consommée. Ceci a permis la différenciation entre deux types d'expression *in vitro*. La première, le batch, où toutes les enzymes et réactifs sont mélangés ensembles simplement. La deuxième, en dialyse, comprend un milieu réactionnel équivalent au milieu en batch. Cependant ce milieu est entouré d'un milieu « nutritif » qui contient des réactifs supplémentaires de faible poids moléculaires qui vont transiter par dialyse jusqu'au milieu réactionnel afin de conserver une concentration constante au cours de la réaction. Ceci permet d'approvisionner le milieu réactionnel avec plus de réactifs qu'en batch mais permet aussi de diluer la concentration de sous-produits inhibiteur de la synthèse, induisant une expression plus longue et plus efficace qu'en batch.

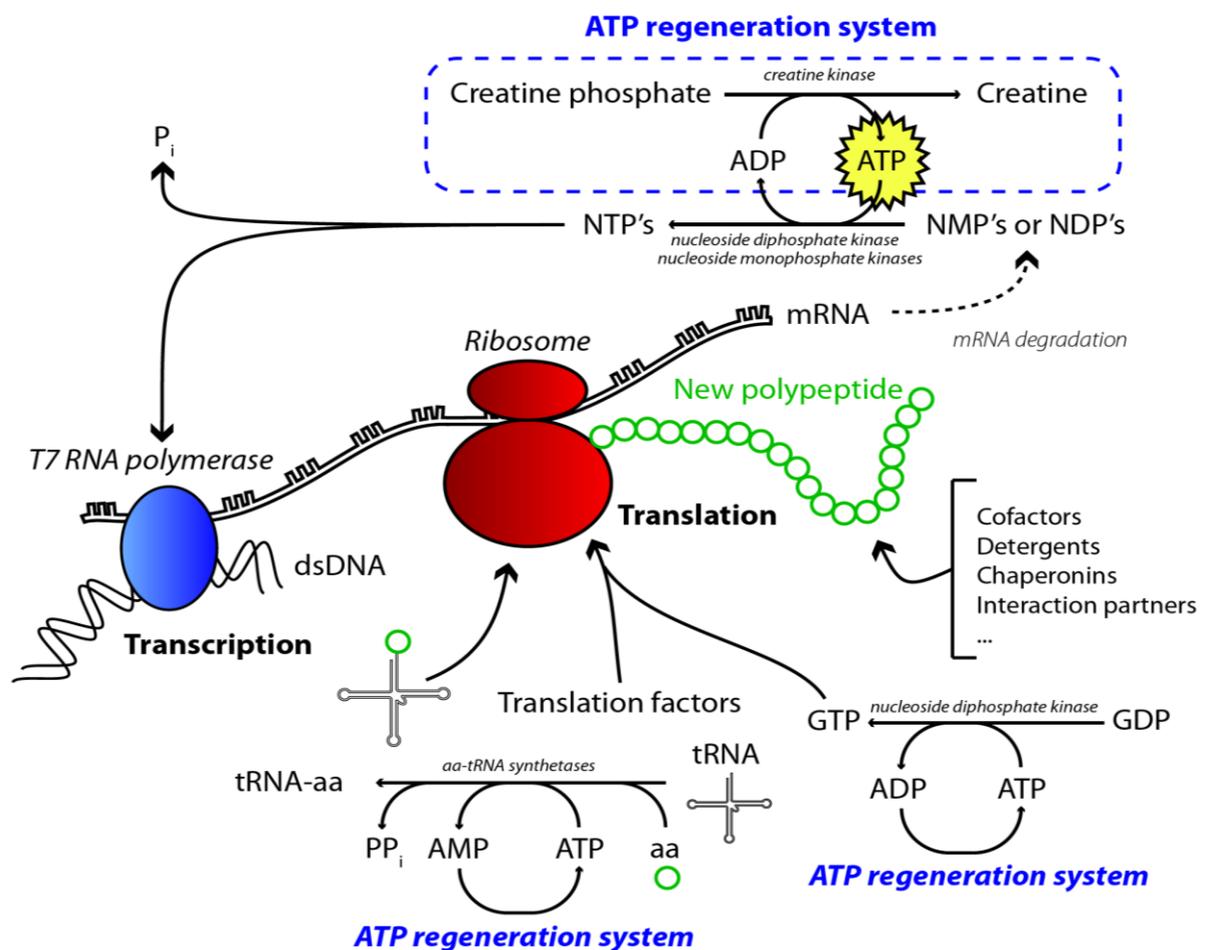


FIGURE 97 : Schéma récapitulatif des réactions impliquées dans la synthèse de protéine « cell-free ». Avec la courtoisie de Lionel Imbert. Tiré de Pedersen. 2011.

Il est toutefois à noter qu'une production plus importante peut gêner la solubilisation des protéines exprimées entraînant ainsi leur agrégation. Le batch redevient alors préférable même si les quantités exprimées sont en général moindres. Ici, la méthode utilisée sera la

dialyse car il n'y aura pas de problème forçant l'utilisation de l'expression en batch. Le tableau des réactifs est présenté ci-dessous.

La première étape consiste à former le mélange d'acides aminés en rassemblant les acides aminés solubles à différents pH dans une seule solution appelée AAmix. Ils seront évidemment les bases de la production de la protéine.

Une deuxième solution, composée de solutés de faible poids moléculaires, est appelée 10XMix . Elle est formée par addition de nucléotides triphosphates servant à produire l'ARNm à partir de l'ADN plasmidique injecté dans la réaction. Ensuite de l'HEPES est ajouté pour tamponner la réaction à pH 7,5, pH optimum pour les réactions enzymatiques du cell-free. De l'acide folinique ainsi que de l'AMPc sont insérés pour améliorer l'initiation de la traduction. Le DTT ajouté à la suite empêche la formation de pont disulfures qui peuvent inactiver certaines réactions et est nécessaire pour l'étape de transcription. La spermidine, le NH₄OAC et le KGlutamate ajoutés améliorent la production en mimant la viscosité du milieu cellulaire.

Ensuite, la préparation du mélange « réservoir » (feeding mix) qui sera à l'extérieur de la dialyse, commence par l'addition des mélanges précédents plus de la créatine phosphate qui servira à régénérer les nucléotides triphosphates. Le magnésium acétate est utilisé comme cofacteur des réactions de synthèse de nucléotides triphosphates et de la transcription. Le mélange « réservoir » est alors dilué avec de l'eau sans RNase puis le pH est vérifié et ajusté à pH 7,5.

Le mélange final est le mélange réactionnel, qui sera à l'intérieur du boudin de dialyse (GEBAFLEX) et qui sera identique au mélange « réservoir » mais supplémenté avec les enzymes et cofacteurs nécessaires à la synthèse protéique. Parmi ces enzymes et cofacteurs se trouvent des tRNAs qui permettent la disponibilité et la formation séquence dépendante de la protéine. Les acides aminés sont chargés sur les tRNA par les amino-acides-tRNA synthétase spécifiques contenue dans l'extrait S30. La créatine kinase ajoutée ensuite est l'enzyme permettant la régénération des nucléotides triphosphates à partir de la créatine phosphate. La T7 RNA polymérase de phage T7 recombinante produit l'ARNm. L'extrait S30 est du cytoplasme bactérien dilué contenant les restes des enzymes, réactifs et cofacteurs bactériens nécessaires à la réaction de synthèse. Finalement, l'ADN d'intérêt est ajouté sous forme de plasmide pour permettre la production de protéine cible, ceci lance le début de la réaction.

Toute la réaction est réalisée en condition « RNases free » ce qui implique un contrôle strict de l'absence de RNases dans les réactifs utilisés ainsi que dans l'eau, les plastiques et la verrerie. Les RNases sont présentes naturellement dans l'environnement et font partie

intégrante du système de défense antibactérien. Leur présence dans le système « cell-free » entrainerait la dégradation de l'ARNm porteur de l'information génétique codant pour la protéine cible, ce qui en réduirait drastiquement la synthèse.

Mix Acides Aminés	(μ l)
50 mM AA solubles dans l'eau (15 mM) (A, G, H, K, P, R, S, V, T)	247,5
50 mM AA solubles dans l'HCl (15 mM) (C, D, E, L, M, N, Q, W, Y)	247,5
50 mM AA solubles dans le KOH (15 mM) (I, F)	247,5
milliQ (stérile)	82,5
TOTAL	825

Mix 10X	(μ l)
100 mM rCTP (0.8 mM)	96,00
100 mM rGTP (0.8 mM)	96,00
100 mM rUTP (0.8 mM)	96,00
2.0 M HEPES (55 mM)	330,00
100 mM ATP (1.2 mM)	144,00
10 mM Acide Folinique (68 μ M)	81,60
100 mM AMP cyclique (0.64 mM)	76,80
1 M DTT (3.4 mM)	40,80
Spermidine 1M (2 mM)	24,00
9.2 M NH ₄ OAc (27.5 mM)	35,87
milliQ (sterile)	178,93
TOTAL	1200

Master Mix	Mélange Réactionnel (MR) (μ l)	Mélange Nourricier (MN) (μ l)
Mix 10X	105,00	1050,00
1M Creatine phosphate (80 mM)	84,00	840,00
Mix Acides Aminés à 15 mM chacun (1 mM)*	70,00	700,00
4 M KGlu (208 mM)	54,60	546,00
1.07 M Mg(OAc) ₂	10,21	157,01
17.5 mg/ml tRNA (0.175 mg/ml)	10,50	0,00
10 mg/ml Creatine kinase (250 μ g/ml)	26,25	0,00
T7 RNA polymerase (1/100e)	10,50	0,00
TOTAL	371,06	3293,01

TABLEAU 2 : Exemple des quantités et concentrations de réactifs nécessaires pour préparer une réaction « cell-free ».

I.4. Biochimie concernant la purification des protéines d'intérêt :

La première étape de purification consiste généralement en une étape de purification par colonne d'affinité. Pour ce faire, un tag d'affinité spécifique doit être inséré par biologie moléculaire dans la séquence de notre construction afin de pouvoir la dissocier spécifiquement des autres molécules présentes dans le milieu d'expression.

I.4.1. Purification par colonne d'affinité au Nickel :

Les colonnes de purification par affinité avec un métal ou (IMAC pour Immobilized Metal Afinity Column) sont des colonnes qui permettent de purifier les protéines grâce à leur affinité avec un certain métal particulier. Ce métal sera fixé sur la résine de la colonne ce qui permettra la rétention de la protéine d'intérêt sur la colonne.

Il arrive que certaines protéines aient une affinité naturelle pour certains types de métaux communément trouvés en biologie. Mais dans la majorité des cas, l'affinité de la molécule d'intérêt n'est pas assez spécifique avec les métaux pour permettre sa purification par ce système. Il est donc assez courant d'insérer dans la construction d'expression, un tag contenant 6 à 10 histidines en amont ou en aval de la séquence de notre protéine. Ces histidines se fixeront de manière spécifique sur les atomes de Nickel fixés sur la colonne.

L'interaction met en jeu deux histidines protonées qui se lieront à 2 des 6 sites de coordinations disponible du Nickel. Le Nickel est immobilisé sur la colonne par liens de 4 de ses 6 sites de coordination avec du NTA (un chélateur), lui-même lié à des billes d'agarose qui constituent la matrice de la colonne.

Dans la plupart des projets présentés ici, la purification sur colonne de nickel se fait en chambre froide avec chargement de l'échantillon sur la colonne avec une pompe péristaltique. Le tampon permettant le chargement de l'échantillon et sa fixation est un tampon de pH supérieur à 6 et contenant au moins 25 mM d'imidazole pour diminuer les interactions non spécifiques de l'échantillon avec la colonne. Après que l'échantillon soit passé entièrement sur la colonne, celle-ci est déplacée sur un système FPLC pour pouvoir enregistrer un chromatogramme d'élution. La colonne est lavée une première fois avec du tampon de chargement puis avec un gradient d'imidazole. Une première fois pour éliminer les contaminants et ensuite pour éluer la protéine d'intérêt.

Les différents tampons dans lesquels les protéines de cette étude ont été purifiées par colonne d'affinité au Nickel sont présentés ici.

Protéine	Tampon de lyse et tampon A	Tampon B
MBP-TagR*	50 mM Tris pH 8,0 ; 200 mM NaCl ; 25 mM imidazole	50 mM Tris pH 8,0 ; 200 mM NaCl ; 300 mM imidazole
MBP-TagQ	50 mM Tris pH 8,0 ; 200 mM NaCl ; 25 mM imidazole	50 mM Tris pH 8,0 ; 200 mM NaCl ; 300 mM imidazole
ExlA _{CTer} *	50 mM Tris pH 8,0 ; 300 mM NaCl ; 25 mM imidazole	50 mM Tris pH 8,0 ; 300 mM NaCl ; 300 mM imidazole
ExlA _{CTer} -CF	50 mM HEPES pH 7,5 ; 300 mM NaCl ; 25 mM imidazole	50 mM HEPES pH 7,5 ; 300 mM NaCl ; 300 mM imidazole
ExlA Δ CTer*	50 mM Tris pH 8,0 ; 300 mM NaCl ; 25 mM imidazole	50 mM Tris pH 8,0 ; 300 mM NaCl ; 300 mM imidazole
ExlA-FL	50 mM Tris pH 8,0 ; 300 mM NaCl ; 25 mM imidazole	50 mM Tris pH 8,0 ; 300 mM NaCl ; 300 mM imidazole
ExlB (-PS)	50 mM Tris pH 8,0 ; 300 mM NaCl ; 25 mM imidazole	50 mM Tris pH 8,0 ; 300 mM NaCl ; 300 mM imidazole
ExlB-CF	50 mM HEPES pH 7,5 ; 300 mM NaCl ; 25 mM imidazole	50 mM HEPES pH 7,5 ; 300 mM NaCl ; 300 mM imidazole

FIGURE 98 : Tableau représentant les tampons utilisés pour purifier les différentes protéines étudiées sur colonne d'affinité au Nickel. La présence de l'astérisque indique que les mêmes tampons ont été utilisés pour la protéine ainsi que ses mutants. Pour ExlB, du détergent OG 1% ou du DDM 0.08% sont ajoutés.

I.4.2. Dialyse et digestion à la protéase TEV :

Pour la construction MBP-TagR, il est nécessaire de séparer TagR de la MBP lors de la purification. Cette séparation se fait par protéolyse avec la protéase TEV. Cependant la TEV est sensible à l'imidazole, une étape de dialyse est alors nécessaire après élution de MBP-TagR de colonne de Nickel. Les fractions contenant MBP-TagR sont rassemblées et placées dans un boudin de dialyse 13 000 MWCO. Ce boudin est placé dans 1 L de tampon 50 mM Tris à pH 8 et 200 mM NaCl. La dialyse se fait sur la nuit en chambre froide à 4 °C. La protéine MBP-TagR est récupérée du boudin pour être digérée avec la TEV. Les conditions ont été mises au point pour la première digestion comme pour un test de protéolyse ménagée. Après mise au point du protocole, il est possible de définir que TagR est séparée de la MBP par clivage à la TEV en 3 h à température ambiante avec un ratio 1/30 TEV : MBP-TagR.

I.4.3. Purification par colonne d'exclusion stérique :

Cette colonne est constituée de billes d'agarose poreuses de tailles définies. Les pores des billes vont laisser passer les molécules suffisamment petites pour y entrer à l'intérieur et exclure les molécules plus larges. Les molécules les plus larges se retrouvent donc à traverser la colonne sans pouvoir rentrer dans les billes desquelles elles sont exclues, diminuant la quantité de solvant accessible à ces molécules. En revanche, les petites molécules en étant capables de pénétrer à l'intérieur des billes, accèdent à plus de volume de solvant. Les molécules à plus fort poids moléculaire sont donc éluées en premières et sont suivies petit à petit par des molécules plus petites, permettant ainsi leur séparation en fonction de leur taille.

La gamme de taille des molécules séparées dépend du maillage des billes. Il convient donc de prendre une colonne qui contient des billes adaptées à l'objet d'étude en question. Dans les travaux présentés, une S200 10/300 GL sera utilisée car elle permet une séparation de molécules globulaires de 10 kDa à 600 kDa. Toutes les protéines étudiées dans cette thèse sont dans cette gamme de masse moléculaire.

Les tampons utilisés pour éluer les différentes protéines avec cette technique sont présentés ici.

Nom de la construction	Tampon SEC
MBP-TagR	50 mM Tris pH 8 ; 175 mM NaCl
MBP-TagQ	50 mM Tris pH 8 ; 175 mM NaCl
ExIACter	50 mM Tri sodium citrate pH 4,0 ; 300 mM NaCl
ExIACter-CF	50 mM Tri sodium citrate pH 4,0 ; 300 mM NaCl
ExIAΔCter	50 mM Tris pH 8 ; 300 mM NaCl

FIGURE 99 : Tableau récapitulant les différents tampons utilisés pour purifier les protéines indiquées par colonne d'exclusion stérique.

II. Expériences biophysiques et caractérisation de l'échantillon :

II.1. Création des liposomes :

Les lipides sont tous obtenus auprès du fournisseur Avanti polar lipids. Ils sont conservés dans du chloroforme à -20°C et passés sous flux d'azote avant d'être stockés et scellés dans un tube en verre. Lors de la préparation des liposomes, la quantité nécessaire de lipides est prélevée dans chaque stock et mélangée dans un tube à essai en verre préalablement nettoyé au chloroforme (pour éviter toute contamination). Le chloroforme du mélange de lipides est alors évaporé sous flux d'azote afin de créer un biofilm lipidique. Ce biofilm sera ensuite repris à la pipette dans le tampon d'intérêt. L'échantillon contenant les lipides sera alors soit soniqué au bain soniquant pendant 2 fois 3 minutes pour obtenir des SUV (Small Unilamellar Vesicle) ou alors extrudé avec un mini extruder (de chez Avanti Polar Lipids) d'abord à travers un filtre 0,4 µm et ensuite un filtre 0,1 µm pour obtenir des LUV (Large Unilamellar Vesicle) de taille précise (21 passages pour chaque). La qualité et l'homogénéité des liposomes est ensuite contrôlée par DLS.

Le tampon choisi pour reprendre les lipides sera dépendant des expériences pour lesquels ils seront utilisés. Pour l'expression cell-free, ils seront repris dans de l'eau purifiée de toute RNAses afin de ne pas interférer avec l'efficacité du système. Pour l'AFM, ils seront repris dans le tampon ExlACTer (50 mM Tri-sodium citrate pH 4,0, 300 mM NaCl) supplémenté de 5 mM de CaCl₂ afin de faciliter l'éclatement des liposomes et l'étalement des lipides sur le MICA. Ensuite, pour toute expérience avec ExlA, ils seront repris dans le tampon final de purification de la protéine associé.

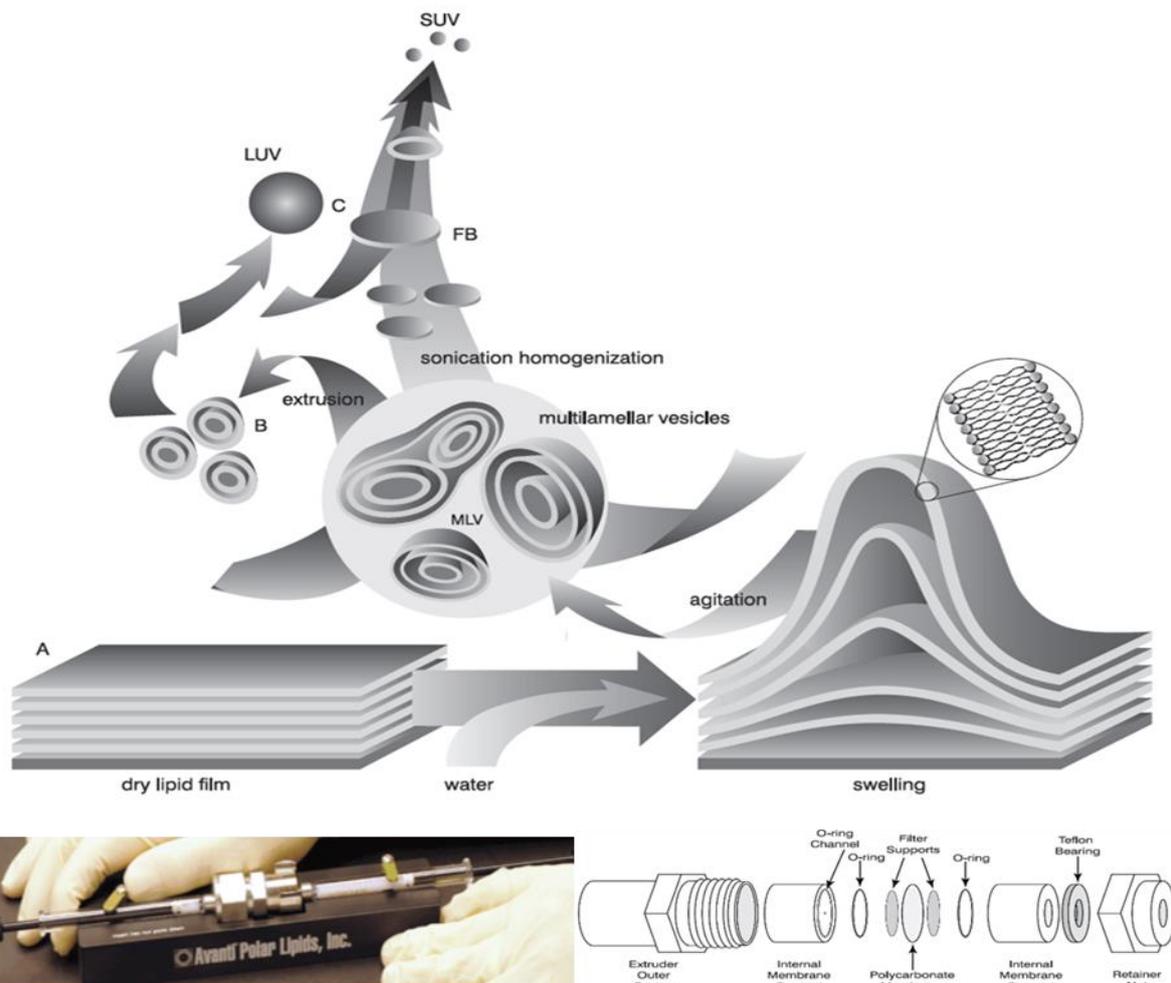


FIGURE 100 : (Adapté de [229] et de posters Avanti Polar Lipids). À partir de la reprise d'un film lipidique en solution, il est possible d'obtenir des liposomes de tailles différentes. La sonication permet la formation de Small Unilamellar Vesicles (SUV) alors que l'extrusion entraîne la formation de Large Unilamellar Vesicles (LUV). Un extrudeur est présenté en bas à gauche. Le passage des lipides d'une seringue à l'autre à travers un filtre permet de produire des liposomes LUV de taille homogène. Cette taille est variable en fonction du filtre choisi. En bas à droite, vue détaillée de l'extrudeur et de la position du filtre dans l'assemblage.

II.2. Expérience de flottaison des liposomes sur gradient de sucrose :

Une solution stock de 90% de sucrose est utilisée pour préparer les différentes couches de gradient en étant mélangées avec du tampon de purification. Pour cette expérience, des LUV d'une taille de 0,1 μm ont été utilisés. Des échantillons de 500 μl ont été préparés en mélangeant 300 μl de liposomes à 4 mg/ml à 50 μl de ExlACter à 2 mg/ml (le tout complété par 150 μl de tampon de purification afin d'atteindre le volume de 500 μl). Les échantillons ainsi mélangés sont incubés 2 h à température ambiante puis mélangés avec 500 μl de sucrose 90% (donnant 1 ml à 45 % de sucrose final). Cet échantillon est déposé au fond d'un tube à ultracentrifugation de 5 ml, et un gradient composé de couches à 35 %, 25 % et 10 % de sucrose est déposé au-dessus délicatement afin d'éviter le mélange du gradient. Une dernière couche est composée de tampon de purification uniquement. Ces échantillons sont ensuite centrifugés à 191 000 g pendant 16 heures à 4 °C. Une fois la centrifugation terminée, des fractions de 500 μl sont récupérés délicatement et analysés par SDS-PAGE pour vérifier la migration de la protéine. Les fractions contenant les liposomes sont détectables par la présence d'une bande blanche formée par les lipides en question. La flottabilité de la protéine est différente de celle des liposomes, ces deux espèces seront donc séparées par la centrifugation s'ils n'interagissent pas.

II.3. Résonance magnétique nucléaire :

Les expériences de RMN ont été réalisées sur la plateforme RMN du PSB avec l'aide d'Adrien Favier. Elles ont été enregistrées sur des spectromètre Bruker de 600 Mhz et 950 Mhz. Les spectres 1 D sont enregistrés à 25 °C en utilisant un échantillon à 0,1 μM dans un tampon 50 mM tri-Sodium Citrate à pH 4,0 et 300 mM NaCl ou un tampon 50 mM HEPES à pH 7,5 et 300 mM NaCl. L'expérience HETSOFast et les valeurs λNOE ont été calculés comme indiqué dans [141].

II.4. Microscopie de Force Atomique :

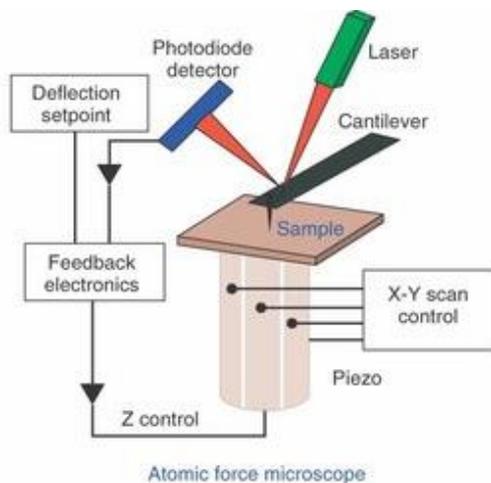


FIGURE 101 : (Tiré de [230]) Schéma des parties et du fonctionnement de l'AFM.

La microscopie de force atomique (AFM pour Atomic Force Microscopy) est une technique qui permet d'imager la surface d'un échantillon [230]. Cet échantillon est déposé sur du mica (le mica est une surface capable d'être extrêmement plane) supportée par un moteur piézo-électrique. Un cantilever disposant d'une fine aiguille est situé au-dessus de l'échantillon à imager. Ce cantilever est capable de renvoyer la lumière d'un laser pointé sur lui vers une photodiode. La position du faisceau laser sur la photodiode va être reliée au moteur piezo. Ainsi, lorsque le moteur piezo approchera l'échantillon du

bout de l'aiguille, le cantilever se relèvera, ce qui induira un déplacement du faisceau laser sur la photodiode. Le moteur piezo réagira alors et compensera le mouvement. Ces informations sont enregistrées et permettent d'obtenir une information très précise sur la surface de l'échantillon [231].

Les expériences d'AFM sont réalisées sur la plateforme du PSB avec l'aide de Jean-Luc Pellequer et Jean-Marie Teulon. Les interactions entre ExIACter et les bicouches lipidiques supportées ont été imagées en conditions liquide sur un Multimode 8, Nanoscope V (Bruker) équipé avec le logiciel Nanoscope (Bruker). Une goutte de 40 μL de liposomes à 0,1 mg/mL dans du tampon 50 mM Tri-sodium Citrate à pH 4,0 et 300 mM NaCl est déposée sur un support de mica. Cette préparation est incubée 2 h à température ambiante ou toute la nuit en chambre humide. Les liposomes en excès ou non organisés en membrane supportée sont éliminés par 3 rinçages de cette préparation par du tampon (40 μL de tampon sont ajoutés puis retirés, cela 3 fois). Une dernière goutte de 40 μL de tampon est ajoutée sur les membranes supportées qui sont ensuite imagées. La fusion correcte des liposomes est observée lorsque de larges bicouches membranaires supportées et ininterrompues sont imagées. La protéine est alors injectée sur ces membranes et des images de son activité sont enregistrées au cours du temps.

II.5. Spectrométrie de masse :

La spectrométrie de masse a été réalisée sur la plateforme disponible au PSB avec Luca Signor. Les échantillons sont ionisés et séparés en fonction de leur masse et de leurs charges. Ce qui permettra d'identifier les masses exactes des molécules de l'échantillon.

II.6. Thermal Shift Assay, (TSA) :

Lors d'une expérience de TSA, l'échantillon protéique est mélangé avec une sonde fluorescente dont l'émission de lumière variera en fonction de sa liaison avec des molécules hydrophobes. Ce mélange subit ensuite une augmentation graduelle de température jusqu'à 100°C. L'augmentation de température va déplier la protéine et exposer ses régions hydrophobes, sur lesquelles viendront se fixer les sondes fluorescentes. La fixation des sondes va entraîner une augmentation de fluorescence qui sera détectable et mesurable et qui indiquera la température à laquelle la protéine s'est dépliée. En fin d'expérience, l'augmentation de température va entraîner une agrégation des protéines et un déplacement des sondes des protéines vers le solvant ce qui va entraîner une diminution de la fluorescence. Cette technique permet de connaître la température à laquelle une protéine se dépie en donnant la valeur (TM). En combinant ceci à un criblage de différents tampons ainsi qu'à l'addition de différents additifs, il est possible d'obtenir différents TM pour la même protéine. Ceci indique alors des différences de température de dépliements en fonction des conditions de l'échantillon. Le déploiement d'une protéine étant liée à la perte de stabilité de la structure tridimensionnelle, la variation du TM sert d'indicateur de la stabilité de la protéine étudiée dans les conditions données.

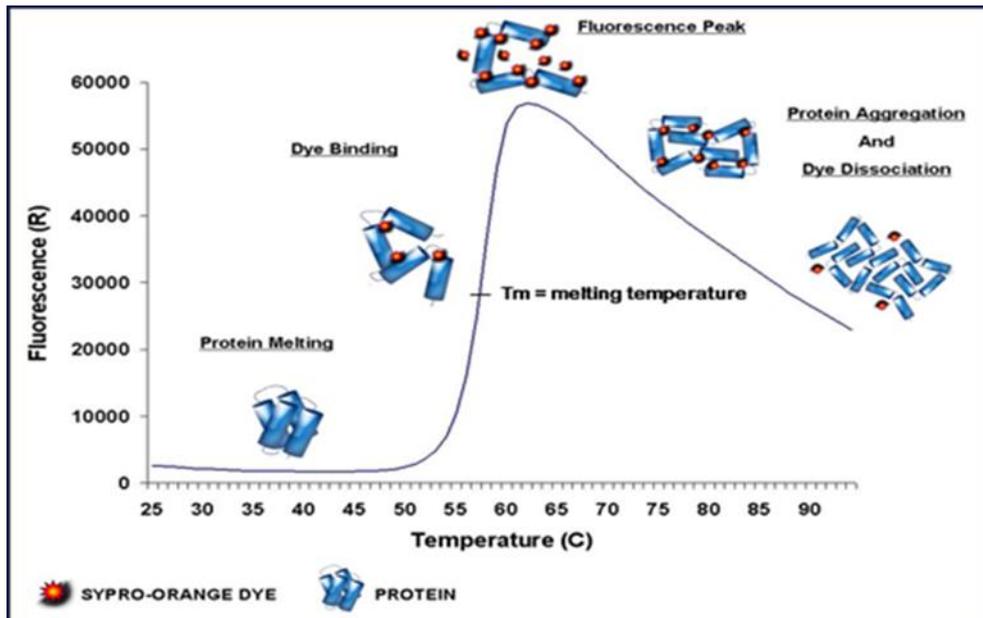


FIGURE 103 : Grace à la fixation d'une sonde fluorescente sur les régions hydrophobe d'une protéine en dépliement, le TSA permet de définir une température à laquelle la protéine d'intérêt se déplie. Cette température est directement corrélée aux conditions dans lesquels la protéine est au moment de l'expérience.

La sonde utilisée est du CYRO orange, le stock commercial est vendu 5000X dans du DMSO. La sonde n'étant pas stable dans l'eau, elle est préparée au moment de l'expérience et est diluée dans l'eau 50 fois (100X). Le volume d'échantillon final est de 25 μ L ; parmi ces 25 μ L, 2 μ L sont apporté par l'ajout de la sonde 100X (elle sera donc utilisée à 8X). Jusqu'à 3 μ L maximum sont apportés par la protéine dont la concentration nécessaire pour obtenir un spectre correct durant l'expérience sera étalonné lors de la première expérience de TSA. Pour TagR, cette concentration est de 0,5 mg/ml. Il reste donc 20 μ L qui seront apportés par le tampon et additif qui seront testés lors de l'expérience. Ce qui, en volume, dépasse largement la quantité de tampon apporté par la protéine et change donc les propriétés physicochimiques de l'échantillon.

II.7. Protéolyse ménagée :

La protéolyse ménagée a été utilisée sur TagR pour tenter d'isoler un domaine stable pouvant cristalliser différemment et nous donner de meilleures données cristallographiques. Plusieurs protéases sont disponibles au laboratoire et ont été utilisée en fonction de leur pH optimal d'activité. Les protéases ont été utilisé à un ratio massique, considérant que TagR est approximativement deux fois plus lourde que les protéases, le ratio molaire entre les deux éléments est facilement calculable. Concernant TagR, les protéases utilisées furent la chymotrypsine, la trypsine et la thermolysine. La concentration finale de TagR dans

l'échantillon digéré est de 1 mg/ml. Des aliquotes de la réaction sont prélevés à des temps définis entre 1 h et 24 h de réaction et sont comparés à un aliquote de l'échantillon non digéré. Les conditions optimales sont obtenues à un ratio 1/500 trypsine : TagR incubé à température ambiante pendant 18 h.

De la même manière, la protéolyse ménagée a aussi été utilisée pour ExIACter afin de vérifier l'insertion de la protéine dans les liposomes. La pepsine a été utilisée car elle reste active à pH 4,0, pH dans lequel est ExIACter au moment de la réaction.

II.8.SEC-MALLS :

Le SEC-MALLS ou Size Exclusion Chromatography Multi-Angle Laser Light Scattering est disponible à la plateforme biophysique de l'ISBG. Il est possible de mesurer les données du MALLS, de l'absorbance UV et de l'indice de réfraction des solutions en sortie de colonne SEC ce qui permet de calculer le poids moléculaire des espèces en solution [144].

Pour aller plus en détails, cette technique permet de calculer la proportion de lumière diffusée par le MALLS. Or la quantité de lumière diffusée par une solution dépend directement du poids moléculaire et de la concentration de ses composants. L'indice de réfraction est aussi mesuré et va permettre de déterminer la concentration exacte de l'échantillon. Le calcul du poids moléculaire de l'échantillon en solution va ensuite pouvoir être mesuré à partir de cette concentration.

Cette technique permet ainsi de définir précisément les poids moléculaires des espèces présentes ainsi que leur homogénéité, ce qui donne des indices concernant la présence de complexes.

Sur la plateforme, les expériences ont été menées avec une colonne S200 10/300 GL préalablement équilibrée soit dans 50 mM de Tri-sodium citrate à pH 4,0 et 300 mM NaCl ou dans 25 mM HEPES à pH 7,5 et 300 mM NaCl pour ExIACter. Ou équilibré dans un tampon 50 mM TRIS à pH 8,0 et 200 mM NaCl pour TagQ-TagR.

II.9.Phase lipidique cubique (LCP) :

Le principe de la LCP se base sur des lipides particuliers qui ont une surface polaire de taille bien moins importante que leur surface hydrophobe. Ils ont ainsi tendance à s'assembler en formant des structures à incurvation négative, à l'opposé des liposomes et micelles qui ont une incurvation positive.[232]

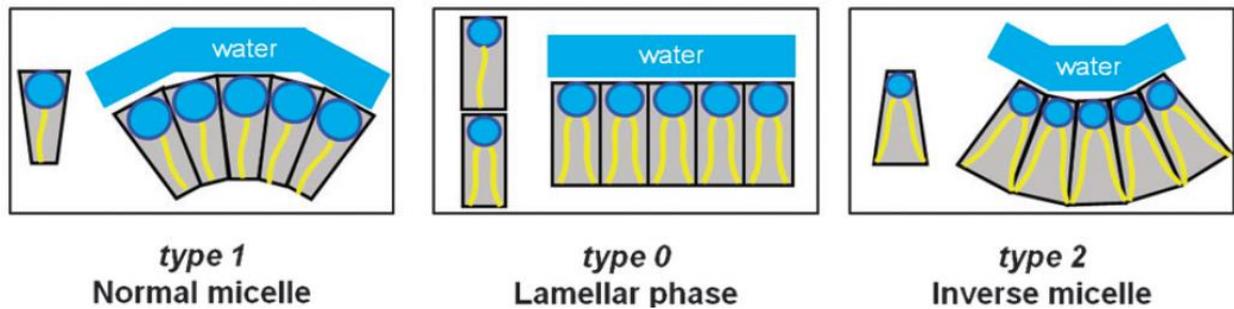


FIGURE 102 : Adapté de [232]. Différentes structures induites par les plusieurs types de molécules amphiphiles. Les régions hydrophiles sont présentées en bleu et les régions hydrophobes en jaunes. Les molécules amphiphiles se différencient par la surface occupée par les régions hydrophobes comparée à la surface occupée par les régions hydrophiles. Lorsque les régions hydrophiles sont plus importantes que les régions hydrophobes (type 1) le volume occupé par la molécule est celui d'un cône inversé, les molécules s'assemblent donc en micelles. On retrouve dans ce cas les détergents par exemple. Ensuite, lorsque les régions hydrophiles et hydrophobes sont de volume similaire, la surface générale de la molécule est cylindrique ce qui lui permet de former des couches lamellaires (type 0). Le lipide biologique PC en est un exemple. Le dernier type de molécules à une surface hydrophobe plus importante que la surface hydrophile. La surface de la molécule peut être associée à un cône et les molécules vont s'associer en formant des structures de micelles inversées (type 2). La monooleine en est un exemple.

Ces lipides s'assemblent donc en structure particulière qu'il est possible de modifier en changeant le ratio lipide/solvant ou la température. Ces structures sont particulièrement intéressantes dans le cas où l'on cherche à cristalliser des protéines membranaires. En effet, la structure lipidique de la LCP sert de support de cristallisation aux protéines d'intérêt en focalisant leur diffusion dans le plan de la phase lipidique.

Les tests de cristallisation en phase lipidiques ont été réalisés avec l'aide de la plateforme HTX. La monooleine utilisée est incubée 30 minutes à 42 °C avant d'être utilisée. La protéine et la monooleine sont ensuite mélangées à un ratio 60 % monooleine / 40 % protéine jusqu'à l'obtention d'une phase homogène. La température tout au long de l'expérience est contrôlée pour rester au plus proche de 20°C afin de rester en phase cubique. ExlA Cter a été utilisée à une concentration de variant de 9 mg/ml à 6 mg/ml et a pu donner quelques cristaux. Il est intéressant de noter que ces cristaux étaient dans des conditions où la LCP devenait sponge phase, une phase lipidiques similaire à la LCP mais avec des canaux de solvants plus larges (dû ici à l'ajout de PEG 400)[165].

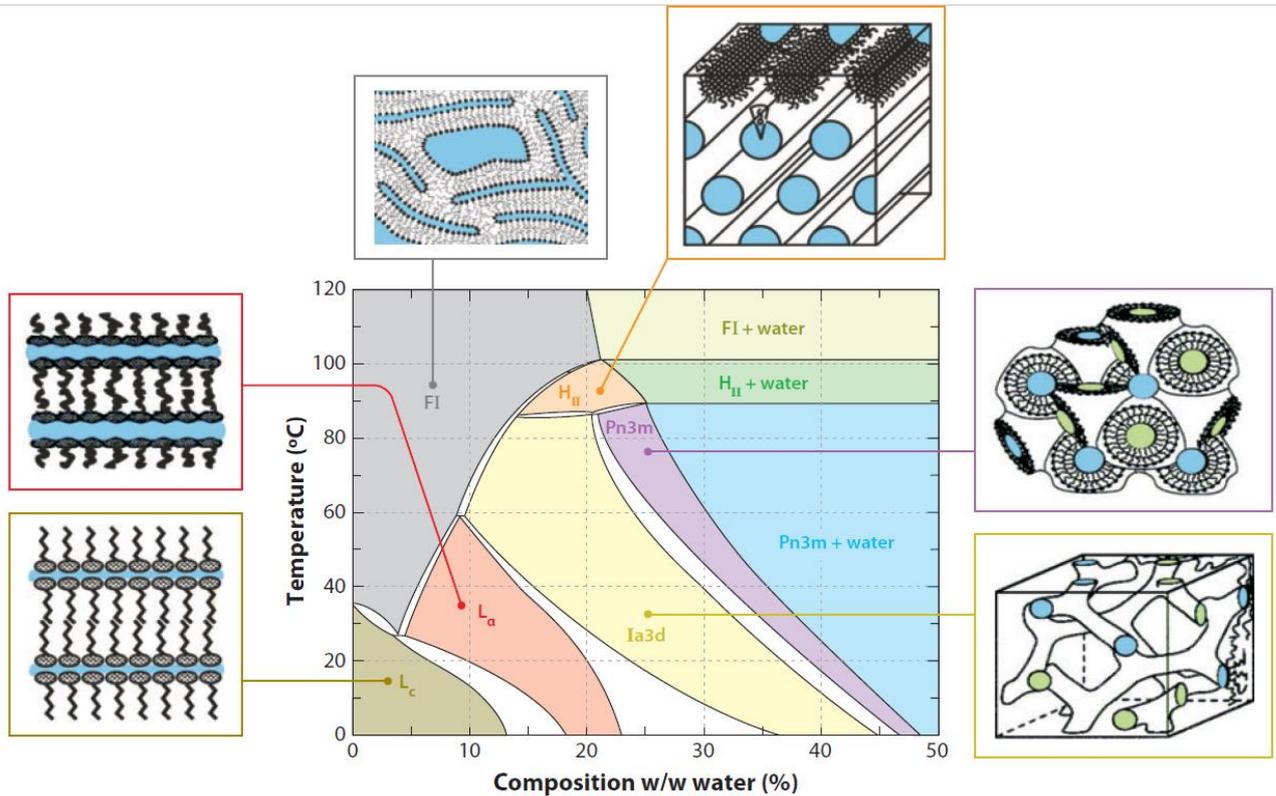


FIGURE 103 : Adapté de ([233]). Diagramme de phase pour la monooleine. L_c est une phase lamellaire cristalline. L_α est une phase lamellaire cristalline liquide. FI est une phase fluide isotropique. H_{II} est une phase hexagonale inversée. Ia3d est une phase cubique en transition depuis la phase cristalline liquide. Pn3m est la phase cubique cherchée, on voit qu'elle est obtenue à 20 °C avec une composition de 40 % d'eau.

II.10. Cristallogénèse par goutte suspendue :

Le criblage et observation de premiers cristaux grâce à la plateforme HTX disponible au PSB, est suivi par la reproduction manuelle de ces cristaux afin de vérifier, d'une part, s'ils sont reproductibles au laboratoire et s'ils peuvent être améliorés en changeant légèrement les conditions de cristallisations obtenues lors du criblage. Des plaques de 24 puits sont alors utilisées pour tester dans chacun des puits une condition de cristallisation différente. Dans chaque puit 1 ml de solution de cristallisation est déposé. Dans le cas d'une goutte de 2 µl à un ratio volumique 1 : 1 ; 1 µl de cette solution sera prélevé et déposé sur une lame de verre puis sera mélangé à 1 µl de l'échantillon de protéine d'intérêt. La lame de verre sera retournée et déposée sur le puits qui sera entièrement scellé avec de la graisse ce qui rendra le puit étanche aux variations extérieures. (La taille de la goutte peut varier ainsi que le ratio solution de cristallisation : échantillon de protéine ce qui va entraîner des changements dans la cinétique de diffusion et de cristallisation.)

Une fois le puit scellé, la goutte va s'assécher par diffusion de vapeur entre le réservoir et elle-même. Ceci va entraîner l'augmentation de la concentration en agent de précipitation et en protéine dans la goutte. Ce qui peut potentiellement entraîner la formation de cristaux.

Pour TagR, les cristaux poussent à 4 °C, les plaques, solutions et lamelles de verres sont donc refroidies en chambre froide. Ces conditions sont donc reproduites et les gouttes sont aussi faites en chambre froide de manière à ce que tout le matériel et les solutions reste à 4 °C. Ceci évite la production de condensation sur les lamelles qui change les propriétés de diffusion de vapeur de manière incontrôlée qui empêche la croissance de cristaux.

Une fois formés, les cristaux de TagR sont pêchés une première fois pour être trempés dans une solution de cryo-conservation contenant les mêmes composés que la goutte du puits ayant permis la cristallisation de la protéine mais supplémentées par 23 % d'éthylène glycol. Les cristaux sont à nouveau pêchés puis congelés dans l'azote liquide pour être amenés sur une ligne synchrotron de l'ESRF.

II.11. Micro et macro-ensemencement :

Lorsque les cristaux obtenus ne sont pas compatibles avec les expériences prévues, il est possible de changer leurs forme grâce au seeding ou ensemencement.

On différencie deux types d'ensemencement, le macro-ensemencement ou le micro-ensemencement [181].

Il existe différentes techniques de micro-ensemencement [184]. La première utilisée ici est la technique dite de « streak-seeding ». Premièrement, des gouttes de cristallisations ont été préparées 1 jour avant l'expérience de micro-ensemencement. Ces gouttes de 2 µL sont composées par 1 µL de TagR à 1,5 mg/ml et 1 µL de sulfate de lithium à 1,11 M, de 100 mM de Tri-sodium citrate à pH 5,6 et de 0,25 M de sulfate d'ammonium. Ces conditions n'induisent pas la croissance de cristaux de TagR. Les gouttes sont laissées à 4 °C pendant 1 jour pour permettre l'équilibration entre goutte et puit. Un cristal préexistant est alors touché par la pointe de la moustache de chat. Cette moustache est passée dans les gouttes précédemment préparées pour les ensemenecer. Le tout est réalisé en chambre froide à 4 °C.

La deuxième technique couramment utilisée consiste à broyer des cristaux existant jusqu'à ce qu'il ne reste que des noyaux cristallins [187]. Pour ce faire, les cristaux sont broyés une première fois avec un petit pilon directement dans la goutte de cristallisation dans laquelle ils ont poussés. Ces premiers cristaux cassés sont pipetés dans un Eppendorf 1.5 ml, dilués jusqu'à un volume de 50 µl avec de la solution mère et agités par vortex avec une microbille en métal. Les noyaux cristallins ainsi obtenus sont prêts à être ajoutés dans les gouttes de cristallisations de 2 µl. Ces gouttes sont constituées de 1 µl de TagR à 1,5 mg/ml et de 1 µl de la solution du puits à 1,11 M de sulfate de lithium, de 100 mM de 100 mM de Tri-sodium citrate

à pH 5,6 et de 0,25 M de sulfate d'ammonium et sontensemencées avec le stock de noyaux précédemment formé. L'ensemencement se fait comme une dilution en cascade de goutte en goutte afin de réduire la concentration des noyaux à chaque goutte.

II.12. Trempage des cristaux :

L'incorporation de métaux lourds est complexe car la fixation du métal à des positions récurrentes dans le cristal n'est pas assurée. Il faut donc faire de nombreux criblages avec différents métaux à différents temps d'incubation du cristal. Pour ce faire, plusieurs cristaux ont été péchés et incubés avec une solution contenant la solution du puit de cristallisation supplémenté avec des métaux lourds. Nous avons tenté d'incorporer des atomes d'Or, de Samarium, de Mercure, d'Osmium et de Gadolinium à une concentration de : 0,25 mM ; 0,5 mM ; 0,75 mM et 1 mM. Pour chaque condition plusieurs cristaux ont été laissés deux heures ou sur la nuit à 4°C puis ont été péchés à leurs temps respectifs pour être congelés dans l'azote liquide. Ils ont ensuite été amenés à l'ESRF pour subir des expériences de diffraction aux rayons X afin de vérifier la présence des atomes lourds et leur impact sur la diffraction des cristaux.

II.13. Diffraction des rayons-X :

Les cristaux congelés sont amenés à l'ESRF où ils sont soumis à un faisceau de rayon X monochromatique. Les expériences de diffractions rayons X ont été menées sur les lignes ID 23-2, ID23-1, ID30-A3, ID30-B, BM14 FIP.

II.14. Traitement des données de diffractions :

Toutes les données de diffractions rayons-X sont analysées, indexées et mises à l'échelle avec XDS [207], puis importées dans la suite de programme CCP4 [208]. Le programme Phaser [234] a été utilisé pour essayer de phaser les données de TagR par remplacement moléculaire. AutoSHARP [235] a été utilisé pour les tentatives de phasage expérimental avec les données où un signal anormal a pu être détecté. Les données étant anisotropiques, le serveur STARANISO [236] a été utilisé pour obtenir des données concernant l'anisotropie de nos jeux de données.

II.15. Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) :

Le SAXS pour « Small Angle X-ray Scattering » est une technique qui permet d'obtenir des données structurales sur des échantillons en solutions. Ceci est l'un des aspects intéressant du SAXS car il permet l'étude des échantillons sans conditionnement préalables tel que la cristallisation de l'échantillon pour la diffraction Rayon X ou le marquage spécifique pour la RMN. Mais ceci limite la résolution atteinte, qui est généralement aux alentours de 20 Å, est qui reste loin de la résolution approchée par la cristallographie Rayon X, la RMN ou la Microscopie Electronique. Le SAXS est aussi très sensible à la qualité et à l'homogénéité de l'échantillon. En effet, le SAXS a tendance à moyenniser les mesures des échantillons observés ce qui rend la présence d'agrégats ou l'hétérogénéité de l'échantillon rédhibitoire pour ces expériences. Cependant, cette technique donne des résultats indiquant la forme générale de l'échantillon (allongé, globulaire, etc...), sont état d'oligomérisation, son rayon de giration et la possible présence de dynamique moléculaire. Cependant, grâce aux informations apportée, elle demeure complémentaire aux techniques de cristallographie rayons X, RMN et Microscopie électronique.

Pour éliminer tous problèmes avec la présence d'agrégats, une colonne d'exclusion par la taille sera placée en amont du détecteur sur la ligne SAXS. Les images de diffusion de l'ensemble de l'élution de la chromatographie seront enregistrées mais seules les images des pics d'intérêt du profil d'élution seront récupérées.

Les données de SEC-SAXS ont été enregistrées à l'ESRF sur la ligne de BIOSAXS BM29. Cette ligne est équipée d'un détecteur Pilatus 1M placé à 2,867 m du détecteur. Les mesures ont été faites à une longueur d'onde de 0,99 Å sur un capillaire d'1 mm. La température est restée constante à 20 °C. La taille du faisceau appliqué sur l'échantillon était de 700 µm par 700 µm et les variations des q est de $0,025 \text{ nm}^{-1}$ à 5 nm^{-1} .

Avant d'être amenés devant le faisceau, les échantillons sont injectés sur une colonne d'exclusion par la taille Superdex S200 10/300 GL équilibrée soit dans 50 mM de Tri-sodium citrate à pH 4 et 300 mM NaCl ou dans 25 mM HEPES à pH 7,5 et 300 mM NaCl. Le traitement des données est fait avec le programme PRIMUS de la suite ATSAS [237]. Le rayon de gyration est estimé avec l'approximation de Guinier. Le programme GNOM de la suite ATSAS a été utilisé pour obtenir la $p(r)$ ou fonction de distribution de distance et les distances intramoléculaires.

Article publié en collaboration avec Alessandro Pagliuso et Pascale Cossart de l'institut Pasteur [238] :
Accepté dans *Cell Host & Microbe*, sortie décembre 2019 :



bioRxiv
THE PREPRINT SERVER FOR BIOLOGY

HOME | ABOUT | SUBMIT | ALERTS / RSS | CHANNELS

Search



Advanced Search

New Results

Comment on this paper

Previous

Next

An RNA-binding protein secreted by *Listeria monocytogenes* activates RIG-I signaling

Alessandro Pagliuso, To Nam Tham, Eric Allemand, Stevens Robertin, Bruno Dupuy, Quentin Bertrand, Christophe Bécavin, Mikael Koutero, Valérie Najburg, Marie-Anne Nahori, Fabrizia Stavru, Andréa Dessen, Christian Muchard, Alice Lebreton, Anastassia V. Komarova, Pascale Cossart

doi: <https://doi.org/10.1101/543652>

This article is a preprint and has not been certified by peer review [what does this mean?].

Abstract

Full Text

Info/History

Metrics

Preview PDF

Abstract

RNA binding proteins (RBPs) perform key cellular activities by controlling the function of bound RNAs. The widely held assumption that RBPs are strictly intracellular has been challenged by the discovery of secreted RBPs. While extracellular RBPs have been described in mammals, secreted bacterial RBPs have not been reported. Here, we show that the bacterial pathogen *L. monocytogenes* secretes a small RBP that we named Zea. We show that Zea binds a subset of *L. monocytogenes* RNAs causing their accumulation in the extracellular medium. Furthermore, during *L. monocytogenes* infection, Zea binds RIG-I, the non-self-RNA innate immunity sensor, potentiating interferon β production. Mouse infection studies revealed that Zea modulates *L. monocytogenes* virulence. Together, this study uncovered the presence of an extracellular ribonucleoprotein complex from bacteria and its involvement in host-pathogen crosstalk

Posted March 17, 2019.

Download PDF

Email

Citation Tools

Subject Area

Cell Biology

Subject Areas

All Articles

Animal Behavior and Cognition

Biochemistry

Bioengineering

Bioinformatics

Biophysics

Cancer Biology

Cell Biology

Clinical Trials*

Developmental Biology

Ecology

Epidemiology*

Bibliographie :

- [1] M. S. Mulani, E. E. Kamble, S. N. Kumkar, M. S. Tawre, and K. R. Pardesi, "Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review.," *Front. Microbiol.*, vol. 10, p. 539, 2019.
- [2] M. Navidinia, "the Clinical Importance of Emerging Eskape Pathogens in Nosocomial Infections," *J. Paramed. Sci.*, vol. 7, no. 3, pp. 43–57, 2016.
- [3] L. B. Rice, "Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE," *J. Infect. Dis.*, vol. 197, no. 8, pp. 1079–1081, Apr. 2008.
- [4] E. Tacconelli *et al.*, "Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis.," *Lancet. Infect. Dis.*, vol. 18, no. 3, pp. 318–327, Mar. 2018.
- [5] S. K. Green, M. N. Schroth, J. J. Cho, S. K. Kominos, and V. B. Vitanza-jack, "Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*," *Appl. Microbiol.*, vol. 28, no. 6, pp. 987–91, Dec. 1974.
- [6] J. B. Lyczak, C. L. Cannon, and G. B. Pier, "Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist," *Microbes Infect.*, vol. 2, no. 9, pp. 1051–1060, Jul. 2000.
- [7] "Infections nosocomiales | Inserm - La science pour la santé," 2015. [Online]. Available: <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/infections-nosocomiales>. [Accessed: 03-Oct-2019].
- [8] S. Elsen *et al.*, "A type III secretion negative clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* employs a two-partner secreted exolysin to induce hemorrhagic pneumonia.," *Cell Host Microbe*, vol. 15, no. 2, pp. 164–76, Feb. 2014.
- [9] J. R. Govan and G. S. Harris, "*Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: unusual bacterial adaptation and pathogenesis.," *Microbiol. Sci.*, vol. 3, no. 10, pp. 302–8, Oct. 1986.
- [10] M. L. Vasil, "*Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology.," *J. Pediatr.*, vol. 108, no. 5 Pt 2, pp. 800–5, May 1986.
- [11] A. Filloux and I. Vallet, "Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne," *médecine/sciences*, vol. 19, no. 1, pp. 77–83, Jan. 2003.
- [12] K. Lee and S. S. Yoon, "*Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 27, no. 6, pp. 1053–1064, 2017.
- [13] J. W. Costerton, P. S. Stewart, and E. P. Greenberg, "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.," *Science*, vol. 284, no. 5418, pp. 1318–22, May 1999.
- [14] A.-P. Magiorakos *et al.*, "Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance.," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 18, no. 3, pp. 268–81, Mar. 2012.
- [15] K. Poole, "Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms.," *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 3, no. 2, pp. 255–64, Apr. 2001.
- [16] M. E. El Zowalaty *et al.*, "*Pseudomonas aeruginosa*: Arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies," *Future Microbiol.*, vol. 10, no. 10, pp. 1683–1706, 2015.
- [17] P. Gilbert, P. J. Collier, and M. R. Brown, "Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response.," *Antimicrob.*

Agents Chemother., vol. 34, no. 10, pp. 1865–1868, Oct. 1990.

- [18] P. A. Lambert, “Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*,” *J. R. Soc. Med. Suppl.*, vol. 95, no. 41, pp. 22–26, 2002.
- [19] C. K. Stover *et al.*, “Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen,” *Nature*, vol. 406, no. 6799, pp. 959–964, Aug. 2000.
- [20] T. R. D. Costa *et al.*, “Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 13, no. 6, pp. 343–359, Jun. 2015.
- [21] E. R. Green and J. Meccas, “Bacterial Secretion Systems: An Overview.,” *Microbiol. Spectr.*, vol. 4, no. 1, Feb. 2016.
- [22] S. Bleves, V. Viarre, R. Salacha, G. P. F. Michel, A. Filloux, and R. Voulhoux, “Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons,” *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 300, no. 8, pp. 534–543, 2010.
- [23] S. Létoffé, J. M. Ghigo, and C. Wandersman, “Secretion of the *Serratia marcescens* HasA protein by an ABC transporter.,” *J. Bacteriol.*, vol. 176, no. 17, pp. 5372–7, Sep. 1994.
- [24] M. Lee, S.-Y. Jun, B.-Y. Yoon, S. Song, K. Lee, and N.-C. Ha, “Membrane Fusion Proteins of Type I Secretion System and Tripartite Efflux Pumps Share a Binding Motif for TolC in Gram-Negative Bacteria,” *PLoS One*, vol. 7, no. 7, p. e40460, Jul. 2012.
- [25] S. Létoffé, P. Delepelaire, and C. Wandersman, “Protein secretion in gram-negative bacteria: assembly of the three components of ABC protein-mediated exporters is ordered and promoted by substrate binding.,” *EMBO J.*, vol. 15, no. 21, pp. 5804–11, Nov. 1996.
- [26] K. Kanonenberg, C. K. W. Schwarz, and L. Schmitt, “Type I secretion systems – a story of appendices,” *Res. Microbiol.*, vol. 164, no. 6, pp. 596–604, Jul. 2013.
- [27] J. Lecher, C. K. W. Schwarz, M. Stoldt, S. H. J. Smits, D. Willbold, and L. Schmitt, “An RTX Transporter Tethers Its Unfolded Substrate during Secretion via a Unique N-Terminal Domain,” *Structure*, vol. 20, no. 10, pp. 1778–1787, Oct. 2012.
- [28] I. Linhartová *et al.*, “RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism.,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 34, no. 6, pp. 1076–112, Nov. 2010.
- [29] N. Mackman and I. B. Holland, “Functional characterization of a cloned haemolysin determinant from *E. coli* of human origin, encoding information for the secretion of a 107K polypeptide.,” *Mol. Gen. Genet.*, vol. 196, no. 1, pp. 129–34, 1984.
- [30] R. A. Welch, E. P. Dellinger, B. Minshew, and S. Falkow, “Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. coli* infections,” *Nature*, vol. 294, no. 5842, pp. 665–667, Dec. 1981.
- [31] K. V Korotkov, M. Sandkvist, and W. G. J. Hol, “The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism.,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 10, no. 5, pp. 336–51, Apr. 2012.
- [32] N. P. Cianciotto, “Type II secretion: a protein secretion system for all seasons,” *Trends Microbiol.*, vol. 13, no. 12, pp. 581–588, Dec. 2005.
- [33] M. Sandkvist, “Biology of type II secretion,” *Mol. Microbiol.*, vol. 40, no. 2, pp. 271–283, Apr. 2001.
- [34] M. Sandkvist, M. Bagdasarian, S. P. Howard, and V. J. DiRita, “Interaction between the autokinase EpsE and EpsL in the cytoplasmic membrane is required for extracellular secretion in *Vibrio cholerae*.,” *EMBO J.*, vol. 14, no. 8, pp. 1664–73, Apr. 1995.

- [35] O. M. Possot, G. Vignon, N. Bomchil, F. Ebel, and A. P. Pugsley, "Multiple interactions between pullulanase secretion components involved in stabilization and cytoplasmic membrane association of PulE.," *J. Bacteriol.*, vol. 182, no. 8, pp. 2142–52, Apr. 2000.
- [36] S. Genin and C. A. Boucher, "A superfamily of proteins involved in different secretion pathways in gram-negative bacteria: modular structure and specificity of the N-terminal domain.," *Mol. Gen. Genet.*, vol. 243, no. 1, pp. 112–8, Apr. 1994.
- [37] S. L. Reichow, K. V. Korotkov, W. G. J. Hol, and T. Gonen, "Structure of the cholera toxin secretion channel in its closed state.," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 17, no. 10, pp. 1226–32, Oct. 2010.
- [38] D. Nunn, "Bacterial type II protein export and pilus biogenesis: more than just homologies?," *Trends Cell Biol.*, vol. 9, no. 10, pp. 402–8, Oct. 1999.
- [39] S. Bleves, R. Voulhoux, G. Michel, A. Lazdunski, J. Tommassen, and A. Filloux, "The secretion apparatus of *Pseudomonas aeruginosa* : identification of a fifth pseudopilin, XcpX (GspK family)," *Mol. Microbiol.*, vol. 27, no. 1, pp. 31–40, Jan. 1998.
- [40] R. Voulhoux *et al.*, "Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway.," *EMBO J.*, vol. 20, no. 23, pp. 6735–41, Dec. 2001.
- [41] K. V. Korotkov and W. G. J. Hol, "Structure of the GspK–GspI–GspJ complex from the enterotoxigenic *Escherichia coli* type 2 secretion system," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 15, no. 5, pp. 462–468, May 2008.
- [42] N. Sauvonnnet, G. Vignon, A. P. Pugsley, and P. Gounon, "Pilus formation and protein secretion by the same machinery in *Escherichia coli*," *EMBO J.*, vol. 19, no. 10, pp. 2221–8, May 2000.
- [43] P. Braun, A. de Groot, W. Bitter, and J. Tommassen, "Secretion of elastinolytic enzymes and their propeptides by *Pseudomonas aeruginosa*," *J. Bacteriol.*, vol. 180, no. 13, pp. 3467–9, Jul. 1998.
- [44] A. Martínez, P. Ostrovsky, and D. N. Nunn, "LipC, a second lipase of *Pseudomonas aeruginosa*, is LipB and Xcp dependent and is transcriptionally regulated by pilus biogenesis components.," *Mol. Microbiol.*, vol. 34, no. 2, pp. 317–26, Oct. 1999.
- [45] H. M. Lu, S. Mizushima, and S. Lory, "A periplasmic intermediate in the extracellular secretion pathway of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A.," *J. Bacteriol.*, vol. 175, no. 22, pp. 7463–7, Nov. 1993.
- [46] R. Rosqvist, A. Forsberg, and H. Wolf-Watz, "Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption.," *Infect. Immun.*, vol. 59, no. 12, pp. 4562–9, Dec. 1991.
- [47] D. Büttner, "Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria.," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 76, no. 2, pp. 262–310, Jun. 2012.
- [48] G. M. Young, D. H. Schmiel, and V. L. Miller, "A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: The flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 96, no. 11, pp. 6456–6461, May 1999.
- [49] T. Izoré, V. Job, and A. Dessen, "Biogenesis, regulation, and targeting of the type III secretion system.," *Structure*, vol. 19, no. 5, pp. 603–12, May 2011.
- [50] T. Kubori *et al.*, "Supramolecular Structure of the *Salmonella typhimurium* Type III Protein Secretion System," *Science (80-)*, vol. 280, no. 5363, pp. 602–605, Apr. 1998.

- [51] J. L. Hodgkinson *et al.*, “Three-dimensional reconstruction of the Shigella T3SS transmembrane regions reveals 12-fold symmetry and novel features throughout,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 16, no. 5, pp. 477–85, May 2009.
- [52] T. Spreter *et al.*, “A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 16, no. 5, pp. 468–76, May 2009.
- [53] C. Perdu *et al.*, “ExsB Is Required for Correct Assembly of the Pseudomonas aeruginosa Type III Secretion Apparatus in the Bacterial Membrane and Full Virulence In Vivo,” *Infect. Immun.*, vol. 83, no. 5, p. 1789, May 2015.
- [54] A. Diepold and S. Wagner, “Assembly of the bacterial type III secretion machinery,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 38, no. 4, pp. 802–822, Jul. 2014.
- [55] C. Pozidis *et al.*, “Type III Protein Translocase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 28, pp. 25816–25824, Jul. 2003.
- [56] A. Diepold, M. Amstutz, S. Abel, I. Sorg, U. Jenal, and G. R. Cornelis, “Deciphering the assembly of the Yersinia type III secretion injectisome,” *EMBO J.*, vol. 29, no. 11, pp. 1928–40, Jun. 2010.
- [57] B. J. Burkinshaw and N. C. J. Strynadka, “Assembly and structure of the T3SS,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1843, no. 8, pp. 1649–1663, Aug. 2014.
- [58] A. Pastor, J. Chabert, M. Louwagie, J. Garin, and I. Attree, “PscF is a major component of the Pseudomonas aeruginosa type III secretion needle,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 253, no. 1, pp. 95–101, Dec. 2005.
- [59] M. Quinaud *et al.*, “Structure of the heterotrimeric complex that regulates type III secretion needle formation,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, no. 19, pp. 7803–7808, May 2007.
- [60] K. Dohlich, A. B. Zumsteg, C. Goosmann, and M. Kolbe, “A Substrate-Fusion Protein Is Trapped inside the Type III Secretion System Channel in Shigella flexneri,” *PLoS Pathog.*, vol. 10, no. 1, p. e1003881, Jan. 2014.
- [61] A. K. J. Veenendaal, J. L. Hodgkinson, L. Schwarzer, D. Stabat, S. F. Zenk, and A. J. Blocker, “The type III secretion system needle tip complex mediates host cell sensing and translocon insertion,” *Mol. Microbiol.*, vol. 63, no. 6, pp. 1719–1730, Jan. 2007.
- [62] A. J. Blocker *et al.*, “What’s the point of the type III secretion system needle?,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 18, pp. 6507–13, May 2008.
- [63] C. Gendrin *et al.*, “Structural basis of cytotoxicity mediated by the type III secretion toxin ExoU from Pseudomonas aeruginosa,” *PLoS Pathog.*, vol. 8, no. 4, p. e1002637, 2012.
- [64] Y. Akeda and J. E. Galán, “Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion,” *Nature*, vol. 437, no. 7060, pp. 911–915, Oct. 2005.
- [65] B. J. Burkinshaw and N. C. J. Strynadka, “Assembly and structure of the T3SS,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1843, no. 8, pp. 1649–1663, Aug. 2014.
- [66] L. Dortet, C. Lombardi, F. Cretin, A. Dessen, and A. Filloux, “Pore-forming activity of the Pseudomonas aeruginosa type III secretion system translocon alters the host epigenome,” *Nat. Microbiol.*, vol. 3, no. 3, pp. 378–386, 2018.
- [67] F. Navarro-Garcia, F. Ruiz-Perez, Á. Cataldi, and M. Larzábal, “Type VI Secretion System in Pathogenic Escherichia coli: Structure, Role in Virulence, and Acquisition,” *Front. Microbiol.*, vol. 10, p. 1965, 2019.

- [68] F. Boyer, G. Fichant, J. Berthod, Y. Vandenbrouck, and I. Attree, "Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources?," *BMC Genomics*, vol. 10, p. 104, Mar. 2009.
- [69] A. Zoued *et al.*, "Architecture and assembly of the Type VI secretion system," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1843, no. 8, pp. 1664–1673, Aug. 2014.
- [70] D. Liebl, M. Robert-Genthon, V. Job, V. Cogoni, and I. Attrée, "Baseplate Component TssK and Spatio-Temporal Assembly of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*," *Front. Microbiol.*, vol. 10, p. 1615, 2019.
- [71] M. G. Renault *et al.*, "The gp27-like Hub of VgrG Serves as Adaptor to Promote Hcp Tube Assembly," *J. Mol. Biol.*, vol. 430, no. 18, pp. 3143–3156, Sep. 2018.
- [72] P. G. Leiman *et al.*, "Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 11, pp. 4154–4159, Mar. 2009.
- [73] M. Basler, M. Pilhofer, G. P. Henderson, G. J. Jensen, and J. J. Mekalanos, "Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure," *Nature*, vol. 483, no. 7388, pp. 182–186, Mar. 2012.
- [74] G. Bönemann, A. Pietrosiuk, A. Diemand, H. Zentgraf, and A. Mogk, "Remodelling of VipA/VipB tubules by ClpV-mediated threading is crucial for type VI protein secretion," *EMBO J.*, vol. 28, no. 4, pp. 315–325, Feb. 2009.
- [75] A. Zoued *et al.*, "TssA: The cap protein of the Type VI secretion system tail," *BioEssays*, vol. 39, no. 10, p. 1600262, Oct. 2017.
- [76] T. G. Sana, B. Berni, and S. Blevès, "The T6SSs of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 and Their Effectors: Beyond Bacterial-Cell Targeting.," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 6, p. 61, 2016.
- [77] J. M. Silverman *et al.*, "Haemolysin coregulated protein is an exported receptor and chaperone of type VI secretion substrates.," *Mol. Cell*, vol. 51, no. 5, pp. 584–93, Sep. 2013.
- [78] J. D. Mougous *et al.*, "A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus.," *Science*, vol. 312, no. 5779, pp. 1526–30, Jun. 2006.
- [79] S. J. Coulthurst, "The Type VI secretion system – a widespread and versatile cell targeting system," *Res. Microbiol.*, vol. 164, no. 6, pp. 640–654, Jul. 2013.
- [80] M.-S. Aschtgen, M. Gavioli, A. Dessen, R. Llobès, and E. Cascales, "The SciZ protein anchors the enteroaggregative *Escherichia coli* Type VI secretion system to the cell wall," *Mol. Microbiol.*, vol. 75, no. 4, pp. 886–899, Feb. 2010.
- [81] F. Hsu, S. Schwarz, and J. D. Mougous, "TagR promotes PpkA-catalysed type VI secretion activation in *Pseudomonas aeruginosa*," *Mol. Microbiol.*, vol. 72, no. 5, pp. 1111–25, Jun. 2009.
- [82] M. G. Casabona *et al.*, "An ABC transporter and an outer membrane lipoprotein participate in posttranslational activation of type VI secretion in *Pseudomonas aeruginosa*," *Environ. Microbiol.*, vol. 15, no. 2, pp. 471–486, 2013.
- [83] B. Lesic, M. Starkey, J. He, R. Hazan, and L. G. Rahme, "Quorum sensing differentially regulates *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion locus I and homologous loci II and III, which are required for pathogenesis.," *Microbiology*, vol. 155, no. Pt 9, pp. 2845–55, Sep. 2009.

- [84] T. G. Sana *et al.*, "The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and Fur and modulates internalization in epithelial cells.," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 32, pp. 27095–105, Aug. 2012.
- [85] M. Basler, B. T. Ho, and J. J. Mekalanos, "Tit-for-tat: type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions.," *Cell*, vol. 152, no. 4, pp. 884–94, Feb. 2013.
- [86] A. Ostrowski *et al.*, "Killing with proficiency: Integrated post-translational regulation of an offensive Type VI secretion system," *PLOS Pathog.*, vol. 14, no. 7, p. e1007230, Jul. 2018.
- [87] M. M. Babu *et al.*, "A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins.," *J. Bacteriol.*, vol. 188, no. 8, pp. 2761–73, Apr. 2006.
- [88] D. Liebl, M. Robert-Genthon, V. Job, V. Cogoni, and I. Attrée, "Baseplate Component TssK and Spatio-Temporal Assembly of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*," *Front. Microbiol.*, vol. 10, no. July, pp. 1–15, 2019.
- [89] A. E. Rizzitello, J. R. Harper, and T. J. Silhavy, "Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of *Escherichia coli*," *J. Bacteriol.*, vol. 183, no. 23, pp. 6794–800, Dec. 2001.
- [90] E. Fan, N. Chauhan, D. B. R. K. G. Udatha, J. C. Leo, and D. Linke, "Type V Secretion Systems in Bacteria.," *Microbiol. Spectr.*, vol. 4, no. 1, Feb. 2016.
- [91] I. Meuskens, A. Saragliadis, J. C. Leo, and D. Linke, "Type V Secretion Systems: An Overview of Passenger Domain Functions," *Front. Microbiol.*, vol. 10, p. 1163, May 2019.
- [92] H. D. Bernstein, "Type V Secretion in Gram-Negative Bacteria," *EcoSal Plus*, vol. 8, no. 2, Sep. 2019.
- [93] E. Braselmann and P. L. Clark, "Autotransporters: The Cellular Environment Reshapes a Folding Mechanism to Promote Protein Transport," *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 3, no. 8, pp. 1063–1071, Apr. 2012.
- [94] P. Emsley, I. G. Charles, N. F. Fairweather, and N. W. Isaacs, "Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin," *Nature*, vol. 381, no. 6577, pp. 90–92, May 1996.
- [95] A. Brzuszkiewicz *et al.*, "Structure of EstA esterase from psychrotrophic *Pseudoalteromonas* sp. 643A covalently inhibited by monoethylphosphonate.," *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.*, vol. 65, no. Pt 9, pp. 862–5, Sep. 2009.
- [96] D. C. Oliver, G. Huang, E. Nodel, S. Pleasance, and R. C. Fernandez, "A conserved region within the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain," *Mol. Microbiol.*, vol. 47, no. 5, pp. 1367–1383, Feb. 2003.
- [97] I. R. Henderson and J. P. Nataro, "Virulence Functions of Autotransporter Proteins," *Infect. Immun.*, vol. 69, no. 3, pp. 1231–1243, Mar. 2001.
- [98] F. Jacob-Dubuisson, J. Guérin, S. Baelen, and B. Clantin, "Two-partner secretion: as simple as it sounds?," *Res. Microbiol.*, vol. 164, no. 6, pp. 583–595, Jul. 2013.
- [99] J. C. Leo, I. Grin, and D. Linke, "Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane," *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 367, no. 1592, pp. 1088–1101, Apr. 2012.
- [100] A.-S. Delattre *et al.*, "Substrate recognition by the POTRA domains of TpsB transporter FhaC," *Mol. Microbiol.*, vol. 81, no. 1, pp. 99–112, Jul. 2011.
- [101] E. Schiebel, H. Schwarz, and V. Braun, "Subcellular location and unique secretion of the

- hemolysin of *Serratia marcescens*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 264, no. 27, pp. 16311–20, Sep. 1989.
- [102] J. W. St. Geme and H.-J. Yeo, “A prototype two-partner secretion pathway: the *Haemophilus influenzae* HMW1 and HMW2 adhesin systems,” *Trends Microbiol.*, vol. 17, no. 8, pp. 355–360, Aug. 2009.
- [103] D. Linke, T. Riess, I. B. Autenrieth, A. Lupas, and V. A. J. Kempf, “Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function,” *Trends Microbiol.*, vol. 14, no. 6, pp. 264–270, Jun. 2006.
- [104] E. Hoiczyk, A. Roggenkamp, M. Reichenbecher, A. Lupas, and J. Heesemann, “Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins,” *EMBO J.*, vol. 19, no. 22, pp. 5989–5999, Nov. 2000.
- [105] M. Mühlenkamp, P. Oberhettinger, J. C. Leo, D. Linke, and M. S. Schütz, “*Yersinia* adhesin A (YadA) - Beauty & beast,” *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 305, no. 2, pp. 252–258, 2015.
- [106] P. V. da Mata Madeira *et al.*, “Structural Basis of Lipid Targeting and Destruction by the Type V Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*,” *J. Mol. Biol.*, vol. 428, no. 9, pp. 1790–1803, May 2016.
- [107] R. Salacha *et al.*, “The *Pseudomonas aeruginosa* patatin-like protein PlpD is the archetype of a novel Type V secretion system,” *Environ. Microbiol.*, vol. 12, no. 6, pp. 1498–512, Mar. 2010.
- [108] M. A. Casasanta *et al.*, “A chemical and biological toolbox for Type Vd secretion: Characterization of the phospholipase A1 autotransporter FplA from *Fusobacterium nucleatum*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 292, no. 49, pp. 20240–20254, Dec. 2017.
- [109] J. C. Tsai, M.-R. Yen, R. Castillo, D. L. Leyton, I. R. Henderson, and M. H. Saier, “The Bacterial Intimins and Invasins: A Large and Novel Family of Secreted Proteins,” *PLoS One*, vol. 5, no. 12, p. e14403, Dec. 2010.
- [110] P. Oberhettinger *et al.*, “Intimin and Invasin Export Their C-Terminus to the Bacterial Cell Surface Using an Inverse Mechanism Compared to Classical Autotransport,” *PLoS One*, vol. 7, no. 10, p. e47069, Oct. 2012.
- [111] T. Touzé, R. D. Hayward, J. Eswaran, J. M. Leong, and V. Koronakis, “Self-association of EPEC intimin mediated by the β -barrel-containing anchor domain: a role in clustering of the Tir receptor,” *Mol. Microbiol.*, vol. 51, no. 1, pp. 73–87, Nov. 2003.
- [112] H. Liu, L. Magoun, S. Luperchio, D. B. Schauer, and J. M. Leong, “The Tir-binding region of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* intimin is sufficient to trigger actin condensation after bacterial-induced host cell signalling,” *Mol. Microbiol.*, vol. 34, no. 1, pp. 67–81, Oct. 1999.
- [113] F. Coppens *et al.*, “Hop-family *Helicobacter* outer membrane adhesins form a novel class of Type 5-like secretion proteins with an interrupted β -barrel domain,” *Mol. Microbiol.*, vol. 110, no. 1, pp. 33–46, Oct. 2018.
- [114] S. Bouillot *et al.*, “*Pseudomonas aeruginosa* Exolysin promotes bacterial growth in lungs, alveolar damage and bacterial dissemination,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 2120, 2017.
- [115] E. Reboud, S. Bouillot, S. Patot, B. Béganton, I. Attrée, and P. Huber, “*Pseudomonas aeruginosa* ExlA and *Serratia marcescens* ShlA trigger cadherin cleavage by promoting calcium influx and ADAM10 activation,” *PLOS Pathog.*, vol. 13, no. 8, p. e1006579, Aug. 2017.
- [116] P. Basso *et al.*, “Multiple *Pseudomonas* species secrete exolysin-like toxins and provoke Caspase-1-dependent macrophage death,” *Environ. Microbiol.*, vol. 19, no. 10, pp. 4045–4064, Oct. 2017.

- [117] P. Basso *et al.*, “Pseudomonas aeruginosa Pore-Forming Exolysin and Type IV Pili Cooperate To Induce Host Cell Lysis,” *MBio*, vol. 8, no. 1, 2017.
- [118] T. Maier *et al.*, “Conserved Omp85 lid-lock structure and substrate recognition in FhaC,” *Nat. Commun.*, vol. 6, no. 1, p. 7452, Jun. 2015.
- [119] Z. M. Nash and P. A. Cotter, “Bordetella Filamentous Hemagglutinin, a Model for the Two-Partner Secretion Pathway,” in *Protein Secretion in Bacteria*, vol. 7, no. 2, American Society of Microbiology, 2019, pp. 319–328.
- [120] C. Baud *et al.*, “Translocation path of a substrate protein through its Omp85 transporter,” *Nat. Commun.*, vol. 5, no. 1, p. 5271, Dec. 2014.
- [121] H. Hodak, B. Clantin, E. Willery, V. Villeret, C. Locht, and F. Jacob-Dubuisson, “Secretion signal of the filamentous haemagglutinin, a model two-partner secretion substrate,” *Mol. Microbiol.*, vol. 61, no. 2, pp. 368–82, Jul. 2006.
- [122] M. Junker and P. L. Clark, “Slow formation of aggregation-resistant β -sheet folding intermediates,” *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 78, no. 4, pp. 812–824, Mar. 2010.
- [123] P. Basso *et al.*, “Pseudomonas aeruginosa Pore-Forming Exolysin and Type IV Pili Cooperate To Induce Host Cell Lysis,” *MBio*, vol. 8, no. 1, 2017.
- [124] B. Clantin, H. Hodak, E. Willery, C. Locht, F. Jacob-Dubuisson, and V. Villeret, “The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 16, pp. 6194–9, Apr. 2004.
- [125] A. HEJAZI and F. R. FALKINER, “Serratia marcescens,” *J. Med. Microbiol.*, vol. 46, no. 11, pp. 903–912, Nov. 1997.
- [126] M. L. Cristina, M. Sartini, and A. M. Spagnolo, “Serratia marcescens Infections in Neonatal Intensive Care Units (NICUs),” *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 16, no. 4, 2019.
- [127] R. Hertle, “The Family of Serratia Type Pore Forming Toxins,” *Curr. Protein Pept. Sci.*, vol. 6, no. 4, pp. 313–325, 2005.
- [128] R. Hertle, “Serratia marcescens hemolysin (ShIA) binds artificial membranes and forms pores in a receptor-independent manner,” *J. Membr. Biol.*, vol. 189, no. 1, pp. 1–14, 2002.
- [129] A. V. Kajava *et al.*, “Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of Bordetella pertussis and related bacterial secretory proteins,” *Mol. Microbiol.*, vol. 42, no. 2, pp. 279–292, Oct. 2001.
- [130] J. A. Melvin, E. V. Scheller, C. R. Noël, and P. A. Cotter, “New Insight into Filamentous Hemagglutinin Secretion Reveals a Role for Full-Length FhaB in Bordetella Virulence,” *MBio*, vol. 6, no. 4, Aug. 2015.
- [131] D. Jurnecka, P. Man, P. Sebo, and L. Bumba, “Bordetella pertussis and Bordetella bronchiseptica filamentous hemagglutinins are processed at different sites,” *FEBS Open Bio*, vol. 8, no. 8, pp. 1256–1266, Aug. 2018.
- [132] M. S. Hanson, S. E. Pelzel, J. Latimer, U. Muller-Eberhard, and E. J. Hansen, “Identification of a genetic locus of Haemophilus influenzae type b necessary for the binding and utilization of heme bound to human hemopexin,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 89, no. 5, pp. 1973–1977, Mar. 1992.
- [133] S. Zambolin *et al.*, “Structural basis for haem piracy from host haemopexin by Haemophilus

- influenzae.," *Nat. Commun.*, vol. 7, p. 11590, 2016.
- [134] H. Contreras, N. Chim, A. Credali, and C. W. Goulding, "Heme uptake in bacterial pathogens," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 19, pp. 34–41, Apr. 2014.
- [135] O. Mayans *et al.*, "Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substrate-binding clefts of pectin and pectate lyases.," *Structure*, vol. 5, no. 5, pp. 677–89, May 1997.
- [136] H. Kawahara, "Cryoprotectants and Ice-Binding Proteins," in *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology*, Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 237–257.
- [137] M. Banach, L. Konieczny, and I. Roterman, "Why do antifreeze proteins require a solenoid?," *Biochimie*, vol. 144, pp. 74–84, Jan. 2018.
- [138] J. S. H. Lorv, D. R. Rose, and B. R. Glick, "Bacterial Ice Crystal Controlling Proteins," vol. 2014, 2014.
- [139] Z. C. Ruhe *et al.*, "Programmed Secretion Arrest and Receptor-Triggered Toxin Export during Antibacterial Contact-Dependent Growth Inhibition," *Cell*, vol. 175, no. 4, pp. 921-933.e14, 2018.
- [140] Z. C. Ruhe *et al.*, "Programmed Secretion Arrest and Receptor-Triggered Toxin Export during Antibacterial Contact-Dependent Growth Inhibition.," *Cell*, vol. 175, no. 4, pp. 921-933.e14, Nov. 2018.
- [141] P. Schanda, V. Forge, and B. Brutscher, "HET-SOFAST NMR for fast detection of structural compactness and heterogeneity along polypeptide chains," *Magn. Reson. Chem.*, vol. 44, no. S1, pp. S177–S184, Jul. 2006.
- [142] M. Ohgushi and A. Wada, "'Molten-globule state': a compact form of globular proteins with mobile side-chains," *FEBS Lett.*, vol. 164, no. 1, pp. 21–24, Nov. 1983.
- [143] V. E. Bychkova, G. V. Semisotnov, V. A. Balobanov, and A. V. Finkelstein, "The Molten Globule Concept: 45 Years Later," *Biochem.*, vol. 83, no. S1, pp. S33–S47, Jan. 2018.
- [144] P. J. Wyatt, "Light scattering and the absolute characterization of macromolecules," *Anal. Chim. Acta*, vol. 272, no. 1, pp. 1–40, Feb. 1993.
- [145] C. D. Putnam, M. Hammel, G. L. Hura, and J. A. Tainer, "X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: Defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution," *Q. Rev. Biophys.*, vol. 40, no. 3, pp. 191–285, 2007.
- [146] C. D. Putnam, M. Hammel, G. L. Hura, and J. A. Tainer, "X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution," *Q. Rev. Biophys.*, vol. 40, no. 3, pp. 191–285, Aug. 2007.
- [147] M. Podobnik, M. Kisovec, and G. Anderluh, "Molecular mechanism of pore formation by aerolysin-like proteins," *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 372, no. 1726, p. 20160209, Aug. 2017.
- [148] M. D. Peraro and F. G. van der Goot, "Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 14, no. 2, pp. 77–92, Feb. 2016.
- [149] S. J. Tilley and H. R. Saibil, "The mechanism of pore formation by bacterial toxins," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 16, no. 2, pp. 230–236, Apr. 2006.

- [150] E. Kudryashova, D. Heisler, A. Zywiec, and D. S. Kudryashov, "Thermodynamic properties of the effector domains of MARTX toxins suggest their unfolding for translocation across the host membrane," *Mol. Microbiol.*, vol. 92, no. 5, pp. 1056–1071, Jun. 2014.
- [151] R. Hertle *et al.*, "Specific phosphatidylethanolamine dependence of *Serratia marcescens* cytotoxin activity," *Mol. Microbiol.*, vol. 26, no. 5, pp. 853–865, 1997.
- [152] M. Alves-Bezerra and D. E. Cohen, "Triglyceride Metabolism in the Liver.," *Compr. Physiol.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–8, 2017.
- [153] S. Siniosoglou, "Phospholipid metabolism and nuclear function: Roles of the lipin family of phosphatidic acid phosphatases," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1831, no. 3, pp. 575–581, Mar. 2013.
- [154] J. E. Vance and G. Tasseva, "Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1831, no. 3, pp. 543–554, Mar. 2013.
- [155] C. Sohlenkamp and O. Geiger, "Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 40, no. 1, pp. 133–159, Jan. 2016.
- [156] F. G. Tafesse, P. Ternes, and J. C. M. Holthuis, "The Multigenic Sphingomyelin Synthase Family," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 40, pp. 29421–29425, Oct. 2006.
- [157] D. Lingwood and K. Simons, "Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle," *Science (80-.)*, vol. 327, no. 5961, pp. 46–50, Jan. 2010.
- [158] M. Zhang, E. Mileykovskaya, and W. Dowhan, "Cardiolipin Is Essential for Organization of Complexes III and IV into a Supercomplex in Intact Yeast Mitochondria," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 33, pp. 29403–29408, Aug. 2005.
- [159] S. E. Horvath and G. Daum, "Lipids of mitochondria," *Prog. Lipid Res.*, vol. 52, no. 4, pp. 590–614, Oct. 2013.
- [160] J.-O. De Craene, D. L. Bertazzi, S. Bär, and S. Friant, "Phosphoinositides, Major Actors in Membrane Trafficking and Lipid Signaling Pathways.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 3, Mar. 2017.
- [161] G. Schoehn, A. M. Di Guilmi, D. Lemaire, I. Attree, W. Weissenhorn, and A. Dessen, "Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*," *EMBO J.*, vol. 22, no. 19, pp. 4957–67, Oct. 2003.
- [162] R. Grishammer, "New approaches towards the understanding of integral membrane proteins: A structural perspective on G protein-coupled receptors.," *Protein Sci.*, vol. 26, no. 8, pp. 1493–1504, Aug. 2017.
- [163] V. Cherezov *et al.*, "High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor.," *Science*, vol. 318, no. 5854, pp. 1258–65, Nov. 2007.
- [164] V. Cherezov, J. Clogston, M. Z. Papiz, and M. Caffrey, "Room to move: crystallizing membrane proteins in swollen lipidic mesophases.," *J. Mol. Biol.*, vol. 357, no. 5, pp. 1605–18, Apr. 2006.
- [165] P. Wadsten *et al.*, "Lipidic Sponge Phase Crystallization of Membrane Proteins," *J. Mol. Biol.*, vol. 364, no. 1, pp. 44–53, Nov. 2006.
- [166] J. Vind, M. A. Sørensen, M. D. Rasmussen, and S. Pedersen, "Synthesis of Proteins in *Escherichia coli* is Limited by the Concentration of Free Ribosomes," *J. Mol. Biol.*, vol. 231, no. 3, pp. 678–688, Jun. 1993.

- [167] A. W. Bryan, J. L. Starner-Kreinbrink, R. Hosur, P. L. Clark, B. Berger, and B. Berger, "Structure-based prediction reveals capping motifs that inhibit β -helix aggregation.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 27, pp. 11099–104, Jul. 2011.
- [168] A. Berry *et al.*, "cAMP and Vfr Control Exolysin Expression and Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* Taxonomic Outliers.," *J. Bacteriol.*, vol. 200, no. 12, 2018.
- [169] K. Beis, C. Whitfield, I. Booth, and J. H. Naismith, "Two-step purification of outer membrane proteins," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 39, no. 1–3, pp. 10–14, Aug. 2006.
- [170] K. Simons and G. Van Meer, "Lipid sorting in epithelial cells," *Biochemistry*, vol. 27, no. 17, pp. 6197–6202, Aug. 1988.
- [171] S. Mahammad and I. Parmryd, "Cholesterol Depletion Using Methyl- β -cyclodextrin," 2015, pp. 91–102.
- [172] M. E. Hibbing, C. Fuqua, M. R. Parsek, and S. B. Peterson, "Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle.," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, no. 1, pp. 15–25, Jan. 2010.
- [173] M. Knop, T. Q. Dang, G. Jeschke, and F. P. Seebeck, "Copper is a Cofactor of the Formylglycine-Generating Enzyme," *ChemBioChem*, vol. 18, no. 2, pp. 161–165, Jan. 2017.
- [174] M. J. Appel *et al.*, "Formylglycine-generating enzyme binds substrate directly at a mononuclear Cu(I) center to initiate O₂ activation.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 116, no. 12, pp. 5370–5375, 2019.
- [175] J. Landgrebe, T. Dierks, B. Schmidt, and K. von Figura, "The human SUMF1 gene, required for posttranslational sulfatase modification, defines a new gene family which is conserved from pro- to eukaryotes.," *Gene*, vol. 316, pp. 47–56, Oct. 2003.
- [176] M.-P. Strub *et al.*, "Selenomethionine and Selenocysteine Double Labeling Strategy for Crystallographic Phasing," *Structure*, vol. 11, no. 11, pp. 1359–1367, Nov. 2003.
- [177] W. Hendrickson, "Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation," *Science (80-.)*, vol. 254, no. 5028, pp. 51–58, Oct. 1991.
- [178] P. G. Holder *et al.*, "Reconstitution of Formylglycine-generating Enzyme with Copper(II) for Aldehyde Tag Conversion," *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 25, pp. 15730–45, Jun. 2015.
- [179] M. Knop, T. Q. Dang, G. Jeschke, and F. P. Seebeck, "Copper is a Cofactor of the Formylglycine-Generating Enzyme.," *ChemBiochem*, vol. 18, no. 2, pp. 161–165, Jan. 2017.
- [180] S. G. Wong and A. Dessen, "Structure of a bacterial α 2-macroglobulin reveals mimicry of eukaryotic innate immunity," *Nat. Commun.*, vol. 5, no. 1, p. 4917, Dec. 2014.
- [181] E. A. Stura and I. A. Wilson, "Analytical and production seeding techniques," *Methods*, vol. 1, no. 1, pp. 38–49, 1990.
- [182] C. Thaller, L. H. Weaver, G. Eichele, E. Wilson, R. Karlsson, and J. N. Jansonius, "Repeated seeding technique for growing large single crystals of proteins," *J. Mol. Biol.*, vol. 147, no. 3, pp. 465–469, Apr. 1981.
- [183] A. Abuhammad *et al.*, "Structure of arylamine *N*-acetyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* determined by cross-seeding with the homologous protein from *M. marinum* : triumph over adversity," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 69, no. 8, pp. 1433–1446, Aug. 2013.
- [184] G. C. Ireton, B. L. Stoddard, and IUCr, "Microseed matrix screening to improve crystals of yeast cytosine deaminase," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 60, no. 3, pp. 601–605,

Mar. 2004.

- [185] C. Contreras-Martel *et al.*, “Crystallization and 2.2 Å resolution structure of R-phycoerythrin from *Gracilaria chilensis*: a case of perfect hemihedral twinning,” *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 57, no. 1, pp. 52–60, Jan. 2001.
- [186] T. Bergfors, “Seeds to crystals,” *J. Struct. Biol.*, vol. 142, no. 1, pp. 66–76, Apr. 2003.
- [187] A. D’Arcy, T. Bergfors, S. W. Cowan-Jacob, and M. Marsh, “Microseed matrix screening for optimization in protein crystallization: what have we learned?,” *Acta Crystallogr. Sect. F, Struct. Biol. Commun.*, vol. 70, no. Pt 9, pp. 1117–26, Sep. 2014.
- [188] J. R. Luft and G. T. DeTitta, “A method to produce microseed stock for use in the crystallization of biological macromolecules,” *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, vol. 55, no. Pt 5, pp. 988–93, May 1999.
- [189] A. D’Arcy, F. Villard, and M. Marsh, “An automated microseed matrix-screening method for protein crystallization,” *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 63, no. 4, pp. 550–554, Apr. 2007.
- [190] N. P. Cianciotto and R. C. White, “Expanding Role of Type II Secretion in Bacterial Pathogenesis and Beyond,” *Infect. Immun.*, vol. 85, no. 5, May 2017.
- [191] K. E. Phillips and K. J. F. Satchell, “*Vibrio vulnificus*: From Oyster Colonist to Human Pathogen,” *PLOS Pathog.*, vol. 13, no. 1, p. e1006053, Jan. 2017.
- [192] J. M. Janda and S. L. Abbott, “The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 23, no. 1, pp. 35–73, Jan. 2010.
- [193] ‡ Radu Stefureac, ‡ Yi-tao Long, *,§ Heinz-Bernhard Kraatz, || and Peter Howard, and ‡ Jeremy S. Lee*, “Transport of α -Helical Peptides through α -Hemolysin and Aerolysin Pores†,” 2006.
- [194] K. V Korotkov and M. Sandkvist, “Architecture, Function, and Substrates of the Type II Secretion System,” *EcoSal Plus*, vol. 8, no. 2, Sep. 2019.
- [195] Z. Yan, M. Yin, D. Xu, Y. Zhu, and X. Li, “Structural insights into the secretin translocation channel in the type II secretion system,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 24, no. 2, pp. 177–183, Feb. 2017.
- [196] J.-L. Thomassin, J. Santos Moreno, I. Guilvout, G. Tran Van Nhieu, and O. Francetic, “The trans-envelope architecture and function of the type 2 secretion system: new insights raising new questions,” *Mol. Microbiol.*, vol. 105, no. 2, pp. 211–226, Jul. 2017.
- [197] A. A. Chernyatina and H. H. Low, “Core architecture of a bacterial type II secretion system,” *bioRxiv*, p. 397794, Sep. 2019.
- [198] V. E. Shevchik and G. Condemine, “Functional characterization of the *Erwinia chrysanthemi* Outs protein, an element of a type II secretion system,” *Microbiology*, vol. 144, no. 11, pp. 3219–3228, Nov. 1998.
- [199] I. Guilvout, M. Chami, A. Engel, A. P. Pugsley, and N. Bayan, “Bacterial outer membrane secretin PulD assembles and inserts into the inner membrane in the absence of its pilotin,” *EMBO J.*, vol. 25, no. 22, pp. 5241–9, Nov. 2006.
- [200] T. G. Strozen, G. Li, and S. P. Howard, “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.*, vol. 80, no. 8, pp. 2608–22, Aug. 2012.

- [201] R. A. Dunstan *et al.*, "Assembly of the Type II Secretion System such as Found in *Vibrio cholerae* Depends on the Novel Pilotin AspS," *PLoS Pathog.*, vol. 9, no. 1, p. e1003117, Jan. 2013.
- [202] V. M. Ast, I. C. Schoenhofen, G. R. Langen, C. W. Stratilo, M. D. Chamberlain, and S. P. Howard, "Expression of the ExeAB complex of *Aeromonas hydrophila* is required for the localization and assembly of the ExeD secretion port multimer," *Mol. Microbiol.*, vol. 44, no. 1, pp. 217–231, Apr. 2002.
- [203] G. Li and S. P. Howard, "ExeA binds to peptidoglycan and forms a multimer for assembly of the type II secretion apparatus in *Aeromonas hydrophila*," *Mol. Microbiol.*, vol. 76, no. 3, pp. 772–781, Mar. 2010.
- [204] E. M. Vanderlinde, S. Zhong, G. Li, D. Martynowski, P. Grochulski, and S. P. Howard, "Assembly of the type two secretion system in *Aeromonas hydrophila* involves direct interaction between the periplasmic domains of the assembly factor ExeB and the secretin ExeD.," *PLoS One*, vol. 9, no. 7, p. e102038, 2014.
- [205] S. P. Howard *et al.*, "Structure and assembly of pilotin-dependent and -independent secretins of the type II secretion system.," *PLoS Pathog.*, vol. 15, no. 5, p. e1007731, May 2019.
- [206] M. Yin, Z. Yan, and X. Li, "Structural insight into the assembly of the type II secretion system pilotin–secretin complex from enterotoxigenic *Escherichia coli*," *Nat. Microbiol.*, vol. 3, no. 5, pp. 581–587, May 2018.
- [207] W. Kabsch, "XDS.," *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, vol. 66, no. Pt 2, pp. 125–32, Feb. 2010.
- [208] M. D. Winn *et al.*, "Overview of the CCP4 suite and current developments.," *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, vol. 67, no. Pt 4, pp. 235–42, Apr. 2011.
- [209] C. Millán *et al.*, "Exploiting distant homologues for phasing through the generation of compact fragments, local fold refinement and partial solution combination.," *Acta Crystallogr. Sect. D, Struct. Biol.*, vol. 74, no. Pt 4, pp. 290–304, 2018.
- [210] G. Langer, S. X. Cohen, V. S. Lamzin, and A. Perrakis, "Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7.," *Nat. Protoc.*, vol. 3, no. 7, pp. 1171–9, 2008.
- [211] P. Emsley, K. Cowtan, and IUCr, "Coot : model-building tools for molecular graphics," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 60, no. 12, pp. 2126–2132, Dec. 2004.
- [212] G. N. Murshudov *et al.*, "REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures.," *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, vol. 67, no. Pt 4, pp. 355–67, Apr. 2011.
- [213] J. Painter, E. A. Merritt, and IUCr, "TLSMD web server for the generation of multi-group TLS models," *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 39, no. 1, pp. 109–111, Feb. 2006.
- [214] J. Painter, E. A. Merritt, and IUCr, "Optimal description of a protein structure in terms of multiple groups undergoing TLS motion," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 62, no. 4, pp. 439–450, Apr. 2006.
- [215] V. B. Chen *et al.*, "MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography.," *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, vol. 66, no. Pt 1, pp. 12–21, Jan. 2010.
- [216] R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss, J. M. Thornton, and IUCr, "PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures," *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 26, no. 2, pp. 283–291, Apr. 1993.

- [217] M. R. Wilkins *et al.*, "Protein identification and analysis tools in the ExPASy server.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 112, pp. 531–52, 1999.
- [218] J. D. Bendtsen, H. Nielsen, G. Von Heijne, and S. Brunak, "Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0," *J. Mol. Biol.*, vol. 340, no. 4, pp. 783–795, 2004.
- [219] L. Slabinski, L. Jaroszewski, L. Rychlewski, I. A. Wilson, S. A. Lesley, and A. Godzik, "XtalPred: a web server for prediction of protein crystallizability," *Bioinformatics*, vol. 23, no. 24, pp. 3403–3405, Dec. 2007.
- [220] A. Drozdetskiy, C. Cole, J. Procter, and G. J. Barton, "JPred4: a protein secondary structure prediction server," *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, no. W1, pp. W389–W394, Jul. 2015.
- [221] L. Zimmermann *et al.*, "A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at its Core," *J. Mol. Biol.*, vol. 430, no. 15, pp. 2237–2243, Jul. 2018.
- [222] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman, "Basic local alignment search tool," *J. Mol. Biol.*, vol. 215, no. 3, pp. 403–410, Oct. 1990.
- [223] L. A. Kelley, S. Mezulis, C. M. Yates, M. N. Wass, and M. J. E. Sternberg, "The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis," *Nat. Protoc.*, vol. 10, no. 6, pp. 845–858, Jun. 2015.
- [224] Y. Song *et al.*, "High resolution comparative modeling with RosettaCM," *Structure*, vol. 21, no. 10, 2013.
- [225] A. Waterhouse *et al.*, "SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes," *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. W1, pp. W296–W303, Jul. 2018.
- [226] L. Goldschmidt, D. R. Cooper, Z. S. Derewenda, and D. Eisenberg, "Toward rational protein crystallization: A Web server for the design of crystallizable protein variants.," *Protein Sci.*, vol. 16, no. 8, pp. 1569–76, Aug. 2007.
- [227] G. A. Martin, R. Kawaguchi, Y. Lam, A. Degiovanni, M. Fukushima, and W. Mutter, "High-yield, in vitro protein expression using a continuous-exchange, coupled transcription/translation system," *Biotechniques*, vol. 31, no. 4, pp. 948–953, 2001.
- [228] C. No, "Roche Molecular Biochemicals Rapid Translation System RTS pIVEX His-tag Vector Set Cat. No. 3 253 538 Store at 15 to 25°C," no. 3, pp. 1–6, 2001.
- [229] D. D. Lasic, *Liposomes in gene delivery*. CRC Press, 1997.
- [230] D. P. Allison, N. P. Mortensen, C. J. Sullivan, and M. J. Doktycz, "Atomic force microscopy of biological samples," *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*, vol. 2, no. 6, pp. 618–634, Nov. 2010.
- [231] S. Liu and Y. Wang, "Application of AFM in microbiology: a review," *Scanning*, vol. 32, no. 2, pp. 61–73, Mar. 2010.
- [232] C. V. Kulkarni, W. Wachter, G. Iglesias-Salto, S. Engelskirchen, and S. Ahualli, "Monoolein: A magic lipid?," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 13, no. 8, pp. 3004–3021, 2011.
- [233] M. Caffrey, "A comprehensive review of the lipid cubic phase or in meso method for crystallizing membrane and soluble proteins and complexes," *Acta Crystallogr. Sect. F, Struct. Biol. Commun.*, vol. 71, no. Pt 1, p. 3, Jan. 2015.
- [234] A. J. McCoy *et al.*, "Phaser crystallographic software," *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 40, no. 4, pp. 658–674, Aug. 2007.

- [235] C. Vonrhein, E. Blanc, P. Roversi, and G. Bricogne, "Automated Structure Solution With autoSHARP," in *Macromolecular Crystallography Protocols, Volume 2*, New Jersey: Humana Press, 2007, pp. 215–230.
- [236] G. Tickle, I.J., Flensburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Sharff, A., Vonrhein, C., Bricogne, "STARANISO."
- [237] D. Franke *et al.*, "ATSAS 2.8: A comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions," *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 50, pp. 1212–1225, 2017.
- [238] A. Pagliuso *et al.*, "An RNA-binding protein secreted by *Listeria monocytogenes* activates RIG-I signaling," *bioRxiv*, p. 543652, Mar. 2019.
- [239] K. Kanonenberg, O. Spitz, I. N. Erenburg, T. Beer, and L. Schmitt, "Type I secretion system—it takes three and a substrate," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 365, no. 11, Jun. 2018.

Résumé

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie responsable de sévères infections nosocomiales. Ces infections sont un réel problème pour la santé publique car *P. aeruginosa* fait partie des pathogènes ESKAPE qui ont développé des facteurs de résistance aux antibiotiques ce qui leur permet d'échapper aux traitements classiques. *P. aeruginosa*, en plus d'être résistante aux antibiotiques est capable d'exprimer de nombreux facteurs de virulences. Parmi ces facteurs on retrouve les systèmes de sécrétion de type V (SST5) sur lequel j'ai pu travailler durant ma thèse.

Une nouvelle souche de *P. aeruginosa* a été découverte à Grenoble il y a quelques années. Cette souche n'exprime pas les mêmes facteurs de virulence que les souches communément étudiées mais en demeure bien plus toxique. La toxicité de cette souche est due à l'expression de deux protéines ExlB et ExlA faisant partie de la famille du SST5b et ayant un mécanisme d'action complètement nouveau car aucun homologue n'est connu. La toxine ExlA est capable de faire des pores dans les membranes des cellules eucaryotes entraînant leur mort. Le but de ma thèse était donc de comprendre à l'échelle moléculaire le fonctionnement de ExlA.

Pour identifier le mécanisme d'action de cette toxine, nous l'avons divisée en deux domaines que nous avons étudiés séparément. En utilisant des techniques de RMN, de SEC-MALLS, de flottaison différentielle, de SAXS et d'AFM, nous avons pu définir que le domaine C-terminal de cette protéine était un « molten globule » en solution et était capable de faire des trous dans les membranes lipidiques reconstituées. Ce domaine semble être le domaine responsable de l'interaction d'ExlA avec les lipides. Ceci additionné à des études menées *in vivo* sur la toxine ExlA complète et comportant uniquement son domaine N-terminal nous a permis de définir un possible mécanisme d'action de la toxine ExlA. La somme de nos études fait l'objet d'un article en cours d'écriture.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is the causative agent of nosocomial infections. Those infections are a real threat to public health, considering that *P. aeruginosa* is a member of the ESKAPE pathogens family. Those pathogens developed numerous antibiotic resistance mechanisms that allow them to escape the lethality of common treatments. More than just resistant, *P. aeruginosa* is able to make use of several virulence factors, and among them, the type V secretion system, which is the main subject of my PhD.

A new virulent *P. aeruginosa* strain was discovered in Grenoble University Hospital several years ago. This strain lacked the virulence factors of common studied cytotoxic strains but, still displayed high toxicity. This was related to the expression of two proteins, ExlB and ExlA, that are part of the T5SSb and display a complete new mechanism of action (no protein homologs are found). The ExlA toxin is able to form pores in the eukaryotic cell membrane leading to their death. The aim of my PhD was to understand on a molecular level the mechanism of ExlA toxicity.

To decipher the activity of this toxin, we divided it in two domains, studied separately. Using NMR, SEC-MALLS, liposome floating assay, SAXS and AFM techniques, we were able to prove that the C-terminal domain of ExlA was a « molten globule » in solution and was able to form holes in reconstituted lipid bilayers. This domain seems to be the key to lipid interaction by the whole protein. Additional *in vivo* studies of the N-terminal domain and on full-length ExlA allowed us to propose a putative model of the mechanism of this novel toxin.